

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΑΡΜΕΝΟΠΟΥΛΟΥ ΒΑΝΕΣΑ
ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΒΙΟΛΟΓΟΣ & ΓΕΝΕΤΙΣΤΡΙΑ

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΠΥΡΑΝΟΖΥΛΟΑΜΙΔΙΚΩΝ ΚΑΙ
ΦΟΥΡΑΝΟΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΙΚΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ
ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΩΝ ΩΣ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ
ΑΝΤΙΔΙΑΒΗΤΙΚΟΙ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2016

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΠΥΡΑΝΟΖΥΛΟΑΜΙΔΙΚΩΝ ΚΑΙ
ΦΟΥΡΑΝΟΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΙΚΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ
ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΩΝ ΩΣ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ
ΑΝΤΙΔΙΑΒΗΤΙΚΟΙ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Δ. ΚΟΜΙΩΤΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ): Καθηγητής Οργανικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Α. ΤΣΟΤΙΝΗΣ: Καθηγητής Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δ. ΛΕΩΝΙΔΑΣ: Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Α.-Μ. ΨΑΡΡΑ: Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ι. ΠΙΡΜΕΤΤΗΣ: Ερευνητής Α', Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών "Δημόκριτος"

Ν. ΜΠΑΛΑΤΣΟΣ: Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μ. ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ: Ερευνητής Α', Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών "Δημόκριτος"

Δ. ΛΕΩΝΙΔΑΣ: Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Α. ΤΣΟΤΙΝΗΣ: Καθηγητής Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δ. ΚΟΜΙΩΤΗΣ: Καθηγητής Οργανικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΒΑΝΕΣΑ ΠΑΡΜΕΝΟΠΟΥΛΟΥ

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΠΥΡΑΝΟΖΥΛΟΑΜΙΔΙΚΩΝ ΚΑΙ
ΦΟΥΡΑΝΟΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΙΚΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ
ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΩΝ ΩΣ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ
ΑΝΤΙΔΙΑΒΗΤΙΚΟΙ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ**

Σε όλους τους ανθρώπους που συνετέλεσαν με τον τρόπο τους να φτάσω ως εδώ...



ΒΑΝΕΣΑ ΠΑΡΜΕΝΟΠΟΥΛΟΥ

ΛΑΡΙΣΑ 2016

ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΠΥΡΑΝΟΖΥΛΟΑΜΙΔΙΚΩΝ ΚΑΙ
ΦΟΥΡΑΝΟΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΙΚΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ
ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΩΝ ΩΣ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ
ΑΝΤΙΔΙΑΒΗΤΙΚΟΙ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: 19

Συνολικός αριθμός σελίδων: 282

Συνολικός αριθμός πινάκων: 13

Συνολικός αριθμός παραρτημάτων: 1

Συνολικός αριθμός βιβλιογραφικών παραπομπών: 152

Περίληψη

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι το ένζυμο κλειδί, το οποίο διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου. Εξαιτίας του κρίσιμου ρόλου της στο μεταβολισμό του γλυκογόνου και την ομοιοστάση γλυκόζης, το ένζυμο αποτελεί στόχο για τον υποβοηθούμενο από τη δομή σχεδιασμό αντιπεργλυκαιμικών αναστολέων. Καθώς η γλυκόζη είναι ο φυσιολογικός αναστολέας του ενζύμου, πλήθος αναλόγων γλυκόζης έχουν σχεδιαστεί, συντεθεί και αξιολογηθεί για τη βιοδραστικότητά τους έναντι στο ένζυμο. Με βάση τα δεδομένα αυτά, και έπειτα από υπολογιστική σάρωση της βιβλιοθήκης μικρών μορίων Zinc, σχεδιάστηκαν και αξιολογήθηκαν 1888 *N*-ακυλο- β -D-γλυκοκυρανοζυλαμίνες (β -D-Glc-NHCO-R) από τις οποίες συντέθηκαν έξι με διαφορετικούς υποκαταστάτες (R). Τα νέα μόρια στη συνέχεια αποτιμήθηκαν βιολογικά. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, αντικαταστάθηκε ο σύνδεσμος NHCO από τον μακρύτερο NHCONHCO ώστε να διερευνηθούν οι αλληλεπιδράσεις των νέων μορίων, που θα έφεραν τους ίδιους υποκαταστάτες, σε σχέση με τα μητρικά.

Οι ριβονουκλεάσες (RNases) είναι ενδονουκλεάσες και εξωνουκλεάσες οι οποίες ελέγχουν μεταμεταγραφικά τον πληθυσμό του RNA στα κύτταρα. Οι RNases και συγκεκριμένα η RNase A, έχουν αποδειχθεί ότι αποτελούν ένα καλό μοντέλο για τη μελέτη της πρωτεϊνικής δομής, αναδίπλωσης και σταθερότητας καθώς και της ενζυμικής κατάλυσης. Την τελευταία δεκαετία ομόλογα της υπεροικογένειας των RNAσών έχουν βρεθεί να εμπλέκονται στην εκδήλωση πολλών νόσων. Για το λόγο αυτό, οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν φαρμακευτικούς στόχους για το σχεδιασμό αναστολέων που θα καταστέλλουν τη δραστηριότητά τους, περιορίζοντας τις παθολογικές τους δράσεις. Με βάση τα δεδομένα αυτά και θέλοντας να μελετήσουμε την επίδραση της απόστασης μεταξύ του σακχάρου και της βάσης νέων τροποποιημένων νουκλεοζιτών στη βιοδραστικότητα του ενζύμου, συντέθηκαν τριάζολο ριβοφουρανονουκλεοζίτες με ποικίλλες βάσεις καθώς και οι αντίστοιχες ουριδίνες που έφεραν τις ίδιες βάσεις. Επιπλέον, δεδομένου ότι η 5-θέση της πυριμιδίνης είναι δεκτική στην εισαγωγή ομάδων, διερευνήθηκαν οι περιορισμοί στο μέγεθος κάθε νέας χημικής ομάδας, που εισήχθη στη συγκεκριμένη θέση. Ως συνέχεια της κατεύθυνσης αυτής αλλά και έχοντας ως στόχο το σχεδιασμό αποτελεσματικότερων αναστολέων του ενζύμου, προέκυψε η μετέπειτα σύνθεση ενός ριβονουκλεοζίτη με δύο βάσεις στη δομή του, δικέφαλος νουκλεοζίτης.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ:

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιο-Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Οργανικής Χημείας, κ. Δημήτριου Κομιώτη στον οποίο και θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου για την καθοδήγηση, τις υποδείξεις και την εμπιστοσύνη στο πρόσωπό μου καθ' όλη τη διάρκεια αυτού του ταξιδιού. Πάντα θα αποτελεί πρότυπο σκληρής δουλειάς και αγώνα ανεξαρτήτου συνθηκών.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. Ανδρέα Τσοτίνη καθώς και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, κ. Δημήτριο Λεωνίδα, οι οποίοι με τίμησαν δεχόμενοι να συμμετάσχουν στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή αυτής της διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούςεξεταστικής επιτροπής τον κύριο Παπαδόπουλο Μηνά, Ερευνητής Α' του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών "Δημόκριτος", την κ. Άννα Μαρία Ψαρρά, Επίκουρη καθηγήτρια Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, τον κ. Νικόλαο Μπαλατσό, Επίκουρο καθηγητή Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας καθώς και τον κ. Ιωάννη Πιρμεττή, Ερευνητή του Ινστιτούτου Ραδιοϊσοτόπων και Ραδιοδιαγνωστικών Προϊόντων, στο Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», για την ευγένεια του χαρακτήρα, το ενδιαφέρον και τις επιστημονικές υποδείξεις τους.

Δε θα ήθελα να παραλείψω να στείλω τις φιλικότερες ευχές μου όλα τα μέλη του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας που με συντρόφευσαν στην πορεία μου αυτή και πιο συγκεκριμένα στους Κυρίτση Χρήστο, Δημοπούλου Αθηνά, Κολλάτο Νικόλαο για την κατανόηση και την υποστήριξη κατά τις ώρες εργασίας μου καθώς και τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Μαντά Στυλιανή για τις πάντα στοχευμένες και πολύτιμες υποδείξεις της. Επίσης, θα ήθελα ιδιαίτερα να ευχαριστήσω τις συναδέλφους Καντσάδη Αναστασία και Χατζηλεοντιάδου Δήμητρα του εργαστηρίου Δομικής & Λειτουργικής Βιοχημείας, οι οποίες συνεργάστηκαν μαζί μου με τον καλύτερο δυνατό τρόπο για την ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένειά μου για την οικονομική και την ηθική συμπαράσταση που μου παρείχαν τον καιρό αυτό χωρίς τους οποίους

θα ήταν αδύνατο να πραγματοποιηθεί και να ολοκληρωθεί η παρούσα διδακτορική διατριβή.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Οι δημοσιεύσεις που προέκυψαν από την παρούσα διδακτορική διατριβή είναι οι ακόλουθες:

- Triazole pyrimidine nucleosides as inhibitors of Ribonuclease A. Synthesis, biochemical, and structural evaluation. Vanessa Parmenopoulou, Demetra S. M. Chatzileontiadiou, Stella Manta, Stamatina Bougiatioti, Panagiotis Maragozidis, Dimitra-Niki Gkaragkouni, Eleni Kaffesaki, Anastassia L. Kantsadi, Vassiliki T. Skamnaki, Spyridon E. Zographos, Panagiotis Zoumpoulakis, Nikolaos A. A. Balatsos, Dimitris Komiotis and Demetres D. Leonidas. *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, 20, 7184-7193.
- Structure based inhibitor design targeting glycogen phosphorylase b. Virtual screening, synthesis, biochemical and biological assessment of novel *N*-acyl- β -D-glucopyranosylamines. Vanessa Parmenopoulou, Anastassia L. Kantsadi, Vicky G. Tsirkone, Demetra S.M. Chatzileontiadiou, Stella Manta, Spyros E. Zographos, Christina Molfeta, Georgios Archontis, Loranne Agius, Joseph M. Hayes, Demetres D. Leonidas and Dimitri Komiotis. *Bioorg. Med. Chem.*, **2014**, 22, 4810-4825.
- Glycogen phosphorylase as a target for type 2 diabetes: Synthetic, biochemical, structural and computational evaluation of novel *N*-acyl-*N'*-(β -D-glucopyranosyl) urea inhibitors. Anastassia L. Kantsadi, Vanessa Parmenopoulou, Dimitar N. Bakalov, Laura Snelgrove, George A. Stravodimos, Demetra S.M. Chatzileontiadiou, Stella Manta, Angeliki Panagiotopoulou, Joseph M. Hayes, Dimitri Komiotis, Demetres D. Leonidas. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2015**, 15, 2373-2389.
- Triazole double-headed ribonucleosides as inhibitors of eosinophil derived neurotoxin. Demetra S.M. Chatzileontiadiou, Vanessa Parmenopoulou, Stella Manta, Anastassia L. Kantsadi, Paroula Kylandri, Mariana Grinieziaki, Filitsa Kontopoulou, Aikaterini Telopoulou, Helena Prokova, Dimitrios Panagopoulos, Ester Boix, Nikolaos A.A. Balatsos, Dimitri Komiotis, Demetres D. Leonidas. *Bioorg. Med. Chem.*, **2015**, 63, 152-165.
- Synthesis of novel *N*-acyl- β -D-glucopyranosylamines and ureas as potential lead cytostatic agents. Vanessa Parmenopoulou, Stella Manta, Athina Dimopoulou, Nikolaos Kollatos, Dominique Schols, Dimitri Komiotis. *Med. Chem. Res. (In Press)*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	vii
Ευχαριστίες.....	viii
Περιεχόμενα.....	xi
Iα. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
Iα.1 Σακχαρώδης Διαβήτης.....	1
Iα.2 Μεταβολισμός του γλυκογόνου.....	3
Iα.3 Αποικοδόμηση γλυκογόνου.....	4
Iα.4 Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου.....	6
Iα.5 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου.....	7
Iα.6 Αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις.....	8
Iα.7 Κρυσταλλική δομή της GP και κέντρα σύνδεσης.....	12
Iα.8 Αναστολείς της φωσφορυλάσης γλυκογόνου.....	17
Iα.9 Υπολογιστικές μέθοδοι σχεδιασμού αναστολέων για τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου.....	24
Iα.10 <i>N</i> -ακυλο- β -D-γλυκοπυρανοζυλαμίνες και ουρίες ως κυτταροστατικοί παράγοντες.....	25
Iα.11 Στόχοι.....	26
IIα. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	27
IIα.1. Σύνθεση <i>N</i> -ακυλο- β -D-γλυκοπυρανοζυλαμινών.....	27
IIα.2. Σχηματισμός αμιδικού δεσμού και παρεμποδιζόμενη περιστροφής πέριξ του αμιδικού δεσμού (hindered rotation).....	45
IIα.3. Κρυσταλλογραφική μελέτη <i>N</i> -ακυλο- β -D-γλυκοπυρανοζυλαμινών....	46
IIα.4. Κινητική μελέτη <i>N</i> -ακυλο- β -D-γλυκοπυρανοζυλαμινών.....	53
IIα.5. Σύνθεση <i>N</i> -ακυλο- β -D-γλυκοπυρανοζυλουριών.....	54
IIα.6. Κινητική μελέτη <i>N</i> -ακυλο- <i>N'</i> - β -D-γλυκοπυρανοζυλουριών.....	70
IIα.7. Αντικαρκινική και Αντική δράση προστατευμένων και αποπροστατευμένων <i>N</i> -ακυλο- β -D-γλυκοπυρανοζυλαμινών και <i>N</i> -ακυλο- <i>N'</i> - β -D- γλυκοπυρανοζυλουριών.....	71
IIIα. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	75
IIIα.1 Γενικές Μέθοδοι.....	75
IIIα.2 Σύνθεση του 2,3,4,6-τετρακίς- <i>O</i> -ακετυλο- β -D-γλυκοπυρανοζυλαζιδίου (17).....	77

Πα.3 Σύνθεση της 2,3,4,6-τετρακίς- <i>O</i> -ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλαμίνης (18).....	78
Πα.4 Σύνθεση των ακετυλιωμένων γλυκοπυρανοζυλαμινών 19a-f.....	79
<i>N</i> -(<i>E</i>)-3-(Διφαινυλο-4-υλο)ακρυλοϋλο-(2,3,4,6-τετρακίς- <i>O</i> -ακετυλο)-β-D- γλυκοπυρανοζυλαμίνη (19a).....	79
<i>N</i> -4-(5,6,7,8-Τετραϋδروναφθαλενο-2-υλο)βουτανοϋλο-(2,3,4,6-τετρακίς- <i>O</i> - ακετυλο)-β-D-γλυκοπυρανοζυλαμίνη (19b).....	80
<i>N</i> -2-(Διφαινυλο-4-υλοξυ)ακετυλ-(2,3,4,6-τετρακίς- <i>O</i> -ακετυλο)-β-D- γλυκοπυρανοζυλαμίνη (19c).....	81
<i>N</i> -(<i>E</i>)-3-(4-Ισοπροπυλοφαινυλο)ακρυλοϋλο-(2,3,4,6-τετρακίς- <i>O</i> -ακετυλο)-β-D- γλυκοπυρανοζυλαμίνη (19d).....	82
<i>N</i> -(<i>R</i>)-3-(4-Αιθυλοφαινυλο)βουτανοϋλο-(2,3,4,6-τετρακίς- <i>O</i> -ακετυλο)-β-D- γλυκοπυρανοζυλαμίνη (19e).....	83
<i>N</i> -(<i>S</i>)-3-(4-Ισοπροπυλοφαινυλο)-2-μεθυλοπροπανοϋλο-(2,3,4,6-τετρακίς- <i>O</i> - ακετυλο)-β-D-γλυκοπυρανοζυλαμίνη (19f).....	84
Πα.5 Σύνθεση αποπροστατευμένων γλυκοπυρανοζυλαμινών 20a-f.....	85
<i>N</i> -(<i>E</i>)-3-(Διφαινυλο-4-υλ)ακρυλοϋλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλαμίνη (20a).....	85
<i>N</i> -4-(5,6,7,8-Τετραϋδροναφθαλενο-2-υλο)βουτανοϋλο-β-D- γλυκοπυρανοζυλαμίνη (20b).....	86
<i>N</i> -2-(Διφαινυλο-4-υλοξυ)ακετυλ-β-D-γλυκοπυρανοζυλαμίνη (20c).....	87
<i>N</i> -(<i>E</i>)-3-(4-Ισοπροπυλοφαινυλο)ακρυλοϋλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλαμίνη (20d).....	88
<i>N</i> -(<i>R</i>)-3-(4-Αιθυλοφαινυλο)βουτανοϋλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλαμίνη (20e).....	89
<i>N</i> -(<i>S</i>)-3-(4-Ισοπροπυλοφαινυλο)-2-μεθυλοπροπανοϋλο-β-D- γλυκοπυρανοζυλαμίνη (20f).....	90
Πα.6 Σύνθεση της 2,3,4,6-τετρακίς- <i>O</i> -ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλουρίας (21).....	91
Πα.7 Σύνθεση των προστατευμένων γλυκοπυρανοζυλουριών 22a-f.....	93
<i>N</i> -(<i>E</i>)-3-(Διφαινυλο-4-υλο)ακρυλοϋλο- <i>N</i> '-(2,3,4,6-τετρακίς- <i>O</i> -ακετυλο)-β-D- γλυκοπυρανοζυλουρία (22a).....	93
<i>N</i> -4-(5,6,7,8-Τετραϋδροναφθαλενο-2-υλο)βουτανοϋλο- <i>N</i> '-(2,3,4,6-τετρακίς- <i>O</i> - ακετυλο)-β-D-γλυκοπυρανοζυλουρία (22b).....	94
<i>N</i> -2-(Διφαινυλο-4-υλοξυ)ακετυλ- <i>N</i> '-(2,3,4,6-τετρακίς- <i>O</i> -ακετυλο)-β-D- γλυκοπυρανοζυλουρία (22c).....	95

<i>N</i> -(<i>E</i>)-3-(4-Ισοπροπυλοφαινυλο)ακρυλοϋλο- <i>N'</i> -(2,3,4,6-τετρακίς- <i>O</i> -ακετυλο)-β- <i>D</i> -γλυκοπυρανοζυλουρία (22 <i>d</i>).....	96
<i>N</i> -(<i>R</i>)-3-(4-Αιθυλοφαινυλο)βουτανοϋλο- <i>N'</i> -(2,3,4,6-τετρακίς- <i>O</i> -ακετυλο)-β- <i>D</i> -γλυκοπυρανοζυλουρία (22 <i>e</i>).....	97
<i>N</i> -(<i>S</i>)-3-(4-Ισοπροπυλοφαινυλο)-2-μεθυλοπροπανοϋλο- <i>N'</i> -(2,3,4,6-τετρακίς- <i>O</i> -ακετυλο)-β- <i>D</i> -γλυκοπυρανοζυλουρία (22 <i>f</i>).....	98
III.8 Σύνθεση των αποπροστατευμένων γλυκοπυρανοζυλουριών 23a-f.....	99
<i>N</i> -(<i>E</i>)-3-(Διφαινυλο-4-υλ)ακρυλοϋλο- <i>N'</i> -β- <i>D</i> -γλυκοπυρανοζυλουρία (23 <i>a</i>).....	99
<i>N</i> -4-(5,6,7,8-Τετραϋδροναφθαλενο-2-υλο)βουτανοϋλο- <i>N'</i> -β- <i>D</i> -γλυκοπυρανοζυλουρία (23 <i>b</i>).....	100
<i>N</i> -2-(Διφαινυλο-4-υλοξυ)ακετυλ- <i>N'</i> -β- <i>D</i> -γλυκοπυρανοζυλουρία (23 <i>c</i>).....	101
<i>N</i> -(<i>E</i>)-3-(4-Ισοπροπυλοφαινυλο)ακρυλοϋλο- <i>N'</i> -β- <i>D</i> -γλυκοπυρανοζυλουρία (23 <i>d</i>).....	102
<i>N</i> -(<i>R</i>)-3-(4-Αιθυλοφαινυλο)βουτανοϋλο- <i>N'</i> -β- <i>D</i> -γλυκοπυρανοζυλουρία (23 <i>e</i>).....	103
<i>N</i> -(<i>S</i>)-3-(4-Ισοπροπυλοφαινυλο)-2-μεθυλοπροπανοϋλο- <i>N'</i> -β- <i>D</i> -γλυκοπυρανοζυλουρία (23 <i>f</i>).....	104
Ιβ. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	106
Ιβ.1 Μεταβολισμός του RNA.....	106
Ιβ.2 Ριβονουκλεάσες.....	107
Ιβ.3 Παγκρεατική ριβονουκλεάση A (RNase A).....	108
Ιβ.4 Μηχανισμός Κατάλυσης της RNase A.....	110
Ιβ.5 Κρυσταλλική δομή της RNase A.....	111
Ιβ.6 Ενεργό κέντρο.....	111
Ιβ.7 Ριβονουκλεάσες ως στόχοι για θεραπεία του καρκίνου.....	113
Ιβ.8 Αγγειογενίνη.....	114
Ιβ.9 Ηωσινοφιλική Νευροτοξίνη.....	115
Ιβ.10 Αναστολείς της RNase A.....	116
Ιβ.11 Τροποποιημένοι νουκλεοζίτες ως κυτταροστατικοί παράγοντες.....	120
Ιβ.12 Στόχοι.....	121
Ιβ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	123
Ιβ.1. Σύνθεση τριάζολο νουκλεοζιτών πυριμιδίνης καθώς και των αντίστοιχων ουριδινών.....	123
Ιβ.2. Κινητική μελέτη τριάζολο νουκλεοζιτών πυριμιδίνης και των ουριδινών τους.....	142

Πβ.3. Σύνθεση Δικέφαλων Νουκλεοζιτών της αδερίνης.....	143
Πβ.4. Κινητική μελέτη δικέφαλων τριάζολο νουκλεοζιτών.....	152
Πβ.5. Αντικαρκινική και Αντική δράση τριάζολο νουκλεοζιτών και δικέφαλων αναλόγων.....	158
Πβ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	160
Πβ.1 ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	160
Πβ.2 Σύνθεση του 2,3,5-τρις- <i>O</i> -ακετυλο-β-D-ριβοφουρανοζυλαζιδίου (29).....	163
Πβ.3 Σύνθεση της <i>N</i> -1-προπάργυλο ουρακίλης, θυμίνης, 5- βρωμοουρακίλης, 5-χλωροουρακίλης και 5-φθοροουρακίλης (30a-e).....	164
<i>N</i> -1-Προπάργυλο ουρακίλη (30a).....	164
<i>N</i> -1-Προπάργυλο θυμίνη (30b).....	164
<i>N</i> -1-Προπάργυλο 5-βρωμοουρακίλη (30c).....	165
<i>N</i> -1-Προπάργυλο 5-χλωροουρακίλη (30d).....	165
<i>N</i> -1-Προπάργυλο 5-φθοροουρακίλη (30e).....	166
Πβ.4. Σύνθεση των προστατευμένων τριάζολο νουκλεοζιτών 31a-e.....	166
1-[(2',3',5'-Τρις- <i>O</i> -ακετυλο-β-D-ριβοφουρανοζυλο)-1,2,3-τριαζολ-4- υλο]ουρακίλη (31a).....	166
1-[(2',3',5'-Τρις- <i>O</i> -ακετυλο-β-D-ριβοφουρανοζυλο)-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]θυμίνη (31b).....	167
1-[(2',3',5'-Τρις- <i>O</i> -ακετυλο-β-D-ριβοφουρανοζυλο)-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]5- βρωμοουρακίλη (31c).....	168
1-[(2',3',5'-Τρις- <i>O</i> -ακετυλο-β-D-ριβοφουρανοζυλο)-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]5- χλωροουρακίλη (31d).....	169
1-[(2',3',5'-Τρις- <i>O</i> -ακετυλο-β-D-ριβοφουρανοζυλο)-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]5- φθοροουρακίλη (31e).....	170
Πβ.5. Σύνθεση αποπροστατευμένων τριάζολο νουκλεοζιτών 32a-e.....	171
1-[(β-D-Ριβοφουρανοζυλο)-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]ουρακίλη (32a).....	171
1-[(β-D-Ριβοφουρανοζυλο)-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]θυμίνη (32b).....	172
1-[(β-D-Ριβοφουρανοζυλο)-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]5-βρωμοουρακίλη (32c).....	173
1-[(β-D-Ριβοφουρανοζυλο)-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]5-χλωροουρακίλη (32d).....	174
1-[(β-D-Ριβοφουρανοζυλο)-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]5-φθοροουρακίλη (32e).....	174
Πβ.6. Σύνθεση των ουριδινών 35a-e.....	175
1-(2',3',5'-Τρις- <i>O</i> -ακετυλο-β-D-ριβοφουρανοζυλο)ουρακίλη (35a).....	175
1-(2',3',5'-Τρις- <i>O</i> -ακετυλο-β-D-ριβοφουρανοζυλο)θυμίνη (35b).....	176

<i>1-(2',3',5'-Τρις-Ο-ακετυλο-β-D-ριβοφουρανοζυλο)5-βρωμοουρακίλη (35c)</i> ...	177
<i>1-(2',3',5'-Τρις-Ο-ακετυλο-β-D-ριβοφουρανοζυλο)5-χλωροουρακίλη (35d)</i> ...	177
<i>1-(2',3',5'-Τρις-Ο-ακετυλο-β-D-ριβοφουρανοζυλο)5-φθοροουρακίλη (35e)</i> ...	178
III.β.7. Σύνθεση των ουριδινών 36a-e	178
<i>1-β-D-Ριβοφουρανοζυλο-ουρακίλη (36a)</i>	178
<i>1-β-D-Ριβοφουρανοζυλο-θυμίνη (36b)</i>	179
<i>1-β-D-Ριβοφουρανοζυλο)-5-βρωμοουρακίλη (36c)</i>	180
<i>1-β-D-Ριβοφουρανοζυλο-5-χλωροουρακίλη (36d)</i>	180
<i>1-β-D-Ριβοφουρανοζυλο-5-φθοροουρακίλη (36e)</i>	181
III.β.8. Σύνθεση της 3-αζιδο-3-δεοξυ-1,2:5,6-δισ-Ο-ισοπροπιλιδενο-α-D-ριβοφουρανόζης (39)	182
III.β.9. Σύνθεση της 3-αζιδο-3-δεοξυ-1,2-Ο-ισοπροπιλιδενο-α-D-ριβοφουρανόζης (40)	182
III.β.10. Σύνθεση της 5-Ο-ακετυλο-3-αζιδο-3-δεοξυ-1,2-Ο-ισοπροπιλιδενο-α-D-ριβοφουρανόζης (41)	183
III.β.11. Σύνθεση της 1,2,5-τρις-Ο-ακετυλο-3-αζιδο-3-δεοξυ-D-ριβοφουρανόζης (42)	184
III.β.12. Σύνθεση των ριβοφουρανονουκλεοζιτών 43a-c, 47a,b	184
<i>1-(2',5'-Δις-Ο-ακετυλο-3'-αζιδο-3'-δεοξυ-β-D-ριβοφουρανοζυλο)ουρακίλη (43a)</i>	184
<i>1-(2',5'-Δις-Ο-ακετυλο-3'-αζιδο-3'-δεοξυ-β-D-ριβοφουρανοζυλο)θυμίνη (43b)</i>	185
<i>1-(2',5'-Δις-Ο-ακετυλο-3'-αζιδο-3'-δεοξυ-β-D-ριβοφουρανοζυλο)5-φθοροουρακίλη (43c)</i>	186
<i>1-(2',5'-Δις-Ο-ακετυλο-3'-αζιδο-3'-δεοξυ-β-D-ριβοφουρανοζυλο)N⁶-βενζοϋλοαδενίνη (47a)</i>	187
<i>1-(2',5'-Δις-Ο-ακετυλο-3'-αζιδο-3'-δεοξυ-β-D-ριβοφουρανοζυλο)N⁶-ακετυλοαδενίνη (47b)</i>	187
III.β.10. Σύνθεση της N-9-προπάργυλο αδενίνης (44) και της N-1-προπάργυλο 4-ακετυλοκυτοσίνης (48)	188
<i>N-9-Προπάργυλο αδενίνη (44)</i>	188
<i>N-1-Προπάργυλο 4-ακετυλοκυτοσίνη (48)</i>	188
III.β.11. Σύνθεση των προστατευμένων δικέφαλων νουκλεοζιτών 45a-c, 49a-c και 51a,b	189

<i>1-[2',5'-Δις-Ο-ακετυλο-3'-[4-{(αδενιν-9-υλο)μεθυλο]-1,2,3-τριαζολ-1-υλο]-β-D-ριβοφουρανοζυλο]ουρακίλη (45a)</i>	189
<i>1-[2',5'-Δις-Ο-ακετυλο-3'-[4-{(αδενιν-9-υλο)μέθυλο]-1,2,3-τριαζολ-1-υλο]-β-D-ριβοφουρανοζυλο]θυμίνη (45b)</i>	190
<i>1-[2',5'-Δις-Ο-ακετυλο-3'-[4-{(αδενιν-9-υλο)μεθυλο]-1,2,3-τριαζολ-1-υλο]-β-D-ριβοφουρανοζυλο]5-φθοροουρακίλη (45c)</i>	190
<i>9-[2',5'-Δις-Ο-ακετυλο-3'-[4-{(ουρακιλ-1-υλο)μεθυλο]-1,2,3-τριαζολ-1-υλο]-β-D-ριβοφουρανοζυλο]N⁶-βενζοϋλοαδενίνη (49a)</i>	191
<i>9-[2',5'-Δις-Ο-ακετυλο-3'-[4-{(θυμιν-1-υλο)μεθυλο]-1,2,3-τριαζολ-1-υλο]-β-D-ριβοφουρανοζυλο]N⁶-βενζοϋλοαδενίνη (49b)</i>	192
<i>9-[2',5'-Δις-Ο-ακετυλο-3'-[4-{(N⁴-ακετυλοκυτοσιν-1-υλο)μεθυλο]-1,2,3-τριαζολ-1-υλο]-β-D-ριβοφουρανοζυλο]N⁶-βενζοϋλοαδενίνη (49c)</i>	193
<i>9-[2',5'-Δις-Ο-ακετυλο-3'-[4-{(ουρακιλ-1-υλο)μεθυλο]-1,2,3-τριαζολ-1-υλο]-β-D-ριβοφουρανοζυλο]N⁶-ακετυλοαδενίνη (51a)</i>	194
<i>9-[2',5'-Δις-Ο-ακετυλο-3'-[4-{(θυμιν-1-υλο)μεθυλο]-1,2,3-τριαζολ-1-υλο]-β-D-ριβοφουρανοζυλο]N⁶-ακετυλοαδενίνη (51b)</i>	195
III.β.12. Σύνθεση των αποπροστατευμένων δικέφαλων νουκλεοζιτών 46a-c, 50a-c και 52a,b	196
<i>1-[3'-[4-{(Αδενιν-9-υλο)μεθυλο]-1,2,3-τριαζολ-1-υλο]-β-D-ριβοφουρανοζυλο]ουρακίλη (46a)</i>	196
<i>1-[3'-[4-{(Αδενιν-9-υλο)μεθυλο]-1,2,3-τριαζολ-1-υλο]-β-D-ριβοφουρανοζυλο]θυμίνη (46b)</i>	197
<i>1-[3'-[4-{(Αδενιν-9-υλο)μεθυλο]-1,2,3-τριαζολ-1-υλο]-β-D-ριβοφουρανοζυλο]5-φθοροουρακίλη (46c)</i>	198
<i>9-[3'-[4-{(Ουρακιλ-1-υλο)μεθυλο]-1,2,3-τριαζολ-1-υλο]-β-D-ριβοφουρανοζυλο]N⁶-βενζοϋλοαδενίνη (50a)</i>	199
<i>9-[3'-[4-{(Θυμιν-1-υλο)μεθυλο]-1,2,3-τριαζολ-1-υλο]-β-D-ριβοφουρανοζυλο]N⁶-βενζοϋλοαδενίνη (50b)</i>	200
<i>9-[3'-[4-{(Κυτοσιν-1-υλο)μεθυλο]-1,2,3-τριαζολ-1-υλο]-β-D-ριβοφουρανοζυλο]αδενίνη (50c)</i>	201
<i>9-[3'-[4-{(Ουρακιλ-1-υλο)μεθυλο]-1,2,3-τριαζολ-1-υλο]-β-D-ριβοφουρανοζυλο]αδενίνη (52a)</i>	202
<i>9-[3'-[4-{(Θυμιν-1-υλο)μεθυλο]-1,2,3-τριαζολ-1-υλο]-β-D-ριβοφουρανοζυλο]αδενίνη (52b)</i>	203
IV. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	205

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	207
ABSTRACT.....	215
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ-ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ.....	216

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Θεραπευτικές προσεγγίσεις για το ΣΔ τύπου II και οι παρενέργειές τους.

Πίνακας 2: *N*-ακυλο-β-*D*-γλυκοπυρανοζύλο μονοαμίδια δικαρβοξυλικών οξέων.

Πίνακας 3: Ανάλογα του *N*-ακυλο-β-*D*-γλυκοπυρανοζύλο οξαμικού οξέος ως αναστολείς της GP.

Πίνακας 4: *N*-ακυλο-*N'*-β-*D*-γλυκοπυρανοζυλουρίες ως αναστολείς της RMGPb.

Πίνακας 5: Δεσμοί υδρογόνου των *N*-ακυλο-β-*D*-γλυκοπυρανοζυλαμινών (**20a-f**) με τα αμινοξέα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου στην κρυσταλλική μορφή.

Πίνακας 6: Αποτελέσματα κινητικής μελέτης *N*-ακυλο-β-*D*-γλυκοπυρανοζυλαμινών (**20a-f**).

Πίνακας 7: Αποτελέσματα κινητικής μελέτης *N*-ακυλο-*N'*-β-*D*-γλυκοπυρανοζυλουριών (**23a,d**).

Πίνακας 8: Αντικαρκινική δράση προστατευμένων και αποπροστατευμένων *N*-ακυλο-β-*D*-γλυκοπυρανοζυλαμινών (**19a-f**, **20a-f**) και *N*-ακυλο-*N'*-β-*D*-γλυκοπυρανοζυλουριών (**22a-f**, **23a-f**).

Πίνακας 9: Κυτταροτοξική δράση της προστατευμένης *N*-ακυλο-*N'*-β-*D*-γλυκοπυρανοζυλουρίας **22f** σε κύτταρα Vero.

Πίνακας 10: Οι σταθερές αναστολής των δινουκλεοτιδίων πουρίνης πυριμιδίνης (**24-28**) σε pH 5 και 7 αντίστοιχα.

Πίνακας 11: Οι σταθερές αναστολής των τριάζολο νουκλεοζιτών **32a-e** και των αντίστοιχων ουριδινών **36a-e**.

Πίνακας 12: Οι σταθερές αναστολής των δικέφαλων νουκλεοζιτών της αδενίνης **46a-c**, **50a-c** και **52a,b** αλλά και των νουκλεοζιτών **32a,d,e** και **36a,d,e** με και χωρίς τριαζολικό δακτύλιο έναντι της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης και της RNase A, αντίστοιχα.

Πίνακας 13: Αντικαρκινική δράση των τριάζολο νουκλεοζιτών **32a-e** και των δικέφαλων νουκλεοζιτών της αδενίνης **46a-c**, **50a-c** και **52a,b**.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Η δομή του γλυκογόνου.

Εικόνα 2: Αποικοδόμηση του γλυκογόνου.

Εικόνα 3: Μηχανισμός δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

Εικόνα 4: Ο δεσμός της βάσης Schiff της PLP.

Εικόνα 5: Οι δομές της φωσφορυλάσης a και b.

Εικόνα 6: Φωσφορυλάση και ρύθμισή της.

Εικόνα 7: Στερεοδιάγραμμα του τελικού μοντέλου των *N*-ακυλο- β -D-γλυκοπυρανοζυλαμινών (**20a-f**) και του ηλεκτρονιακού χάρτη διαφοράς 2Fo-Fc.

Εικόνα 8: Στερεοσκοπική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων των *N*-ακυλο- β -D-γλυκοπυρανοζυλαμινών (**20a-f**) με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου.

Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση του μεταβολισμού του RNA στα κύτταρα των θηλαστικών.

Εικόνα 10: Σχηματικό διάγραμμα της δομής της RNase A.

Εικόνα 11: Σχηματικό διάγραμμα του ενεργού κέντρου της RNase A.

Εικόνα 12: (A) Ο μηχανισμός της αντίδρασης τρανσφωσφορυλίωσης που καταλύεται από την RNase A. (B) Ο μηχανισμός της αντίδρασης υδρόλυσης που καταλύει το ένζυμο.

Εικόνα 13: Σχηματικό διάγραμμα του RI με τη ριβονουκλεάση.

Εικόνα 14: 5'-διφωσφοαδενοσίνη ως αναστολέας της RNase A.

Εικόνα 15: Δινουκλεοτίδια πουρίνης-πυριμιδίνης ως αναστολείς της RNase A.

Ια. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ια.1 Σακχαρώδης Διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) αποτελεί μια από τις σοβαρότερες ορμονικές διαταραχές και εκδηλώνεται όταν διαταραχθεί η ομοιόσταση της γλυκόζης στο αίμα. Χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα γλυκόζης στον ορό των ασθενών και προκαλεί βλάβη σε αρκετούς ιστούς και όργανα (π.χ. νεφρά, νεύρα) εξαιτίας της αυξημένης πρωτεϊνικής γλυκοζυλίωσης, της ελαττωματικής έκκρισης ινσουλίνης -του πολυπεπτιδίου που ρυθμίζει τα επίπεδα της γλυκόζης στους υγιείς ανθρώπους- την αυξημένη ινσουλινοαντοχή, την απόπτωση αλλά και το οξειδωτικό στρες.

Ο ΣΔ διακρίνεται σε δύο τύπους: α) το διαβήτη τύπου I κατά τον οποίο το πάγκρεας παράγει ελάχιστη ή καθόλου ινσουλίνη και β) το διαβήτη τύπου II κατά τον οποίο η ινσουλίνη που παράγεται δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά από τον οργανισμό. Και στις δύο περιπτώσεις το τελικό αποτέλεσμα είναι η υπεργλυκαιμία. Παρόλο που το ακριβές βιολογικό-βιοχημικό υπόβαθρο που προκαλεί το ΣΔ δεν έχει αποσαφηνιστεί, από τη στιγμή που όλα τα συμπτώματα προκύπτουν από τα υψηλά επίπεδα της γλυκόζης, οι μέχρι τώρα θεραπείες στοχεύουν στη διατήρηση σταθερής συγκέντρωσης σακχάρου, πλησίον των φυσιολογικών επιπέδων. Οι θεραπείες όμως εκτός από τις επιπλοκές της νόσου, μειώνουν και το προσδόκιμο ζωής των ασθενών από 5 έως 14 έτη, ανάλογα με τον τύπο του διαβήτη (Seshasai *et al.*, 2011).

Σύμφωνα με τη Διεθνή Ομοσπονδία για το διαβήτη (International Diabetes Federation, IDF) έχουν καταμετρηθεί 194 εκ. ασθενείς με ΣΔ παγκοσμίως, αριθμός που προβλέπεται να αυξηθεί στα 333 εκ. ως το 2025 ως αποτέλεσμα του σύγχρονου τρόπου ζωής και της γήρανσης του πληθυσμού. Το μεγαλύτερο ποσοστό (90-95 %) των περιστατικών διαβήτη ανήκει στο διαβήτη τύπου II (Moller, 2001).

Ο διαβήτης τύπου II είναι μια χρόνια, σταδιακά εξελισσόμενη νόσος, η οποία εμφανίζεται κυρίως σε άτομα μεγάλης ηλικίας, αν και δεν αποκλείεται η εμφάνισή της και σε άτομα νεαρότερης ηλικίας. Είναι μια πολυπαραγοντική νόσος στην οποία καθοριστικό ρόλο διαδραματίζει η γενετική προδιάθεση, η παχυσαρκία, ο καθιστικός τρόπος ζωής αλλά και το άγχος. Σε αντίθεση με το διαβήτη τύπου I όπου η ινσουλίνη απουσιάζει εντελώς, στο διαβήτη τύπου II η παραγόμενη ινσουλίνη δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά με αποτέλεσμα τον πλεονασμό της γλυκόζης στο αίμα. Εφόσον η επιβίωση του ασθενούς δεν εξαρτάται από την εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης ονομάζεται και μη ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης (Non-Insulin

Dependent Diabetes Mellitus, NIDDM). Συνήθως εξελίσσεται αργά, με τα συμπτώματα (π.χ. θολή όραση, δίψα, απώλεια βάρους, συχνοουρία κ.α.) και τις επιπλοκές της νόσου (π.χ. έμφραγμα, εγκεφαλικό επεισόδιο, ακρωτηριασμός άκρων κ.ά.) να αναπτύσσονται με την πάροδο του χρόνου. Συχνά η απουσία συμπτωμάτων δυσχεραίνει τη διαφορική διάγνωση της νόσου, γεγονός που καθιστά την πρόγνωση της αρκετά δύσκολη. Η ίαση των ασθενών απαιτεί πολύπλοκες θεραπείες, οι οποίες περιλαμβάνουν συστηματική φυσική δραστηριότητα και ειδική διατροφή εκτός από την πρόσληψη υπογλυκαιμικών παραγόντων.

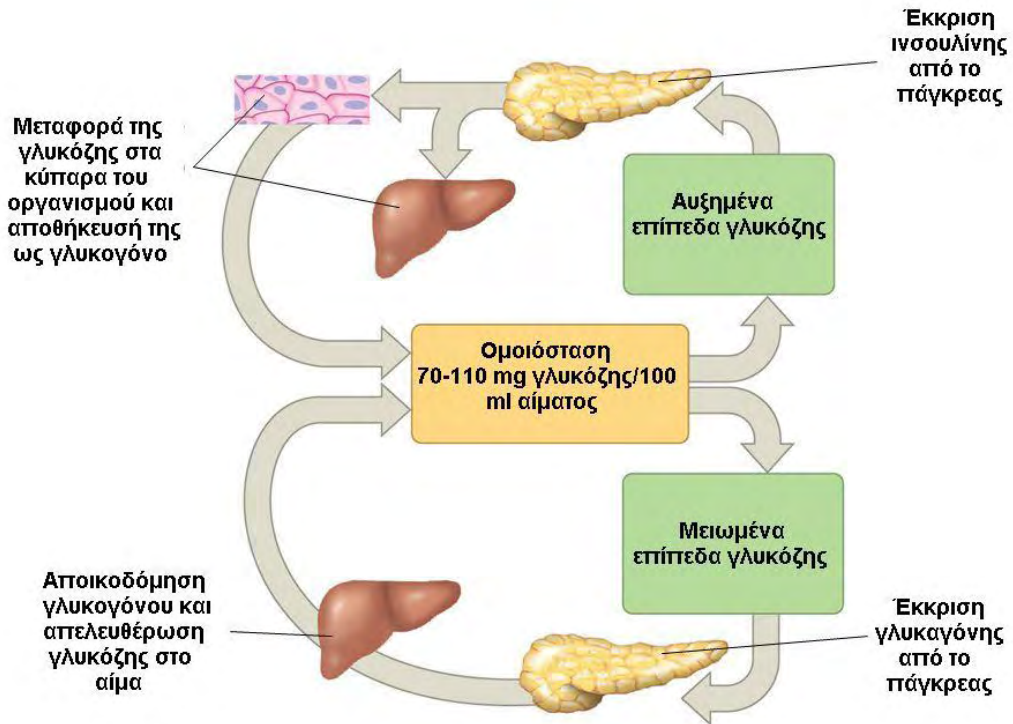
Για το διαβήτη τύπου II χρησιμοποιούνται διάφοροι υπογλυκαιμικοί παράγοντες, οι οποίοι ωστόσο εμφανίζουν αρκετές παρενέργειες (Πίνακας 1).

Υπογλυκαιμικός παράγοντας	Μοριακός στόχος	Περιοχή δράσης	Παρενέργειες
Μεφορμίνη	Άγνωστος	Ήπαρ, έντερο, πάγκρεας	Διάρροια, ναυτία, μειωμένα επίπεδα βιταμίνης Β12
Σουλφονουλουρίες	Υποδοχέας σουλφονουλουριών	Πάγκρεας	Πρόσληψη βάρους, υπογλυκαιμία, υπερινσουλιναϊμία, αρρυθμία
Πεπτίδια που ομοιάζουν με το γλυκογόνο	Υποδοχέας πεπτιδίων που ομοιάζουν με το γλυκογόνο	Πάγκρεας	Ναυτία, διάρροια, έμετος
Αναστολείς μεταφοράς γλυκόζης (SGLT2)	Χαμηλής συγγένειας, μεταφοράς γλυκόζης (SGLT2)	Νεφροί	Ναυτία, λοιμώξεις ουροποιητικού
Ινσουλίνη	Υποδοχέας ινσουλίνης	Ήπαρ, μύες	Πρόσληψη βάρους, υπογλυκαιμία
Αναστολείς α-γλυκοσιδάσης	α-γλυκοσιδάσης	Πάγκρεας, λεπτό έντερο	Μετεωρισμός, φούσκωμα

Πίνακας 1. Θεραπευτικές προσεγγίσεις για το ΣΔ τύπου II και οι παρενέργειές τους. (Moller, 2001; Israili, 2011)

Ια.2 Μεταβολισμός του γλυκογόνου

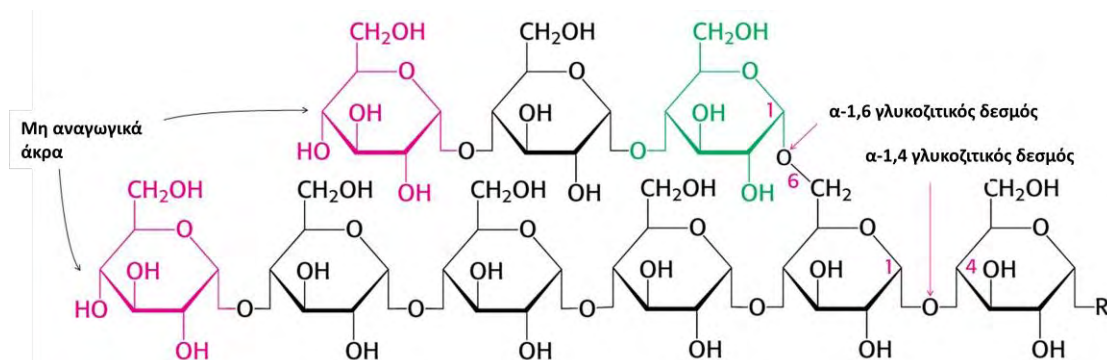
Το ήπαρ αποτελεί το κύριο ρυθμιστικό όργανο των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα, παράγοντας γλυκόζη μέσω δύο οδών: τη γλυκονεογένεση (de novo σύνθεση γλυκόζης) και τη γλυκογονόλυση (καταβολισμός του γλυκογόνου). Το 70% περίπου της συνολικής παραγωγής ενέργειας προέρχεται από τη γλυκογονόλυση. Η ρύθμιση της γλυκόζης στο αίμα από το ήπαρ συνοψίζεται στο κάτωθι σχήμα (Σχήμα 1):



Σχήμα 1. Ρύθμιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα. Η υψηλή συγκέντρωση σακχάρου στο αίμα προκαλεί απελευθέρωση ινσουλίνης στο ήπαρ ώστε να συντεθεί γλυκογόνο μειώνοντας με τον τρόπο αυτό το σάκχαρο στο αίμα. Η χαμηλή συγκέντρωση σακχάρου στο αίμα από την άλλη, οδηγεί σε απελευθέρωση γλυκαγόνης από το πάγκρεας, η οποία προσλαμβάνεται από το ήπαρ. Στο ήπαρ το γλυκογόνο αποικοδομείται με αποτέλεσμα την παραγωγή γλυκόζης. Η γλυκόζη μεταφέρεται στη συνέχεια στο αίμα αυξάνοντας τελικά τη συγκέντρωση του σακχάρου. (Reece, 2011)

Το γλυκογόνο (Εικόνα 1), ένα μεγάλο διακλαδισμένο πολυμερές αποτελούμενο από μόρια α-D-γλυκόζης, αποτελεί την κύρια πηγή αποθήκευσης γλυκόζης στα θηλαστικά. Τα μόρια της γλυκόζης συνδέονται μεταξύ τους με α-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς ενώ υπάρχουν και διακλαδώσεις με α-1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς, ανά 10

περίπου μόρια γλυκόζης. Τα κύρια ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό του γλυκογόνου είναι η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (glycogen phosphorylase, GP) και η συνθάση του γλυκογόνου (glycogen synthase, GS). Ο ρυθμός σύνθεσης και αποικοδόμησης του γλυκογόνου εξαρτάται αποκλειστικά από τα επίπεδα του σακχάρου στο αίμα. Η δράση των ενζύμων ελέγχεται τόσο από φωσφορυλίωση καθώς και από αλλοστερικούς ρυθμιστές συμπεριλαμβανομένης της γλυκόζης, της 6-φωσφορικής γλυκόζης, του cAMP, του ασβεστίου καθώς και από ορμόνες.



Εικόνα 1. Η δομή του γλυκογόνου. (Stryer, 1997)

Η γλυκόζη που συντίθεται *de novo* από το γαλακτικό και τα αμινοξέα (γλυκονεογένεση) ανακυκλώνεται στο μεταβολισμό του γλυκογόνου και επί της ουσίας δε συνεισφέρει στα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Αυτός είναι ο κύριος λόγος, εξαιτίας του οποίου η αναστολή της ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου μπορεί να οδηγήσει σε καταστολή της παραγωγής γλυκόζης μέσω και των δύο πορειών.

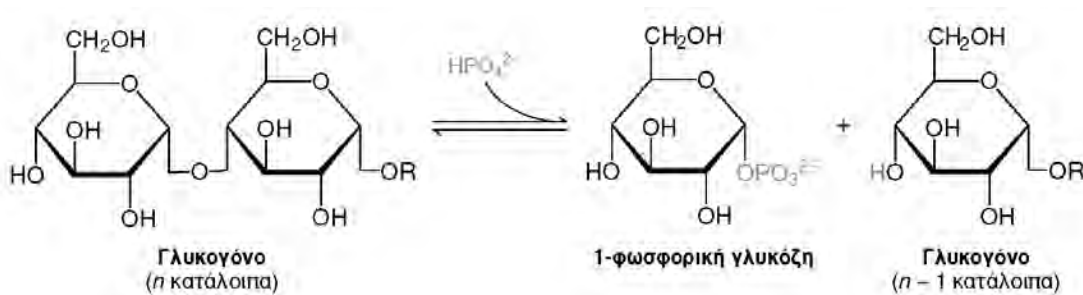
1α.3 Αποικοδόμηση γλυκογόνου

Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου, ως μεταβολική οδός, μελετήθηκε διεξοδικά από τους Carl και Gerty Cori οι οποίοι απομόνωσαν το ένζυμο φωσφορυλάση γλυκογόνου (GP), το ένζυμο κλειδί σε όλη την πορεία. (Cori & Cori, 1936)

Η GP υφίσταται σε δύο μορφές *in vivo*, την ενεργή φωσφορυλιωμένη μορφή (GP_a) και την ανενεργή μη φωσφορυλιωμένη μορφή (GP_b). Η φωσφορυλίωση συνδέεται με ενεργοποίηση της GP και απενεργοποίηση της συνθάσης του γλυκογόνου (GS) ενώ η αποφωσφορυλίωση λαμβάνει χώρα από την αντίστοιχη πρωτεϊνική φωσφατάση.

Η GP διασπά το υπόστρωμά της με την προσθήκη ενός ορθοφωσφορικού ιόντος (Pi) –φωσφορόλυση, Εικόνα 2– αποδίδοντας 1-φωσφορική γλυκόζη. Η διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης ξεκινά από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου γλυκογόνου και σταματά τέσσερις μονάδες γλυκόζης πριν από σημείο διακλάδωσης. Για την απομάκρυνση των τεσσάρων τελευταίων μορίων απαιτείται η δράση ενός ενζύμου αποδιακλάδωσης, της γλυκοζιδάση α-1,6, καθώς και μιας μεταφοράσης. Ο γλυκοζιτικός δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα (C-1) ενός καταλοίπου γλυκόζης και του τέταρτου άνθρακα (C-4) του γειτονικού καταλοίπου, ενώ η διαμόρφωση α του πρώτου άνθρακα διατηρείται. (Stryer, 1997)

Η αντίδραση συνολικά συνοψίζεται ως εξής:



Εικόνα 2. Αποικοδόμηση γλυκογόνου. (Stryer, 1997)

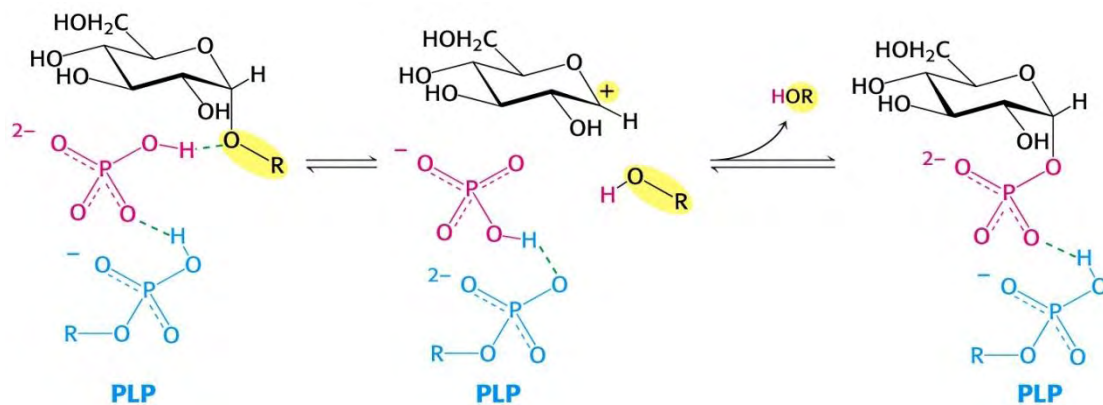
Η αντίδραση που καταλύεται από τη GP είναι αντιστρεπτή *in vitro* όταν το pH είναι 6.8 και ο λόγος της ισορροπίας των ορθοφωσφορικών ιόντων προς την 1-φωσφορική γλυκόζη είναι 3.6.

Η φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου πλεονεκτεί ενεργειακά, γιατί το ελευθερωμένο σάκχαρο είναι φωσφορυλιωμένο. Αντίθετα, μια υδρολυτική διάσπαση θα έδινε ένα σάκχαρο (γλυκόζη), το οποίο θα απαιτούσε μια φωσφορυλίωση με την κατανάλωση ενός μορίου ATP για να εισέλθει στη γλυκολυτική πορεία. Ένα πρόσθετο πλεονέκτημα της φωσφορολυτικής διάσπασης για τα κύτταρα των μυών είναι το γεγονός ότι η 1-φωσφορική γλυκόζη ιονίζεται, υπό φυσιολογικές συνθήκες και δεν είναι δυνατόν να υποστεί διάχυση προς το εξωτερικό του κυττάρου, σε αντίθεση με τη γλυκόζη. (Stryer, 1997)

Ια.4 Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου

Η ιδιαίτερη πρόκληση που αντιμετωπίζει η GP είναι να διασπάσει το γλυκογόνο φωσφορολυτικά και όχι υδρολυτικά, με αποτέλεσμα την εξοικονόμηση ATP που απαιτείται για τη φωσφορυλίωση της ελεύθερης γλυκόζης. Η διάσπαση αυτή χρειάζεται τον αποκλεισμό του νερού από το ενεργό κέντρο. (Stryer 1997)

Τόσο το υπόστρωμα της, γλυκογόνο, όσο και το προϊόν, η 1-φωσφορική γλυκόζη, έχουν διαμόρφωση α στον C-1. Αυτή η διατήρηση της διαμόρφωσης είναι ένα πολύτιμο στοιχείο για τον καταλυτικό μηχανισμό της GP. Μία απευθείας προσβολή του φωσφορικού οξέος στον C-1 ενός σακχάρου θα ανέστρεφε τη διαμόρφωση αυτού του άνθρακα. Το γεγονός ότι η σχηματιζόμενη 1-φωσφορική γλυκόζη έχει διαμόρφωση α αντί για β , δείχνει ότι απαιτείται ένας άρτιος αριθμός βημάτων (συνήθως δύο). Το πιθανότερο ενδεχόμενο είναι ένα ενδιάμεσο καρβοκατιόν. (Εικόνα 3, Stryer, 1997)



Εικόνα 3. Μηχανισμός δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η φωσφορική πυριδοξάλη (PLP) είναι συνδεδεμένη με μια βάση του Schiff στην ϵ -NH₂ της Lys680 του καταλυτικού κέντρου. Τα προϊόντα είναι η 1-φωσφορική α -D-γλυκόζη και η HOR, η αλυσίδα του γλυκογόνου με ένα κατάλοιπο λιγότερο. (Stryer, 1997)

Μια δεύτερη ένδειξη για την κατανόηση του καταλυτικού μηχανισμού της GP, είναι η απαίτηση για την ύπαρξη της 5'-φωσφορικής πυριδοξίνης (PLP), ενός παραγώγου της πυριδοξίνης (βιταμίνη B₆). Η αλδεϋδική ομάδα αυτού του συνενζύμου σχηματίζει μια βάση του Schiff με μια πλευρική αλυσίδα συγκεκριμένης λυσίνης του ενζύμου (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Ο δεσμός της βάσης Schiff της PLP.

Η βάση Schiff που σχηματίζει η PLP με τη Lys680 στο ενεργό κέντρο της φωσφορυλάσης. (Stryer, 1997)

Δομικές μελέτες έδειξαν ότι η αντιδρώσα ορθοφωσφορική ομάδα βρίσκεται μεταξύ της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP και του υποστρώματος της γλυκογόνου. Η 5'-φωσφορική ομάδα δρα σε συνδυασμό με το ορθοφωσφορικό, πιθανότατα χρησιμεύοντας ως δότης και δέκτης πρωτονίων (δηλαδή ως ένας γενικός οξεοβασικός καταλύτης). Το ορθοφωσφορικό δίνει ένα πρωτόνιο στο τέταρτο οξυγόνο (O-4) της αποχωρούσας αλυσίδας γλυκογόνου, και συγχρόνως αποκτά ένα πρωτόνιο από την PLP. Το ενδιάμεσο καρβοκατιόν που σχηματίζεται, προσβάλλεται από το ορθοφωσφορικό ανιόν σχηματίζοντας την α -1-φωσφορική γλυκόζη. Η απαίτηση να αποκλείεται το νερό από το ενεργό κέντρο δικαιολογεί τον ειδικό ρόλο της PLP στη διευκόλυνση της φωσφορολυτικής διάσπασης (Stryer, 1997).

1α.5 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

Η GP (EC 2.4.1.1) αποτελεί το ένζυμο-κλειδί στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου για την παραγωγή της 1-φωσφορικής γλυκόζης στο ήπαρ, τους μύες και τον εγκέφαλο. Έτσι, η αναστολή της αποτελεί μια σύγχρονη προσέγγιση για την καταπολέμηση του διαβήτη τύπου 2.

Ανάλογα με τον ιστό στον οποίο εντοπίζεται, διακρίνεται σε τρεις ισομορφές που εμφανίζουν ομολογία κατά 80% (φωσφορυλάση ήπατος, φωσφορυλάση μύος, φωσφορυλάση του εγκεφάλου). Η δομή και η λειτουργία των τριών ισοενζύμων είναι όμοια, τόσο στην ενεργή όσο και την ανενεργή μορφή, και έτσι είναι δυνατή η μελέτη

της βιοδραστικότητας πιθανών αναστολέων σε ένα μόνο ισοένζυμο με εφαρμογή των αποτελεσμάτων στα υπόλοιπα. Ως μοντέλο συνήθως χρησιμοποιείται η μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου από κόνικλους (RMGP_a ή RMGP_b) ενώ ισχυρά βιοδραστικοί αναστολείς μελετώνται και με την ανασυνδυασμένη ανθρώπινη ηπατική φωσφορυλάση στην φωσφορυλιωμένη της μορφή (rHLGP_a).

Το συγκεκριμένο ένζυμο είναι ένα διμερές αποτελούμενο από δύο πανομοιότυπες υπομονάδες, καθεμία με μοριακό βάρος ίσο με 97,444 Da (842 αμινοξέα). Κάθε μονομερές περιέχει ένα μόριο φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP), ως συνένζυμο, συνδεδεμένο με μια βάση του Schiff στη Lys 680 της κάθε υπομονάδας. Η κατάλυση της φωσφορόλυσης του γλυκογόνου από τη GP γίνεται στο καταλυτικό της κέντρο, το οποίο εντοπίζεται σε μια κοιλότητα που δημιουργείται μεταξύ της αμινο-τελικής και της καρβοξυ-τελικής περιοχής κάθε υπομονάδας. Στο ενεργό κέντρο, τα υποστρώματα γλυκογόνο και ορθοφωσφορικό ανιόν έρχονται σε γειτνίαση ώστε να επιτευχθεί η φωσφορόλυση του γλυκογόνου κι όχι η υδρόλυσή του, αποκλείοντας τα μόρια ύδατος.

Το ένζυμο ακολουθεί το μοντέλο των Monod-Wyman-Changeux για τα αλλοστερικά ένζυμα. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, η «κατάσταση T» ενός αλλοστερικού ενζύμου έχει μειωμένη δραστηριότητα και συγγένεια για το υπόστρωμα ενώ σε αντίθεση η «κατάσταση R» εμφανίζει αυξημένη δραστηριότητα και συγγένεια γι' αυτό. (Monod *et al.*, 1963; Monod *et al.*, 1965)

1α.6 Αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις

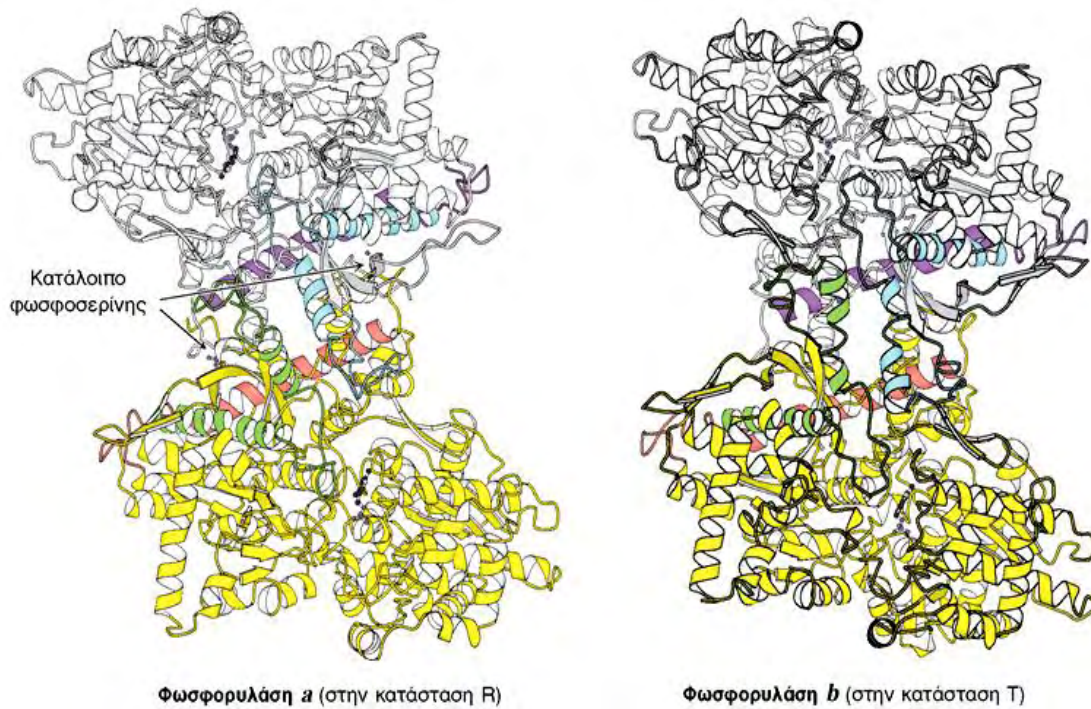
Ο συντονισμός των ενζυμικών μηχανισμών και των αλληλεπιδράσεων που κατευθύνουν τις διάφορες διεργασίες γίνεται με τη βοήθεια ρυθμιστικών ενζύμων, η λειτουργική δομή των οποίων τους επιτρέπει να προσαρμόζουν την καταλυτική τους δράση ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου. Σύμφωνα με τους Monod, Changeux και Wyman, ως αλλοστερικές χαρακτηρίζονται οι πρωτεΐνες που διαθέτουν τουλάχιστον δύο διακριτά κέντρα σύνδεσης, το καταλυτικό και το αλλοστερικό. Στο καταλυτικό κέντρο, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη βιολογική δράση της πρωτεΐνης, συνδέεται το υπόστρωμα, ενώ στο αλλοστερικό συνδέεται αντιστρεπτά και με μεγάλη εξειδίκευση ένας άλλος μεταβολίτης, ο αλλοστερικός τροποποιητής. Ο σχηματισμός του συμπλόκου ένζυμο-αλλοστερικός τροποποιητής προκαλεί μια διακριτή, αντιστρεπτή μεταβολή της μοριακής δομής της πρωτεΐνης, η οποία ονομάζεται αλλοστερική μετάπτωση. Αυτή τροποποιεί τις ιδιότητες του ενεργού κέντρου, χωρίς

να ενεργοποιεί κάποια αντίδραση που να εμπλέκει τον ίδιο τον τροποποιητή. (Monod *et al.*, 1963)

Γενικά, θεωρείται ότι η μεγάλη εκλεκτικότητα που παρουσιάζει οποιαδήποτε αλλοστερική αλληλεπίδραση απορρέει αποκλειστικά από τη συγκεκριμένη δομή του ίδιου του μορίου της πρωτεΐνης. Αυτή η δομή είναι που του επιτρέπει να υποβληθεί σε μια ιδιαίτερη, διακριτή και αντιστρεπτή αλλαγή στη διαμόρφωσή του η οποία επάγεται από τη σύνδεση του αλλοστερικού τροποποιητή. (Monod *et al.*, 1963)

Η GP αποτελεί ένα από τα πιο γνωστά παραδείγματα αλλοστερικού ενζύμου και ακολουθεί το μοντέλο των Monod, Changeux και Wyman. Έτσι, καθεμία από τις δύο μορφές της (a και b) βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργού χαλαρής κατάστασης R και μίας πολύ λίγο ενεργού τεταμένης κατάστασης T, όμως η ισορροπία για την φωσφορυλάση a ευνοεί την κατάσταση R, ενώ η ισορροπία για τη φωσφορυλάση b ευνοεί την κατάσταση T. Η μετάβαση από την κατάσταση T (φωσφορυλάση b) στην κατάσταση R (φωσφορυλάση a) συνδέεται με δομικές αλλαγές στις α -έλικες, οι οποίες μετακινούν ένα βρόχο εκτός του ενεργού κέντρου της κάθε υπομονάδας. Έτσι η κατάσταση T είναι λιγότερο ενεργή διότι το καταλυτικό κέντρο είναι μερικώς παρεμποδισμένο. Στην κατάσταση R το καταλυτικό κέντρο είναι περισσότερο προσβάσιμο και η θέση δέσμευσης για το ορθοφωσφορικό είναι καλά οργανωμένη. (Εικόνα 5, Stryer 1997)

Η μυϊκή φωσφορυλάση b είναι ενεργή μόνο παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων AMP, η οποία δεσμεύεται σε μια θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίου και σταθεροποιεί τη στερεοδιάταξη της φωσφορυλάσης b στην κατάσταση R. Η ATP δρα ως αρνητικός αλλοστερικός τελεστής ανταγωνιζόμενος την AMP, ευνοώντας έτσι την κατάσταση T. Επομένως η μετάπτωση της φωσφορυλάσης b από την κατάσταση T στην κατάσταση R και αντιστρόφως, ελέγχεται από το ενεργειακό φορτίο του μυϊκού κυττάρου (Stryer 1997). Σε φυσιολογικές συνθήκες η φωσφορυλάση b είναι ανενεργή λόγω των ανασταλτικών επιδράσεων της ATP. Αντίθετα η φωσφορυλάση a είναι πλήρως ενεργή ανεξάρτητα από τα επίπεδα της AMP και ATP. Η απουσία της φωσφατάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης στους μύες εξασφαλίζει την παραμονή της 6-φωσφορικής γλυκόζης που παράγεται από το γλυκογόνο μέσα στο κύτταρο για μετασχηματισμό σε ενέργεια.



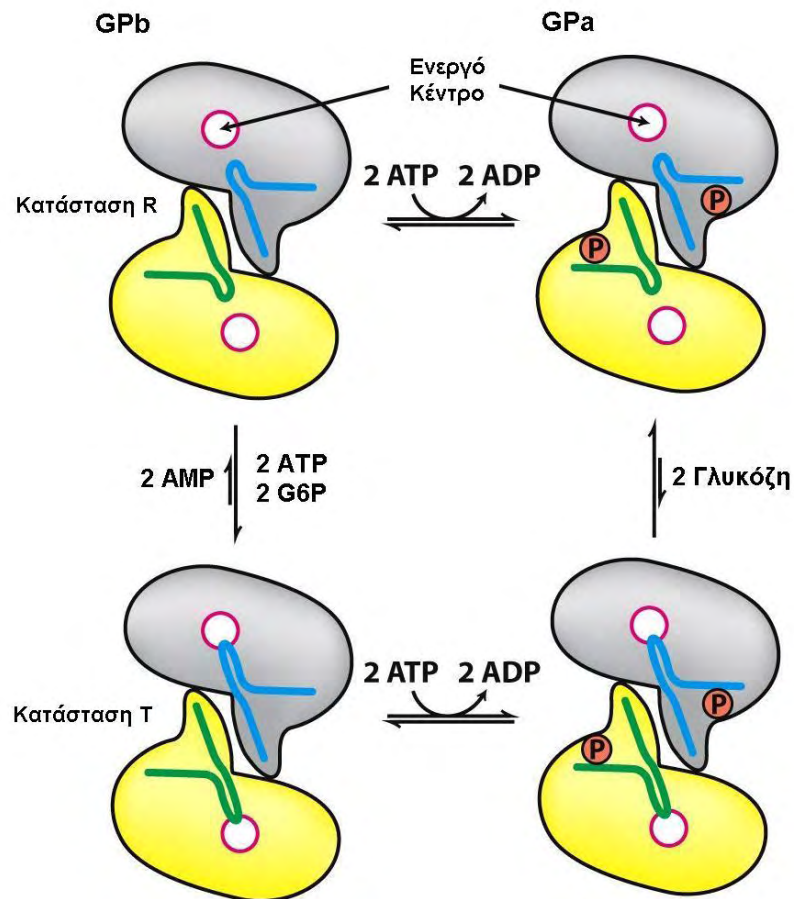
Εικόνα 5. Οι δομές της φωσφορυλάσης *a* και *b*. Η φωσφορυλάση *a* είναι φωσφορυλιωμένη στο κατάλοιπο Ser14 και στις δύο υπομονάδες. Αυτή η τροποποίηση ευνοεί τη μετάβαση στην περισσότερο ενεργή κατάσταση R. Η μια υπομονάδα φαίνεται με λευκό χρώμα και οι έλικες και οι στροφές που είναι σημαντικές για τη ρύθμιση φαίνονται με μπλε και κόκκινο. Η άλλη υπομονάδα φαίνεται με κίτρινο χρώμα με τις ρυθμιστικές δομές σε πορτοκαλί και πράσινο. Η φωσφορυλάση *b* δεν είναι φωσφορυλιωμένη και απαντάται κυρίως στην κατάσταση T. (Stryer, 1997)

Η δραστηριότητα της GP ελέγχεται και από αναστολείς και αλλοστερικούς τροποποιητές οι οποίοι συνδέονται σε ειδικά κέντρα σύνδεσης, στο καταλυτικό κέντρο, το κέντρο αναστολής και το αλλοστερικό κέντρο. Στο καταλυτικό κέντρο συνδέεται η γλυκόζη, φυσιολογικός αναστολέας, που προκαλεί αναστολή εμποδίζοντας τη σύνδεση του υποστρώματος προκαλώντας μετατόπιση της ισορροπίας προς την λιγότερο δραστήρια κατάσταση T. Στο κέντρο αναστολής (κέντρο πουρινών) συνδέονται νουκλεοζίτες και νουκλεοτίδια προκαλώντας παρεμπόδιση του καταλυτικού κέντρου μετατοπίζοντας την ισορροπία προς την κατάσταση T. Τέλος στο αλλοστερικό κέντρο συνδέεται η 6-φωσφορική γλυκόζη προκαλώντας μετατόπιση προς την κατάσταση T (Oikonomakos, 2002).

Η ανενεργός μορφή της φωσφορυλάσης *b* μπορεί να ενεργοποιηθεί από την συνεργιστική σύνδεση της AMP και κάποιων αναλόγων της (όπως η IMP) και να ανασταλεί από την ATP, την ADP, την α -D-6-φωσφορική γλυκόζη (G6P), την UDP-Glc, από πουρίνες όπως η καφεΐνη και από την D-γλυκόζη. Υψηλές συγκεντρώσεις ανιόντων καθώς και συγκεκριμένοι οργανικοί διαλύτες μπορούν *in vitro* να προκαλέσουν ενεργοποίηση του ενζύμου. Παρόμοια δράση ασκούν η πρωταμίνη, η

σπερμίνη και άλλες πολυαμίνες, τα φθοροανιόντα καθώς και τα δισθενή κατιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} . (Oikonomakos *et al.*, 1992)

Η μετατροπή της GPb σε GPa έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός ενζύμου που είναι ενεργό απουσία AMP. Η GPa επιδεικνύει μεγαλύτερη συγγένεια για το AMP συγκριτικά με την GPb (100 φορές μεγαλύτερη) αλλά μικρότερη συγγένεια για τις ATP, ADP και G6P (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Φωσφορυλάση και ρύθμισή της. (Stryer 1997)

Η ρύθμιση της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του ήπατος διαφέρει σημαντικά από εκείνη των μυών, λόγω του ρόλου του ήπατος στην ομοιοστάση της γλυκόζης για τον οργανισμό ως σύνολο. Σε αντίθεση με το ένζυμο των μυών, η ηπατική φωσφορυλάση a, αλλά όχι η b παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ανταπόκριση σε μετάπτωση από την κατάσταση T στην R. Η δέσμευση της γλυκόζης στο καταλυτικό κέντρο μετακινεί την αλλοστερική ισορροπία της φωσφορυλάσης a από την κατάσταση R στην T απενεργοποιώντας το ένζυμο. Σε αντίθεση με το μυϊκό ένζυμο, η ηπατική φωσφορυλάση δεν είναι ευαίσθητη σε ρύθμιση από την AMP διότι

το ήπαρ δεν υφίσταται τις εντυπωσιακές αλλαγές στο ενεργειακό φορτίο. (Stryer, 1997)

Κρυσταλλογραφικές μελέτες έχουν δείξει ότι δεν υπάρχει πρόσβαση στο καταλυτικό κέντρο στην επιφάνεια του ενζύμου κατά την κατάσταση T καθώς παρεμποδίζεται από το βρόχο 280s. Το κρίσιμο σημείο μετάβασης μεταξύ των δύο καταστάσεων περιλαμβάνει μετακίνηση του βρόχου 280s, η οποία επιτρέπει σε ένα κατάλοιπο Arg να εισέλθει στο καταλυτικό κέντρο. Η μετακίνηση αυτή συνδέεται με καταστροφή του σημείου πρόσδεσης του αναστολέα και επικείμενες αλλαγές στην αλληλεπίδραση των υπομονάδων του διμερούς η οποία προάγει αλλοστερικά φαινόμενα. Ένας συγκεκριμένος τελεστής μπορεί να προάγει ή να σταθεροποιεί μία από τις καταστάσεις, γεγονός που διαφαίνεται από τη δραστηριότητα του ενζύμου. (Johnson *et al.*, 1990)

1α.7 Κρυσταλλική δομή της GP και κέντρα σύνδεσης

Οι κρυσταλλικές δομές της GP_a (κατάσταση T) και της GP_b (κατάσταση R) προσδιορίστηκαν από τους Barford & Johnson κατά τη διάρκεια μελετών σύμφωνα με τις οποίες βρέθηκε ότι οι κρύσταλλοι της GP περιέχουν μεγάλα ποσοστά ύδατος (~48%), εγκλωβισμένα μέσα σε τρισδιάστατα πλέγματα διαύλων. Η διάταξη των κρυστάλλων είναι τέτοια ώστε να δημιουργούνται επιμήκεις διάυλοι διαμέτρου 20 Å κατά μήκος του άξονα του κρυστάλλου. Οι διάυλοι αυτοί επιτρέπουν σε μικρά μόρια να διαχέονται στον κρύσταλλο και να φτάνουν στα κέντρα σύνδεσής τους (Barford *et al.*, 1989). Βιοχημικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες απέδειξαν επίσης την ύπαρξη επτά κέντρων σύνδεσης:

a) Κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser 14

Το κέντρο φωσφορυλίωσης υπεύθυνο για την ομοιοπολική μετατροπή της GP από τη μορφή a στη μορφή b είναι η σερίνη 14, η οποία έχει στρατηγική θέση στην διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων. Η φωσφορυλίωση της σερίνης αυτής, οδηγεί σε αλλαγή της στερεοδιάταξης των τελευταίων 19 αμινοξέων του C-τελικού άκρου. Στην GP_b, τα αμινοξέα αυτά είναι πολύ ευκίνητα και δεν έχουν καθορισμένη δομή, ενώ στην GP_a έχουν συγκεκριμένη στερεοδιάταξη και αλληλεπιδρούν με άλλα αμινοξέα και των δύο υπομονάδων. (Stryer, 1997)

b) Αλλοστερικό κέντρο

Το αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων, 32 Å περίπου από το καταλυτικό κέντρο και περίπου 12 Å από τη Ser14. Η

τριδιάστατη δομή του συγκεκριμένου κέντρου έχει αναλυθεί και στις δυο καταστάσεις, T και R, της GP_a και της GP_b. Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες έδειξαν ότι το κέντρο αυτό αποτελείται από τρία υποκέντρα, τα οποία είναι τα εξής:

- Υπόκεντρο σύνδεσης της φωσφορικής ομάδας
- Υπόκεντρο σύνδεσης σακχάρων (ριβόζης)
- Υπόκεντρο σύνδεσης των νουκλεοτιδικών βάσεων (πουρίνης)

Οι ενώσεις που συνδέονται στο αλλοστερικό κέντρο είτε ενεργοποιούν (AMP, IMP, G1P, Pi, SO₄²⁻), είτε αναστέλλουν (ATP, ADP, G6P, UDP-Glc, NADH, β-γλυκεροφωσφορικό ιόν) τη δράση του ενζύμου. Ο αλλοστερικός ενεργοποιητής AMP όταν συνδέεται εντοπίζεται ανάμεσα στις έλικες α2 και α8 και είναι κοντά στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων (Oikonomakos *et al.*, 1992).

c) Καταλυτικό κέντρο

Το καταλυτικό κέντρο ταυτοποιήθηκε κρυσταλλογραφικά από τη σύνδεση των υποστρωμάτων (G1P, Pi) και των αναλόγων τους (UDP-Glc). Εμφανίζεται ως μια βαθιά σχισμή μεταξύ των αυτοτελών περιοχών στο κέντρο του μορίου, σε απόσταση 15 Å από την επιφάνεια περίπου. Πολύ κοντά στο καταλυτικό κέντρο βρίσκεται το συνένζυμο PLP. Στην κατάσταση T δεν υπάρχει άμεση πρόσβαση προς το καταλυτικό κέντρο από τον περιβάλλοντα διαλύτη. Η πρόσβαση μπορεί να επιτευχθεί μόνο μέσω ενός στενού διαύλου πλάτους 5 Å, αλλά περιορίζεται κυρίως από τον βρόχο 280s (κατάλοιπα 282-285). Κατά την αλλοστερική μετάπτωση από την κατάσταση T στην R, ο βρόχος 280s εκτοπίζεται επιτρέποντας τη δίοδο του υποστρώματος, ενώ η αντικατάσταση της όξινης πλευρικής αλυσίδας του Asp283 από την βασική πλευρική αλυσίδα της Arg569 συμβάλλει στη δημιουργία ενός κέντρου αναγνώρισης των Pi υψηλής συγγένειας (Oikonomakos 2002).

d) Αποθηκευτικό κέντρο (κέντρο του γλυκογόνου)

Το αποθηκευτικό κέντρο εντοπίζεται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, περίπου 30 Å από το καταλυτικό κέντρο και 40 Å από το αλλοστερικό κέντρο. Μέσω της συγκεκριμένης περιοχής η GP συνδέεται με τα σωματίδια του γλυκογόνου *in vivo*. Η περιοχή αυτή βρίσκεται σε μία αβαθή αύλακα, η οποία σχηματίζεται από δυο αντιπαράλληλες α-έλικες και φιλοξενεί ολιγοσακχαρίτες που έχουν διαμόρφωση αριστερόστροφης έλικας (Johnson *et al.*, 1989). Το αποθηκευτικό κέντρο λειτουργεί ως ένα επιπρόσθετο κέντρο ρύθμισης, όπου η κατάληψή του από τον ολιγοσακχαρίτη οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού κατάλυσης (Oikonomakos 2002α).

e) Νουκλεοζιτικό κέντρο (κέντρο αναστολής)

Το κέντρο αναστολής (ή νουκλεοζιτικό κέντρο) είναι ένα υδρόφοβο κέντρο σύνδεσης, το οποίο εντοπίζεται πολύ κοντά στην επιφάνεια του ενζύμου και σε απόσταση 12 Å περίπου από την είσοδο του καταλυτικού κέντρου. Το κέντρο αναστολής περιλαμβάνει ένα μέρος της περιοχής 1 (αμινοξέα 13-484) καθώς επίσης και ολόκληρη την περιοχή 2 (αμινοξέα 485-842), οι οποίες αναφέρονται παρακάτω. Στην κατάσταση T του ενζύμου, το κέντρο αναστολής φράσσει την είσοδο του καναλιού που οδηγεί στο καταλυτικό κέντρο. Έχει αποδειχτεί πως οι πουρίνες (όπως η αδενίνη και η καφεΐνη), οι νουκλεοζίτες (όπως η αδενοσίνη και η ινοσίνη), τα νουκλεοτίδια (όπως η AMP, η IMP και η ATP), το NADH καθώς επίσης και συγκεκριμένα ετεροκυκλικά σώματα (όπως η ριβοφλαβίνη) δένονται στο κέντρο αναστολής της μυϊκής GPα και GPβ, όχι όμως και στην ηπατική GPα, η οποία παρουσιάζει συγκεκριμένη εκλεκτικότητα (Oikonomakos *et al.*, 2002α).

Στην κατάσταση T της GP, η Phe285 του βρόχου 280s εντοπίζεται κοντά στην Tyr613 στην αρχή της α19 έλικας (αμινοξέα 613-631) και μαζί, αυτά τα δυο υδροφοβικά μόρια, σχηματίζουν το κέντρο αναστολής. Η κατάληψη αυτού του κέντρου από ένα μόριο έχει σαν αποτέλεσμα την σταθεροποίηση της κατάστασης T του ενζύμου καθώς επίσης και τη φραγή της εισόδου του καταλυτικού κέντρου. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η αναστολή της δράσης της GP (Oikonomakos *et al.*, 2002α). Η σύνδεση των αναστολέων με την πρωτεΐνη δεν πραγματοποιείται με δεσμούς ηλεκτροστατικής φύσης, καθώς δεν έχουν παρατηρηθεί δεσμοί υδρογόνου με τα αμινοξέα του ενζύμου. Θερμοδυναμικές μελέτες έχουν δείξει ότι η κύρια πηγή για την ενέργεια σύνδεσης προέρχεται από την παράλληλη επιστοίβαξη των δακτυλίων των αρωματικών αμινοξέων (Sprang *et al.*, 1982).

f) *Νέο αλλοστερικό κέντρο (κέντρο σύνδεσης εν δυνάμει φαρμάκων)*

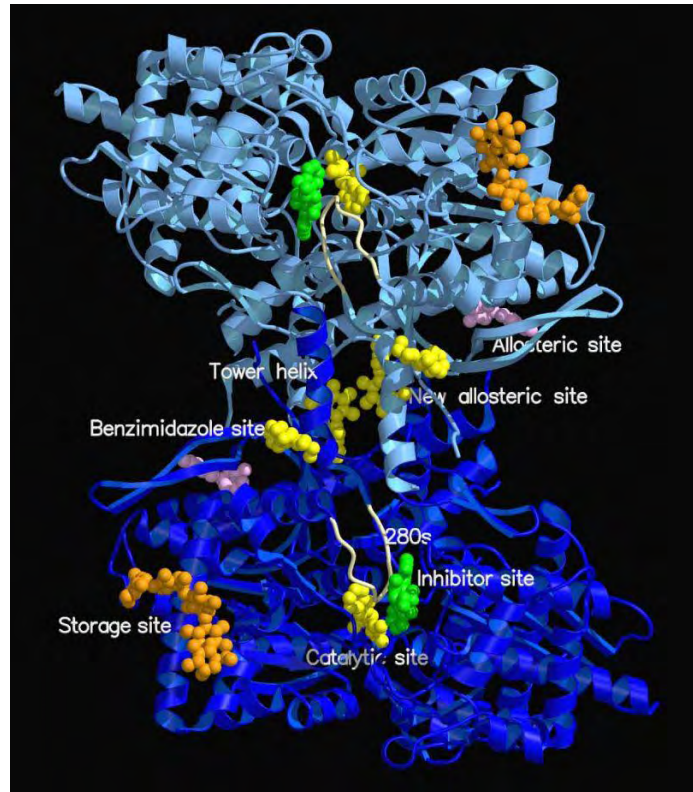
Το νέο αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στη διεπιφάνεια των δυο υπομονάδων στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας της διμερούς δομής της GPβ. Σε αυτό συνδέεται η ένωση P320626 (Pfizer) και ινολο-2-καρβοξαμίδια, καθώς επίσης και η βενζοϋλο-*N*-β-D-γλυκοπυρανοζουλουρία, δημιουργώντας αξιοσημείωτες αλληλεπιδράσεις με την κατάσταση T της GPβ. Αντιθέτως, οι αλληλεπιδράσεις αυτές μειώνονται κατά πολύ κατά τη σύνδεση της συγκεκριμένης ένωσης στην κατάσταση R της GPα (Oikonomakos *et al.*, 2002α).

g) Η κερσετίνη ($IC_{50} = 4.8 \mu\text{M RMGP}\alpha$, $IC_{50} = 20.9 \mu\text{M RMGP}\beta$) (Jakobs *et al.*, 2006) ανήκει στην κατηγορία των φλαβονοειδών. Πρόσφατες κρυσταλλογραφικές μελέτες (Kantsadi *et al.*, 2014) έδειξαν πως προσδένεται σε ένα καινούριο κέντρο σύνδεσης. Το κέντρο αυτό βρίσκεται 15 Å από το καταλυτικό κέντρο, 43 Å από το

αλλοστερικό κέντρο και 32 Å από το κέντρο αναστολής. Το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης είναι μια κοιλότητα, η οποία συγκροτείται από τα αμινοξέα Lys544, Arg551, Lys655, και Tyr548 από τη μια πλευρά και τα αμινοξέα Glu120 και Glu123 από την άλλη.

Γενικότερα, κάθε υπομονάδα του διμερούς της GP έχει ελλειψοειδές σχήμα, με διαστάσεις 60x60x55 Å. Η GP είναι μια α/β πρωτεΐνη και αποτελείται από α-έλικες (52%), β-ελάσματα (20%), δυο έλικες 3_{10} μήκους 6 και 12 αμινοξέων αντίστοιχα, και μια έλικα π, μήκους 8 αμινοξέων. Οι έλικες ποικίλουν σε μήκος από 7 ως 32 αμινοξέα. Υπάρχει μια περιοχή 95 αμινοξέων (153-247) που αποτελείται μόνο από β-ελάσματα και μια άλλη 112 αμινοξέων (714-825) που αποτελείται μόνο από α-έλικες. Η αναδίπλωση των αμινοξέων γίνεται κατά τέτοιο τρόπο ώστε το μόριο να παρουσιάζει μια συμπαγή δομή ακτίνας 30 Å. Υπάρχουν μικρές περιοχές που προεξέχουν, καθώς και κανάλια που επιτρέπουν τη διέλευση των διαφόρων υποστρωμάτων και μικρών μορίων και βοηθούν στην επικοινωνία μεταξύ των διαφόρων κέντρων σύνδεσης. Τέτοιες περιοχές σχηματίζονται από τα αμινοξέα 36-45 και 260-276, γνωστές ως επικάλυμμα (cap) και πύργος (tower) αντίστοιχα, όπως επίσης και ο βρόχος 280s (αμινοξέα 280-292) και το αμινο-τελικό άκρο (αμινοξέα 1-18) (Oikonomakos *et al.*, 1992).

Η πολυπεπτιδική αλυσίδα μπορεί να χωριστεί σε δυο αυτοτελείς περιοχές, την 1 και την 2. Η περιοχή 1, που ονομάζεται και ρυθμιστική, αποτελείται από τα αμινοξέα 10-484. Στην περιοχή αυτή βρίσκεται το κέντρο φωσφορύλιωσης της Ser14, το αλλοστερικό κέντρο σύνδεσης του AMP, το αποθηκευτικό κέντρο, οι περιοχές πύργος και επικάλυμμα καθώς και ένα τμήμα του καταλυτικού κέντρου. Η περιοχή 2, η οποία ονομάζεται και καταλυτική, αποτελείται από τα αμινοξέα 485-842. Στην περιοχή αυτή βρίσκεται το κέντρο αναστολής, η PLP και το υπόλοιπο τμήμα του καταλυτικού κέντρου. Η σύνδεση διαφόρων τροποποιητών και υποστρωμάτων οδηγεί στην εμφάνιση συνεργιστικής δράσης (θετικής ή αρνητικής) μεταξύ των κέντρων σύνδεσης, όχι μόνο στην ίδια υπομονάδα αλλά και μεταξύ διαφορετικών υπομονάδων (Fletterick *et al.*, 1980).

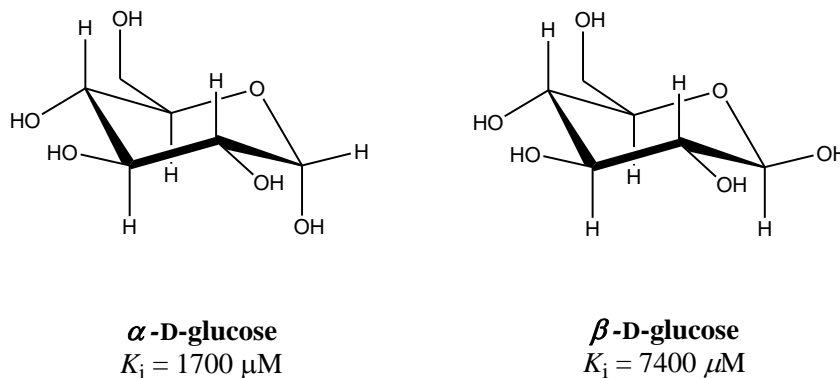


Σχηματικό διάγραμμα 1. Απεικόνιση της μυϊκής GPb όπου διαφαίνονται τόσο το καταλυτικό και το αλλοστερικό κέντρο, η περιοχή αποθήκευσης του γλυκογόνου, κέντρο αναστολής, το νέο αλλοστερικό κέντρο και η περιοχή πρόσδεσης για το βενζιμιδαζόλιο. Το απαραίτητο συνένζυμο PLP είναι εγκλωβισμένο στο κέντρο της υπομονάδας, συνδεδεμένο με τη Lys680 της έλικας $\alpha 21$. Το καταλυτικό κέντρο, είναι καλυμένο στο κέντρο και είναι προσβάσιμο από το διαλύτη μέσω ενός καναλιού μήκους 15 Å. Πρόσδεση του βενζιμιδαζολίου ως ανταγωνιστικού αναστολέα προωθεί τη λιγότερο ενεργή κατάσταση T μέσω σταθεροποίησης της κλειστής θέσης του βρόχου 280s. Το αλλοστερικό κέντρο, στο οποίο προσδένεται ο ενεργοποιητής AMP, βρίσκεται στην περιοχή μεταξύ των 2 υπομονάδων περίπου 30 Å από το καταλυτικό κέντρο. Το κέντρο αναστολής, το οποίο προσδένει πουρινικά μόρια όπως η καφεΐνη είναι τοποθετημένο στην επιφάνεια του ενζύμου, περίπου 12 Å από το καταλυτικό κέντρο εμποδίζοντας την είσοδο σε αυτό κατά την κατάσταση T αλληλεπιδρώντας με τη Phe285 από το βρόχο 280s και την Tyr613 στην αρχή της $\alpha 19$ έλικας. Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου, με πέντε μόρια σακχάρου συνδεδεμένα, βρίσκεται επίσης στην επιφάνεια του μορίου 30 Å από το καταλυτικό και 40 Å από το αλλοστερικό κέντρο, ενώ απέχει 50 Å από το νέο αλλοστερικό κέντρο του αναστολέα. Η νέα αλλοστερική περιοχή ή περιοχή πρόσδεσης ινδολίου, βρίσκεται εντός του κεντρικού τμήματος και σχηματίζεται κατά τη σύνδεση των 2 υπομονάδων μεταξύ τους. Προσδένονται δε σε αυτό, καρβοξαμινικά ανάλογα του ινδολίου, *N*-βενζοϋλο-*N'*- β -D-γλυκοκυρανοζυλουρίες καθώς και το βενζιμιδαζόλιο. Απέχει δε 31 Å από το καταλυτικό κέντρο, 32 Å από το αλλοστερικό κέντρο καθώς και το σημείο πρόσδεσης για το ινδόλιο.

Ια.8 Αναστολείς της φωσφορυλάσης γλυκογόνου

Καθώς η φωσφορυλάση του γλυκογόνου αποτελεί ένζυμο κλειδί για την αποικοδόμηση του γλυκογόνου, η αναστολή της δράσης της έχει θεωρηθεί μια αποτελεσματική προσέγγιση για τη θεραπεία ασθενειών που προκαλούνται από ανωμαλίες κατά το μεταβολισμό του γλυκογόνου, όπως ο διαβήτης τύπου II. Κρυσταλλογραφικές μελέτες αποκάλυψαν την ύπαρξη επτά σημείων πρόσδεσης για τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου (καταλυτικό κέντρο, αλλοστερικό κέντρο, το σημείο πρόσδεσης του γλυκογόνου, νέο αλλοστερικό κέντρο, κέντρο κερσετίνης, καθώς και το βενζιμιδαζολικό κέντρο), καθένα από τα οποία μπορεί να γίνει στόχος μικρών οργανικών μορίων ώστε να ανασταλεί τελικά το ένζυμο.

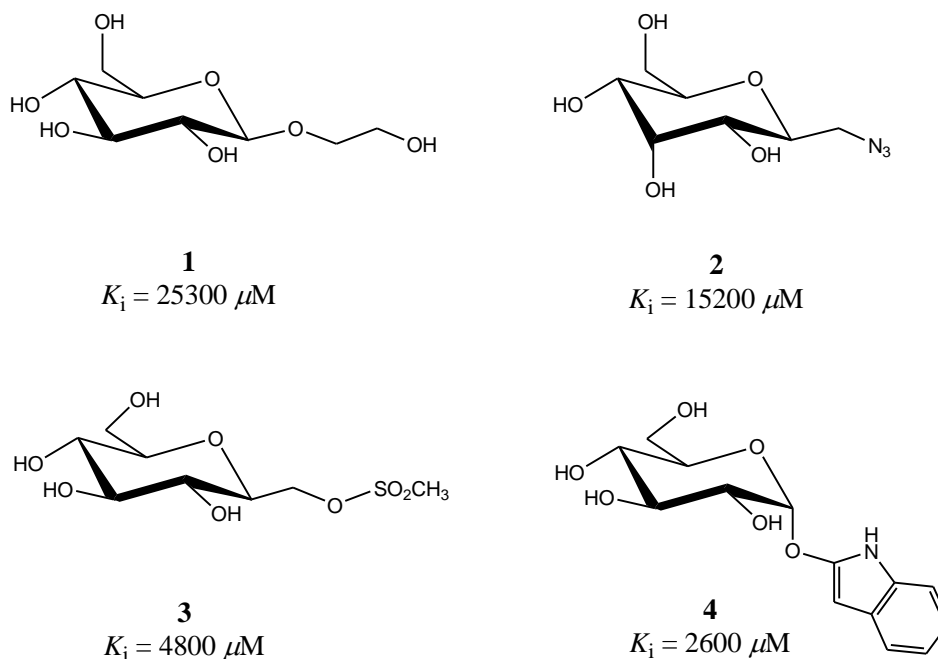
Ο φυσιολογικός αναστολέας της GP είναι η D-γλυκόζη (Σχήμα 2), η οποία σταθεροποιεί το ένζυμο στην λιγότερο ενεργή κατάσταση T φέροντας το βρόχο 280s στην είσοδο του καταλυτικού κέντρου. (Board *et al.*, 1995) Η πρόσδεση της α-D-γλυκόζης επηρεάζεται από δεσμούς υδρογόνου μεταξύ κάθε υδροξυλομάδας με τα αντίστοιχα κατάλοιπα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην αναζήτηση νέων αναλόγων γλυκόζης με μεγαλύτερη συγγένεια για το ενεργό κέντρο. Μεγάλη ποικιλία μορίων έχει σχεδιασθεί, συντεθεί και αξιολογηθεί έναντι του καλύτερου πρωτοτύπου των φωσφορυλασών, τη μυϊκή φωσφορυλάση απομονωμένη από ιστό κουνελιού (Chrysina, 2010).



Σχήμα 2. α- και β-D-γλυκόζη και οι σταθερές αναστολής τους

Κρυσταλλογραφικές μελέτες του συμπλόκου GP-γλυκόζης έχουν αποκαλύψει την ύπαρξη ενός καναλιού, το οποίο περιστοιχίζεται τόσο από πολικά όσο κι από μη πολικά αμινοξέα (β-εσοχή). Με σκοπό να «γεμίσει» ο κενός χώρος της β-εσοχής συντέθηκε και αξιολογήθηκε το 2-υδροξυαιθυλο ανάλογο της γλυκοπυρανόζης **1**

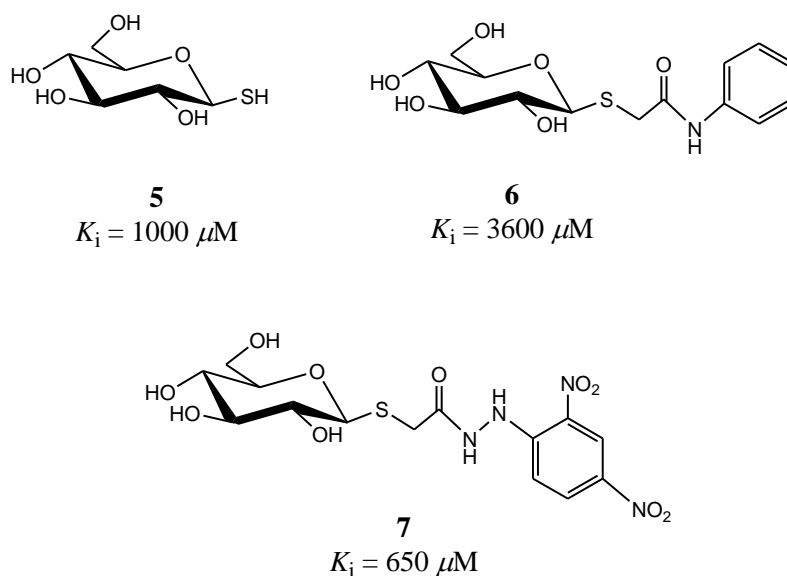
(Σχήμα 3), το οποίο αποδείχθηκε πως σχηματίζει ένα δεσμό υδρογόνου μεταξύ του τελικού του Ο με το κατάλοιπο της Asp339 που βρίσκεται στο τέλος της β-εσοχής. Το μόριο εμφανίζει μεγαλύτερη σταθερά αναστολής σε σύγκριση με εκείνη της α-D-γλυκόζης λόγω απώλειας της εντροπίας κατά την πρόσδεση της ευλύγιστης μη υδατανθρακικής περιοχής του μορίου. Μεταξύ των O- και C- γλυκοζιτών που εξετάστηκαν ως αναστολείς της GP οι πιο ισχυροί διαφαίνονται στο παρακάτω σχήμα (Oikonomakos *et al.*, 1994). Κανένας από τους εν δυνάμει αναστολείς που εξετάστηκαν, δεν προσέγγισε τη σταθερά αναστολής της α-D-γλυκόζης (1700 μM) στο ένζυμο.



Σχήμα 3. Γλυκοζίτες ως αναστολείς της GP.

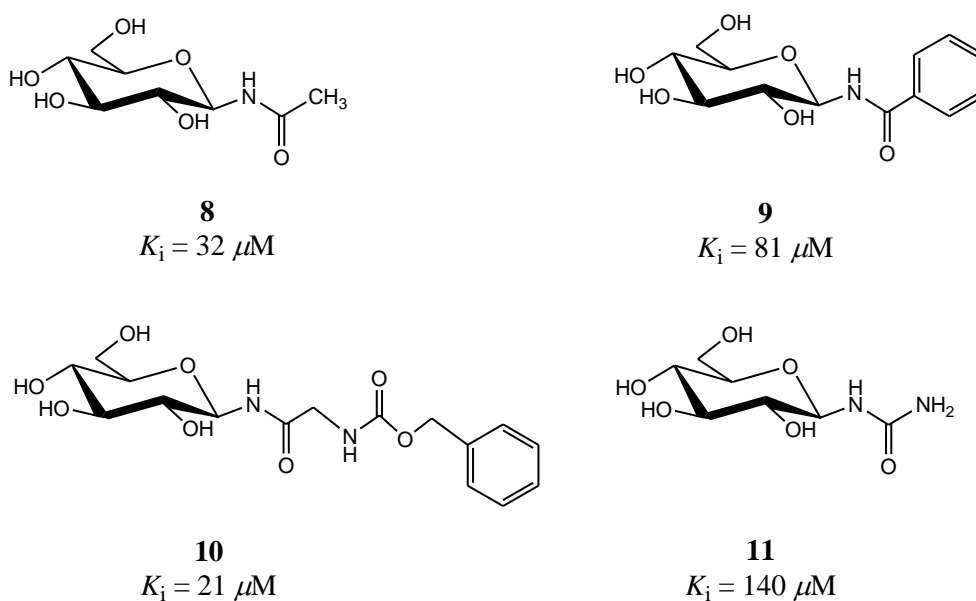
Από τη στιγμή που η β-εσοχή αποτελείται και από πολικά και από μη πολικά αμινοξέα, μια ομάδα η οποία είναι μη πολική αλλά που πολώνεται εύκολα θα μπορούσε να προσδένεται αποτελεσματικά. Ένας καλύτερος αναστολέας από τη D-γλυκόζη βρέθηκε να είναι η 1-δεοξυ-1-θειο-β-D-γλυκοκυρανόζη **5** (Σχήμα 4). Από τις κρυσταλλογραφικές μελέτες προέκυψε ότι το συγκεκριμένο μόριο σχηματίζει δεσμούς Van der Waals με το ένζυμο. Ωστόσο, προσπάθειες δημιουργίας θειογλυκοζιτών με περαιτέρω λειτουργικές ομάδες στο μόριό τους, όπως η ένωση **6** δεν οδήγησαν σε χαμηλότερες σταθερές αναστολής (Σχήμα 4). Η ένωση **7** παρόλο που εμφάνισε καλύτερη σταθερά αναστολής αποδείχθηκε ότι δεν προσδένεται στο

ενεργό κέντρο του ενζύμου αλλά στο κέντρο του νουκλεοζιτικού αναστολέα (Oikonomakos *et al.*, 2002α).



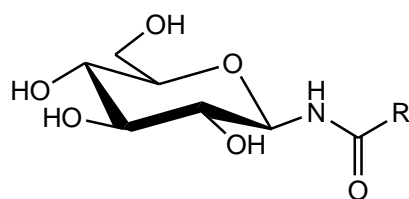
Σχήμα 4. Θειογλυκοζίτες ως αναστολείς της GP.

Οι *N*-ακυλο- β -D-γλυκοπυρανοζυλαμίνες **8**, **9** και **10** δημιουργούν ισχυρό δεσμό υδρογόνου με το O της κύριας πεπτιδικής αλυσίδας, το οποίο ανήκει στην His377. Για το λόγο αυτό η ένωση **8** είναι περίπου 60 φορές καλύτερος αναστολέας από τη γλυκόζη. Η αντικατάσταση του μεθυλίου από μια αμινομάδα δεν οδήγησε σε ισχυρότερη αναστολή (Σχήμα 4, ένωση **11**) (Watson *et al.*, 1995).



Σχήμα 5. Διάφορες *N*-ακυλο- β -D-γλυκοπυρανοζυλαμίνες και οι σταθερές αναστολής τους.

Είναι γενονός ότι οι *N*-ακυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλαμίνες, βρίσκονται ανάμεσα στα πρώτα μόρια που αναγνωρίστηκαν ως αναστολείς της GP. Μέχρι στιγμής έχουν αποτιμηθεί ενώσεις με διάφορες παραλλαγές στο άκυλο τμήμα του μορίου, οι οποίες συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα (μόρια **12a-l**). (Gyorgydeak *et al.*, 2004)

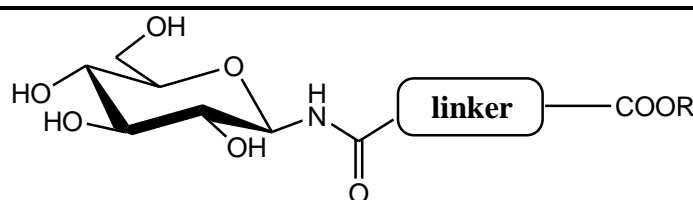
**12a-l**

Ένωση	R	K _i (μM)	Ένωση	R	K _i (μM)
12a	-CF ₃	75	12g		18
12b	-CH ₂ N ₃	49	12h		3.5
12c		289	12i		61
12d		καμιά αναστολή	12j		281
12e		85	12k		444
12f		4	12l		180

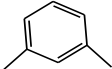
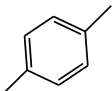
Τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα που συγκεντρώθηκαν για τις *N*-ακυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλαμίνες **12a-l** αποσαφήνισαν την επίδραση συγκεκριμένων υποκαταστατών στην ανασταλτική ικανότητα των νέων μορίων και αποκάλυψαν πως κοινό γνώρισμα όλων των ανωτέρω ενώσεων αποτελεί η πρόσδεσή τους στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Κατά την πρόσδεσή τους στο καταλυτικό κέντρο προωθείται η λιγότερο ενεργή κατάσταση T μέσω σταθεροποίησης της κλειστής διαμόρφωσης του βρόχου 280s αποτρέποντας με τον τρόπο αυτόν την είσοδο για το

υπόστρωμα. Επιπλέον, μια αλληλεπίδραση η οποία συντηρείται και αφορά όλες της ενώσεις αυτής της κατηγορίας είναι ο σχηματισμός ενός δεσμού υδρογόνου μεταξύ του αμιδικού αζώτου (N1) με το καρβονυλικό οξυγόνο (O) της His377. (Anagnostou *et al.*, 2006)

Για να διερευνηθούν οι αλληλεπιδράσεις στη β-εσοχή του ενζύμου συντέθηκε και εξετάστηκε μια σειρά *N*-ακυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο μονοαμιδίων διαφόρων δικαρβοξυλικών οξέων (Πίνακας 2). Κύριος στόχος ήταν η εισαγωγή μιας ισχυρά πολικής ομάδας (COOH) σε διαφορετικές αποστάσεις από το σάκχαρο. Οι ενώσεις αυτές εμφάνισαν ασθενή συγγένεια προς το ένζυμο, ενώ η ικανότητα κάμψης του συνδέσμου φάνηκε να είναι ιδιαίτερης σημασίας για την πρόσδεση (Czifrak *et al.*, 2006).



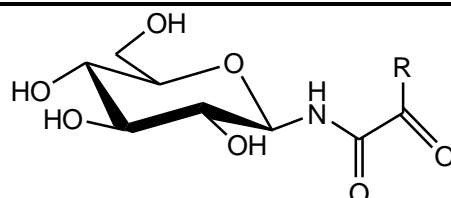
13a-f

Ένωση	-linker-	R	K _i (μM)
13a	-(CH ₂) ₂ -	CH ₃	170
13b	-(CH ₂) ₂ -	H	20
13c	-(CH ₂) ₃ -	CH ₃	83
13d	-(CH ₂) ₃ -	H	καμιά επίδραση στα 625 μM
13e		CH ₃	580
13f		CH ₃	329

Πίνακας 2. *N*-ακυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο μονοαμίδια δικαρβοξυλικών οξέων.

Άλλα ανάλογα των *N*-ακυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλαμινών υπήρξαν τα ανάλογα του *N*-ακυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο οξαμικού οξέος, οι σταθερές αναστολής των οποίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Κρίσιμος παράγοντας για την πρόσδεση αυτών των ενώσεων υπήρξε το είδος του υποκαταστάτη, το μέγεθος καθώς και ο προσανατολισμός του στο χώρο (Hadjiloi *et al.*, 2006; Somsak *et al.*, 2008a). Ενώ το

N-β-D-γλυκοκυρανοζυλο οξαμικό οξύ (**14a**) και οι εστέρες **14b** και **14c** εμφάνισαν ασθενή ανασταλτική ικανότητα, η πρόσδεση των ενώσεων **14d-g** υπήρξε ισχυρότερη και ήταν άμεσα εξαρτώμενη από τον υποκαταστάτη (R). Το μέγεθος και ο προσανατολισμός των δακτυλίων στο τμήμα του υποκαταστάτη φαίνεται να είναι ο καθοριστικός παράγοντας για την ικανότητα αναστολής.

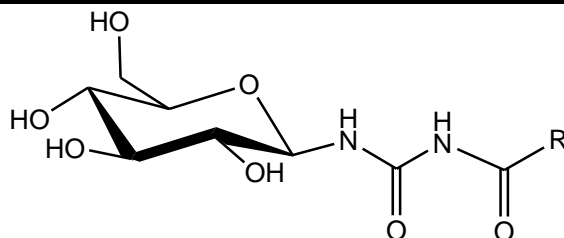
**14a-g**

Ένωση	R	K _i (μM)
14a	-OH	710
14b	-OCOCH ₃	210
14c	-OCH ₂ CH ₃	920
14d		100
14e		230
14f		144
14g		56

Πίνακας 3. Ανάλογα του *N*-ακυλο-β-D-γλυκοκυρανοζυλο οξαμικού οξέος ως αναστολείς της GP.

Με την ίδια λογική σχεδιάστηκαν και μελετήθηκαν *N*-ακυλο-*N'*-β-D-γλυκοκυρανοζυλουρίες (**15a-m**), οι οποίες αποδείχθηκαν ιδιαίτερα αποτελεσματικές έναντι του ενζύμου. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 4, η προσθήκη ενός υποκαταστάτη στην 4'-θέση της βενζοϋλουρίας **15e** -αλειφατικού (ενώσεις **15f,g**), αρωματικού (ένωση **15h**), πολικού (ένωση **15i**), ελαφρώς αλκαλικού (ένωση **15j**) ή όξινου (ένωση **15k**) αλλά και ενός αλογόνου (ένωση **15l**)- δε βελτίωσε ιδιαίτερα την ικανότητα αναστολής σε σχέση με το μητρικό μόριο. Όταν, όμως εισήχθη μία στερικά απαιτητική και ισχυρά υδρόφοβη ομάδα (ένωση **15m**) στην ίδια θέση, η ικανότητα αναστολής αυξήθηκε σημαντικά. Ο προσανατολισμός και το μέγεθος του υποκαταστάτη στις ενώσεις **15b-d** φάνηκε να διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην

αναστολή. Συνοπτικά, η μελέτη της ικανότητας αναστολής των άκυλο-ουριών επιβεβαίωσε τη σημασία των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του ενζύμου και του αναστολέα στο β-κανάλι ενώ υπογραμμίζει το ρόλο της δημιουργίας δεσμών Van der Waals και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων από ομάδες που έχουν το κατάλληλο μέγεθος και προσανατολισμό. (Somsak *et al.*, 2008α; Oikonomakos *et al.*, 2002β)



15a-j

Ένωση	R	K _i (μM)	Ένωση	R	K _i (μM)
15a	-CH ₃	305	15h		3.7
15b		4	15i		3.3
15c		0.35	15j		3.3
15d		15	15k		6.3
15e		4.6	15l		4.4
15f		2.3	15m		0.7
15g		1.8			

Πίνακας 4. *N*-ακυλο-*N'*-β-*D*-γλυκοκυρανοζυλουρίες ως αναστολείς της RMGPb. (Somsak *et al.*, 2008α; Oikonomakos *et al.*, 2002β)

1α.9 Υπολογιστικές μέθοδοι σχεδιασμού αναστολέων για τη φωσφορύλαση του γλυκογόνου

Η γνώση των τρισδιάστατων χαρακτηριστικών του ενζύμου είτε ως ελεύθερο, δίχως δηλαδή την προσθήκη ενός μορίου αναστολέα, είτε ως σύμπλοκο με κάποιο μόριο αναστολέα αποκαλύπτει τις αλληλεπιδράσεις, οι οποίες είναι καθοριστικές τόσο για την αναγνώριση όσο και την πρόσδεση των συγκεκριμένων μορίων σε αυτό. Υπάρχουν ποικίλες υπολογιστικές μέθοδοι οι οποίες στοχεύουν στο σχεδιασμό φαρμάκων με βάση τη δομή των μοριακών στόχων κάθε φορά, οι οποίες κάνοντας χρήση όλων των γνωστών δεδομένων οδηγούν σε νέες δομές για μετέπειτα πειραματική αξιολόγηση.

Σημαντικό ρόλο στο σχεδιασμό αναστολέων με τη χρήση των υπάρχοντων υπολογιστικών συστημάτων αποτελεί η επιλογή των διαφόρων θέσεων πρόσδεσης στο ένζυμο, έχοντας παράλληλα γνώση των καταλοίπων που καθορίζουν τη συγγένεια, την ευελιξία της περιοχής στο χώρο, την έκθεσή της στο διαλύτη καθώς και την υδροφοβικότητά της.

Οι μοριακές προσομοιώσεις όσον αφορά τους εν δυνάμει αναστολείς είναι απαραίτητο να πραγματοποιούνται με σύνεση καθώς είναι ένα εργαλείο αρκετά βοηθητικό στο στοχευμένο σχεδιασμό μορίων, δεν μπορεί, όμως, να προβλέψει με απόλυτο τρόπο τον τρόπο πρόσδεσης και τις πιθανές δευτερεύουσες αλληλεπιδράσεις κάθε μορίου, οι οποίες αποκαλύπτονται τελικά μόνο μετά από κρυσταλλογραφική ανάλυση. Με τον τρόπο αυτό η κρυσταλλογραφική μελέτη είναι σε θέση να επιβεβαιώσει ή να καταρρίψει το μοριακό σχεδιασμό.

Τα μοντέλα-μόρια που φέρουν στο μόριό τους φαρμακοφόρα χαρακτηριστικά για τις 4 θέσεις πρόσδεσης (καταλυτικό κέντρο, κέντρο αναστολής, αλλοστερικό και νέο αλλοστερικό κέντρο) έχουν δημιουργηθεί σύμφωνα με το πρόγραμμα LigandScout και με βάση υπάρχοντα σύμπλοκα ενζύμου-αναστολέα που έχουν καταγραφεί στην πρωτεϊνική βάση δεδομένων PDB (Protein DataBank). Ένα πρόγραμμα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προβλέψει το σημείο πρόσδεσης ενός ήδη σχεδιασμένου αναστολέα είναι το Glide-XP. Η ικανότητα ενός συγκεκριμένου μορίου-αναστολέα να προσδέεται ταυτόχρονα σε περισσότερες της μίας θέσεως επί του ενζύμου, είναι δύσκολο να προβλεφθεί (Hayes *et al.*, 2010).

Ένας άλλος παράγοντας που καθοδηγεί τους υπολογισμούς είναι η επιλογή του κατάλληλου μοντέλου ενζύμου-αναστολέα από την PDB. Η δομή που θα επιλεγεί θα

πρέπει να προσομοιάζει σε μεγάλο βαθμό με το μόριο στο οποίο πρόκειται να γίνει ο υπολογισμός στη θέση που στοχεύει.

Η τεχνολογική πρόοδος, ανανεώνει συνεχώς τα υπολογιστικά προγράμματα που χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό και την ανάπτυξη νέων φαρμάκων και παρουσιάζουν τις δυνατότητες αλλά και τους περιορισμούς τους από τους ειδικούς. Ορισμένοι υπολογισμοί παραμένουν ακόμη χρονοβόροι και απαιτούν προγράμματα υψηλού κόστους. Από τη στιγμή που μια δομή εμφανιστεί υπολογιστικά ως καλός υποψήφιος αναστολέας του ενζύμου, ζητήματα που αφορούν στον τρόπο σύνθεσής της και στη συνέχεια τη βιολογική αποτίμηση, καθίστανται περισσότερο διαχειρίσιμα. Συνεπώς, η μελέτη της αναστολής της GP αποτελεί μια συνεχή πρόκληση για επιστήμες όπως η φυσική, η συνθετική και φαρμακευτική χημεία καθώς και η πρωτεϊνική κρυσταλλογραφία (Oikonomakos *et al.*, 2002a). Απώτερος στόχος της έρευνας που διεξάγεται είναι η εύρεση ενός αναστολέα, ο οποίος θα μιμείται την δράση της γλυκόζης και θα δρα σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις απ' αυτή, χωρίς να προκαλεί την πλήρη αδρανοποίηση του ενζύμου.

Ia.10 N-ακυλο-β-D-γλυκοκυρανοζυλαμίνες και ουρίες ως κυτταροστατικοί παράγοντες

Ο καρκίνος αποτελεί μια πολυπαραγοντική νόσο, η οποία αφορά μεγάλο μέρος του πληθυσμού ενώ τα ποσοστά του αυξάνονται συνεχώς. Εξαιτίας της συχνότατης εμφάνισης κακοηθών καρκινωμάτων και των επιπλοκών που αυτά δημιουργούν στους ασθενείς, μεγάλο μέρος της επιστημονικής έρευνας έχει επικεντρωθεί στη διερεύνηση των μηχανισμών που τα αφορούν για τη δημιουργία νεότερων αποτελεσματικών θεραπειών. (Ferlay *et al.*, 2015)

Στις αρχές του 1990, διάφοροι αναστολείς κινασών μικρού μοριακού βάρους αποδείχθηκαν ιδιαίτερα υποσχόμενοι στη θεραπεία του καρκίνου (Sausville *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2013) εξαιτίας της άμεσης εμπλοκής τους στους διαύλους μεταγωγής σήματος που συνδέονται με την ογκογένεση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων. (Blanc *et al.*, 2013) Μεταξύ αυτών, το Sorafenib (Nevaxar), ένα ανάλογο ουρίας, χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του καρκίνου των νεφρών (Renal Cell Carcinoma, RCC) καθώς και του προχωρημένου ηπατοκυτταρικού καρκίνου (Hepatocellular Carcinoma, HCC). (Wilhelm *et al.*, 2006; Montagut *et al.*, 2009) Ομοίως, ο παράγοντας PAC-1 αποδείχθηκε αποτελεσματικό αντικαρκινικό φάρμακο το οποίο δύναται να επηρεάσει τους αποπτωτικούς μηχανισμούς σε

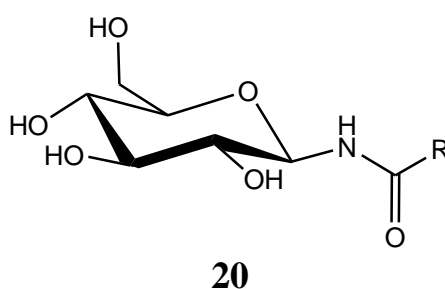
ποντικούς μοντέλα (Zhang *et al.*, 2012; Peterson *et al.*, 2009; Putt *et al.*, 2006). Τέλος, το καρβοξαμίδιο Sunitinib (Sutent) αποδείχθηκε ότι θεραπεύει επιτυχώς τον καρκίνο των νεφρών καθώς και όγκους της ενδοκρινούς μοίρας του παγκρέατος ενώ το θιάζολο καρβοξαμίδιο Dasatinib χρησιμοποιείται έναντι διαφόρων ειδών λευχαιμίας (Jänne *et al.*, 2009).

Πιθανότατα, η χρησιμοποίηση συνδέσμων στη δομή των ανωτέρω μορίων όπως ο σύνδεσμος NHCO, NHCONHCO ή και διαφόρων ετεροατόμων όπως το άζωτο ή το οξυγόνο αποτελούν σημαντικά στοιχεία για την εκλεκτικότητα αυτού του είδους αναστολέων τα οποία σχηματίζουν έναν ή δύο δεσμούς υδρογόνου με την κινάση την οποία στοχεύουν. (Davis *et al.*, 2011)

1α.11 Στόχοι

Ο αρχικός στόχος ήταν η σύνθεση έξι αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, οι οποίοι προέκυψαν ύστερα από σάρωση και διαλογή 1888 *N*-ακυλο- β -D-γλυκοπυρανοζυλαμινών που διέφεραν μόνο ως προς το τμήμα του υποκαταστάτη τους R και υπήρχαν στη βιβλιοθήκη μικρών μορίων Zinc, η οποία περιλαμβάνει μόνο εμπορικά διαθέσιμες ενώσεις, με υπολογιστικές μεθόδους προσομοίωσης (molecular docking).

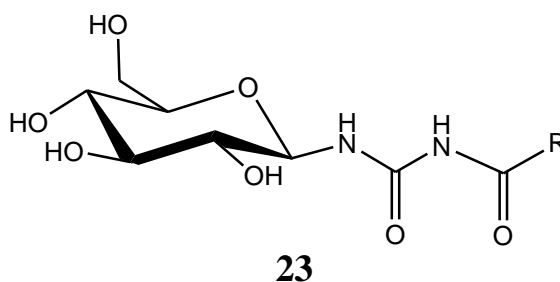
Τα νέα μόρια αναμενόταν, σύμφωνα με τους υπολογισμούς, να έχουν υψηλή συγγένεια για το ενεργό κέντρο του ενζύμου και χαμηλές κινητικές σταθερές. Τα μόρια που προέκυψαν είχαν τη γενική δομή (**20**), ενώ τη θέση R καταλάμβαναν αντίστοιχα οι υποκαταστάτες **a-f**.



Υποκαταστάτες (R)					
a	b	c	d	e	f

Η βιοδραστικότητα των νέων αυτών μορίων αξιολογήθηκε με κινητικές ενώ αναλύθηκε και η σύνδεση τους στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου με κρυσταλλογραφικές μελέτες ώστε να διαπιστωθεί η αρχική υπόθεση.

Στη συνέχεια και έχοντας υπόψη τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη των ανωτέρω *N*-ακυλο-β-D-γλυκοκυρανοζυλαμινών (**20a-f**) αποφασίστηκε η αντικατάσταση του συνδέσμου NHCO από το μακρύτερο NHCONHCO στα παράγωγα με τις χαμηλότερες σταθερές αναστολής, ώστε να διερευνηθούν οι αλληλεπιδράσεις των νέων μορίων που θα έφεραν τους ίδιους υποκαταστάτες σε σχέση με τα μητρικά. Οι ενώσεις που προέκυψαν είχαν τη γενική δομή (**23**).

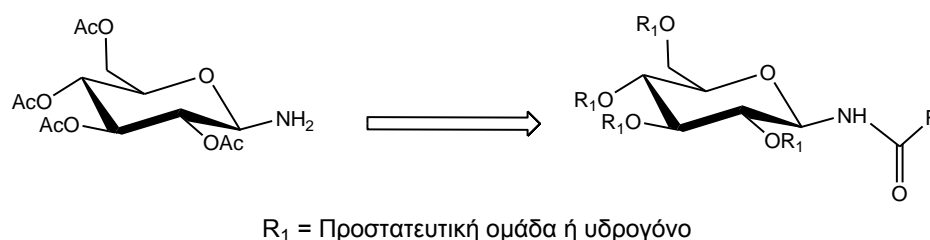


Γνωρίζοντας ότι οι συγκεκριμένες τάξεις ενώσεων διαθέτουν και αξιοσημείωτες κυτταροστατικές ιδιότητες θεωρήθηκε σκόπιμη η περαιτέρω εξέταση της βιολογικής τους δράσης (Wilhelm *et al.*, 2006; Montagut *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012; Peterson *et al.*, 2009; Putt *et al.*, 2006; Jänne *et al.*, 2009).

IIα. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

IIα.1. Σύνθεση *N*-ακυλο- β -D-γλυκοκυρανοζυλαμινών

Όπως προαναφέρθηκε, η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) αποτελεί το ένζυμο κλειδί στο μεταβολισμό του γλυκογόνου και αποτελεί στόχο διαφόρων υπογλυκαιμικών σκευασμάτων για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου II. Για τη σύνθεση των επιθυμητών *N*-ακυλο- β -D-γλυκοκυρανοζυλαμινών ως αναστολέων έναντι του ενζύμου, από τη ρετροσυνθετική προσέγγιση προέκυψε ως πρόδρομη ένωση η κατάλληλη ακετυλιωμένη β -D-γλυκοκυρανοζυλαμίνη, η οποία στη συνέχεια συζεύχθηκε με τα αντίστοιχα εμπορικά διαθέσιμα ακυλοχλωρίδια **a-f** για τη δημιουργία των προστατευμένων αναλόγων, τα οποία έπειτα από αποπροστασία οδηγούν στα τελικά μόρια-στόχος. (Σχήμα 5)

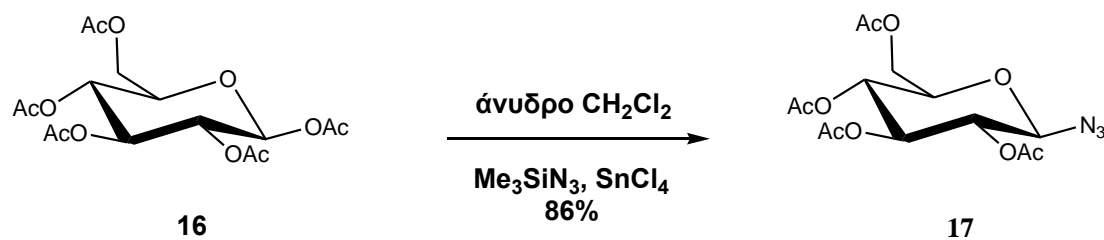


Υποκαταστάτες (R)					
a 	b 	c 	d 	e 	f

Σχήμα 5. Επισκόπηση συνθετικής οδού *N*-ακυλο- β -D-γλυκοκυρανοζυλαμινών **20a-f**.

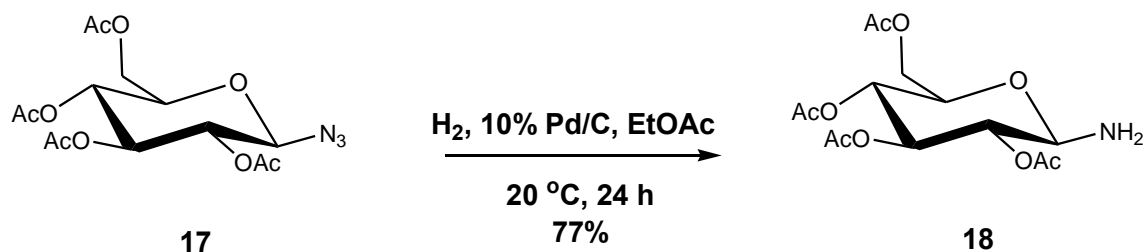
Αρχικά πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του 2,3,4,6-τετρακίς-*O*-ακετυλο- β -D-γλυκοκυρανοζυλαζιδίου (**17**) από την εμπορικά διαθέσιμη 1,2,3,4,6-πεντακίς-*O*- β -D-ακετυλογλυκοκυρανόζη (**16**) κατόπιν αντίδρασής της σε άνυδρο CH_2Cl_2 με καταλύτη τετραχλωριούχο κασσιτέρο (SnCl_4) με τη μέθοδο των Tropper *et. al.* (Σχήμα 6). Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC, $R_f = 0.28$, *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 1:4), το διάλυμα αραιώνεται με διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2) και εκχυλίζεται με νερό, οπότε και παραλαμβάνεται η ένωση **17** σε πολύ καλή απόδοση (86%) ύστερα από

χρωματογραφία στήλης υπό πίεση και διαλύτη έκλουσης το σύστημα διαλυτών *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 1:1. (Tropper *et. al.*, 1992)



Σχήμα 6. Σύνθεση του 2,3,4,6-τετρακίς-*O*-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλαζιδίου (17).

Στη συνέχεια το β-ανωμερικό αζίδιο **17** υδρογονώθηκε προς την αντίστοιχη αμίνη **18** με τη βοήθεια παλλαδίου επί άνθρακα 10% και διαλύτη EtOAc στους 20 °C για 24 h. (Σχήμα 7). Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC, $R_f = 0.18$, *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 2:3), το μίγμα διηθείται μέσω γης διατόμων (Celite) και το προκύπτον έλαιο λαμβάνεται ύστερα από χρωματογραφία στήλης σε καλή απόδοση (77%) με διαλύτη έκλουσης τον οξικό αιθυλεστέρα.



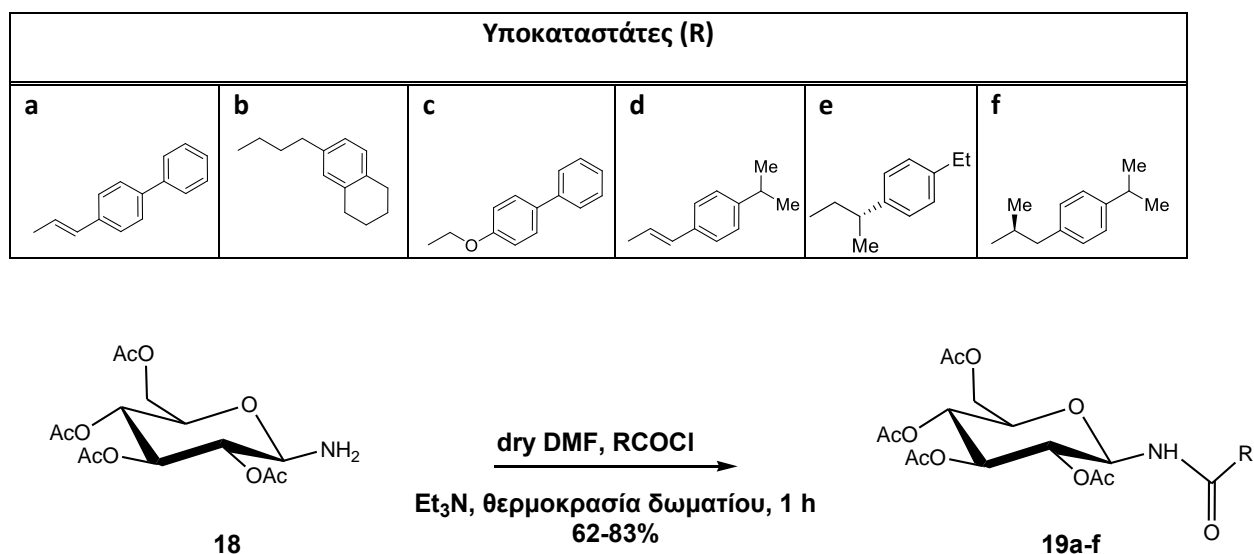
Σχήμα 7. Σύνθεση της 2,3,4,6-τετρακίς-*O*-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλαμίνης (18).

Το φάσμα πρωτονίου (^1H NMR) της ένωσης **18** εμφάνισε κατά σειρά τα πρωτόνια στις θέσεις 3, 4 και 2 ως τριπλές κορυφές (triplet, t) στα 5.27, 5.09 και 4.82 ppm, αντίστοιχα ενώ το πρωτόνιο της θέσης 1 εμφανίστηκε ως μια χαρακτηριστική διπλή διπλών (doublet of doublet, dd) κορυφή με $J_{1,2} = 8.6$ Hz. Τα πρωτόνια στη θέση 5 και 6 εμφανίστηκαν ως πολλαπλές κορυφές (multiplet, m) ενώ εμφανείς ήταν και τέσσερις ακετυλομάδες ως απλές κορυφές (singlet, s) στα 2.11, 2.00, 2.03 και 2.02 ppm.

Στο φάσμα άνθρακα της ίδιας ένωσης (**18**) οι καρβονυλομάδες (C=O) και τα μεθύλια (CH_3) των ακετυλομάδων έδωσαν τις αναμενόμενες κορυφές στα 170.4-169.9 ppm και 20.7-20.4 ppm αντίστοιχα, ενώ οι άνθρακες του σακχάρου (C-1–C-6) εμφανίστηκαν στην περιοχή 85.8-61.7 ppm.

Η ύπαρξη της αμινομάδας και συνεπώς η απουσία της αζιδομάδας στο μόριο επιβεβαιώθηκε από το φάσμα υπερέθρου (IR) της ένωσης, η οποία εμφανίστηκε στην περιοχή $3471\text{-}3260\text{ cm}^{-1}$ γεγονός το οποίο επιβεβαιώθηκε και βιβλιογραφικά. (Jarrahpour *et al.*, 2007)

Αφού πιστοποιήθηκε η διαθεσιμότητα της 2,3,4,6-τετρακίς-*O*-ακετυλο- β -D-γλυκοκυρανοζυλαμίνης (**18**) πραγματοποιήθηκε σύζευξή της με τα κατάλληλα εμπορικά διαθέσιμα ακυλογλωρίδια **a-f**. Διάλυση της ένωσης **18** σε άνυδρο *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF), με προσθήκη τριεθυλαμίνης (Et_3N) και των αντίστοιχων ακυλογλωριδίων **a-f** οδήγησε στο σχηματισμό των ακετυλιωμένων γλυκοκυρανοζυλαμινών **19a-f** μετά από 1 h, όπως διαπιστώθηκε με TLC. Τα προϊόντα **19a-f** ελήφθησαν σε ικανοποιητικές αποδόσεις 62-83% ύστερα από απομάκρυνση του διαλύτη υπό κενό και χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διαλυτών *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας σε αναλογία 1:1 ή 3:2, αντίστοιχα. (Σχήμα 8)

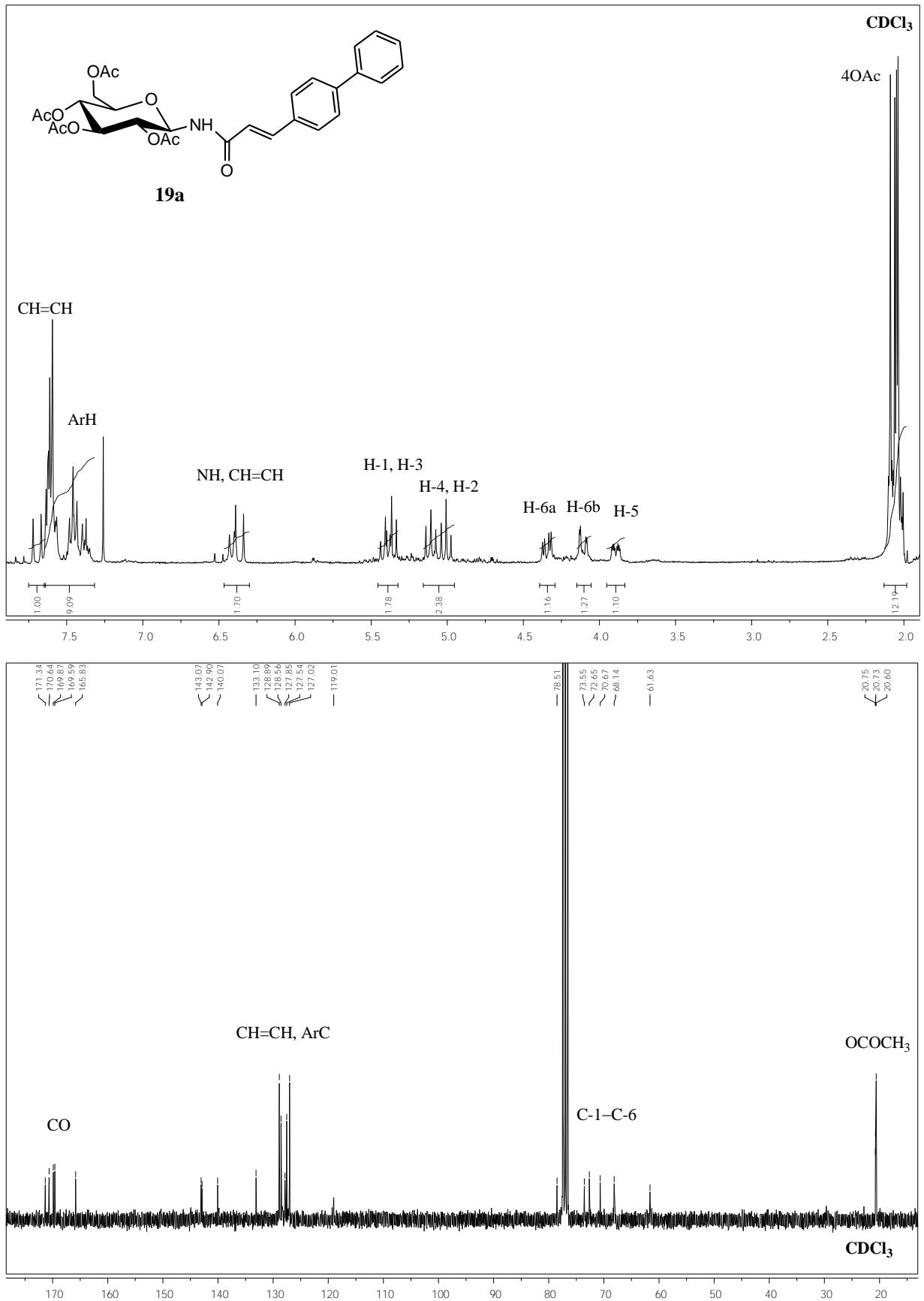


Σχήμα 8. Σύνθεση των ακετυλιωμένων *N*-ακυλο- β -D-γλυκοκυρανοζυλαμινών **19a-f**.

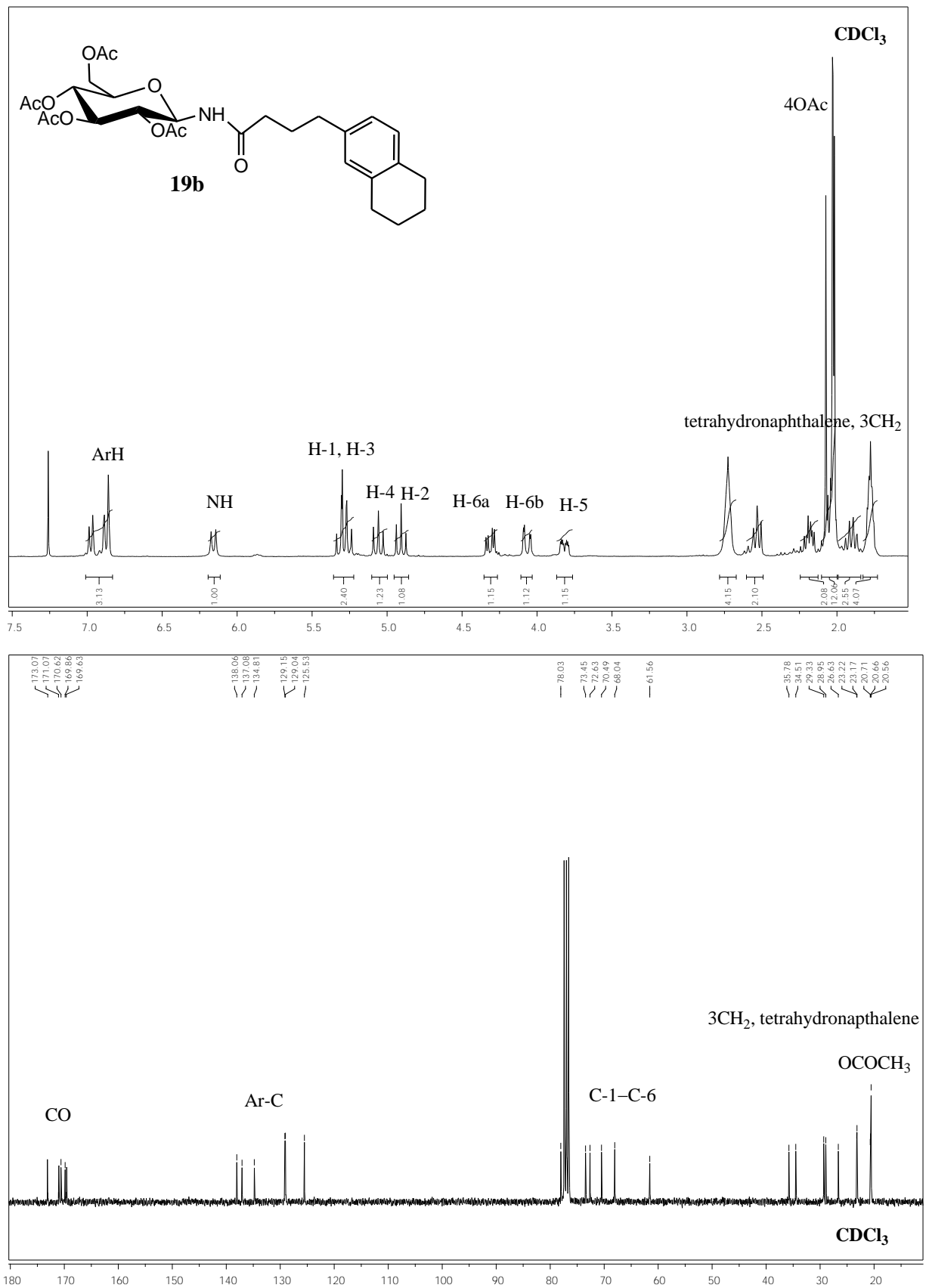
Για να επιβεβαιωθεί η δημιουργία του αμιδικού δεσμού στα νέα παράγωγα και να διευκρινιστούν τα φασματοσκοπικά τους χαρακτηριστικά, στις ακετυλιωμένες *N*-ακυλο- β -D-γλυκοκυρανοζυλαμίνες **19a-f** ελήφθησαν φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR, τα οποία παρουσιάζονται στα σχήματα 9-14. Όπως παρατηρούμε στα φάσματα ^1H NMR των ενώσεων, εμφανίζονται τόσο τα πρωτόνια των

υποκαταστατών όσο και του σακχάρου. Τα πρωτόνια του σακχάρου ακολουθούν ένα επαναλαμβανόμενο μοτίβο, με σειρά εμφάνισης τα σήματα πρωτονίου των H-1, H-3 ως ψευδοτριπλές κορυφές (pseudo triplet, pseudo t) με σταθερές σύζευξης $9.2 \text{ Hz} \leq J \leq 9.6 \text{ Hz}$ στην περιοχή 5.44-5.20 ppm, έπειτα τα σήματα πρωτονίου των H-4, H-2 ως τριπλές κορυφές (**19a-d**) ή ψευδοτριπλές κορυφές (**19e,f**) στις περιοχές 5.04-5.11 ppm και 5.03-4.87 ppm, αντίστοιχα.. Τα σήματα των πρωτονίων H-6a και H-6b εμφανίστηκαν ως δύο κορυφές διπλής διπλών (doublet of doublets, dd) στην περιοχή μεταξύ 4.35-4.06 ppm ενώ το σήμα του πρωτονίου H-5 ως μια κορυφή διπλή διπλής διπλών (doublet of doublet of doublets, ddd) στα 3.89-3.80 ppm.

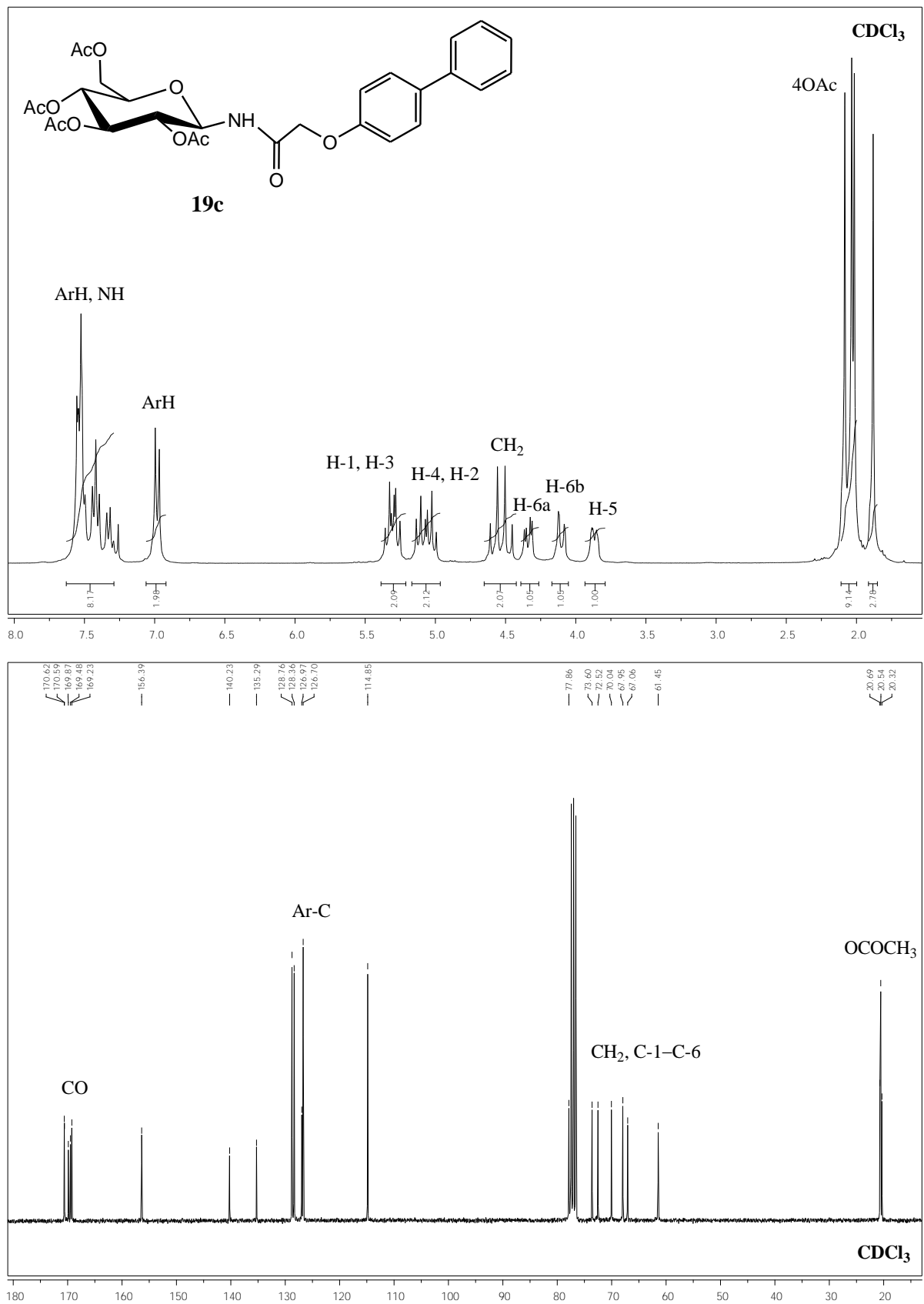
Σχήμα 9. Φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR ένωσης **19a**.



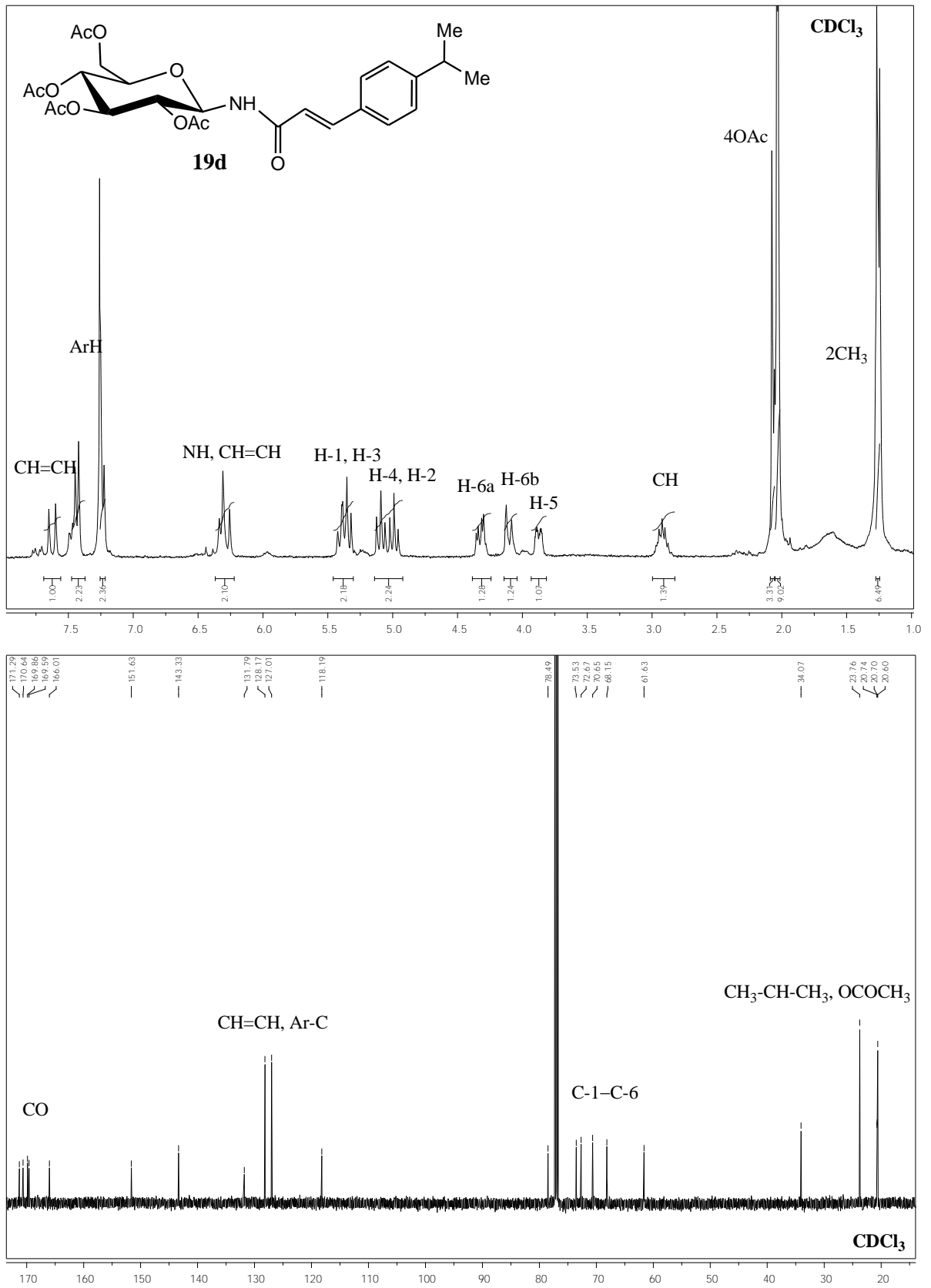
Σχήμα 10. Φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR ένωσης **19b**.



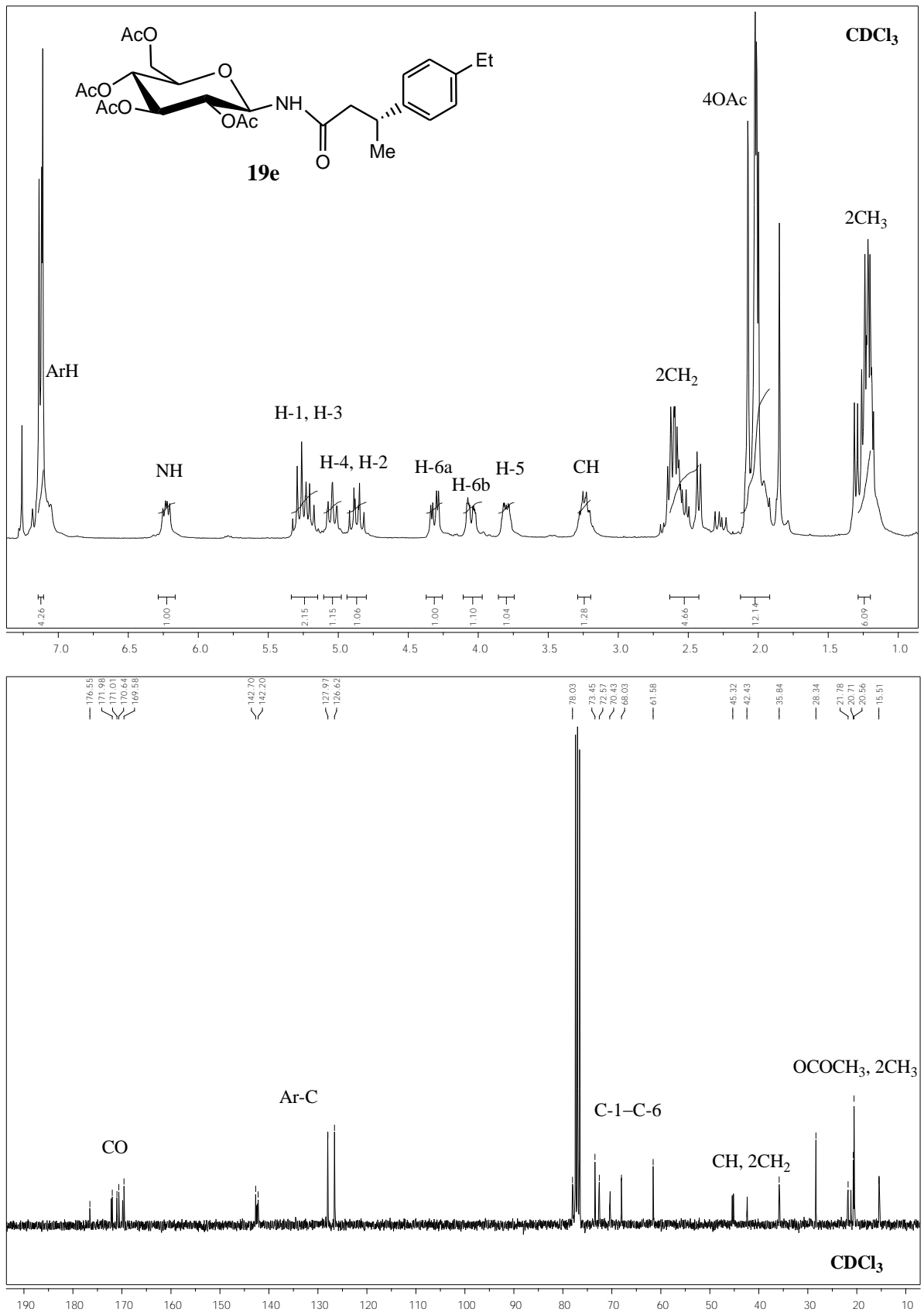
Σχήμα 11. Φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR ένωσης **19c**.



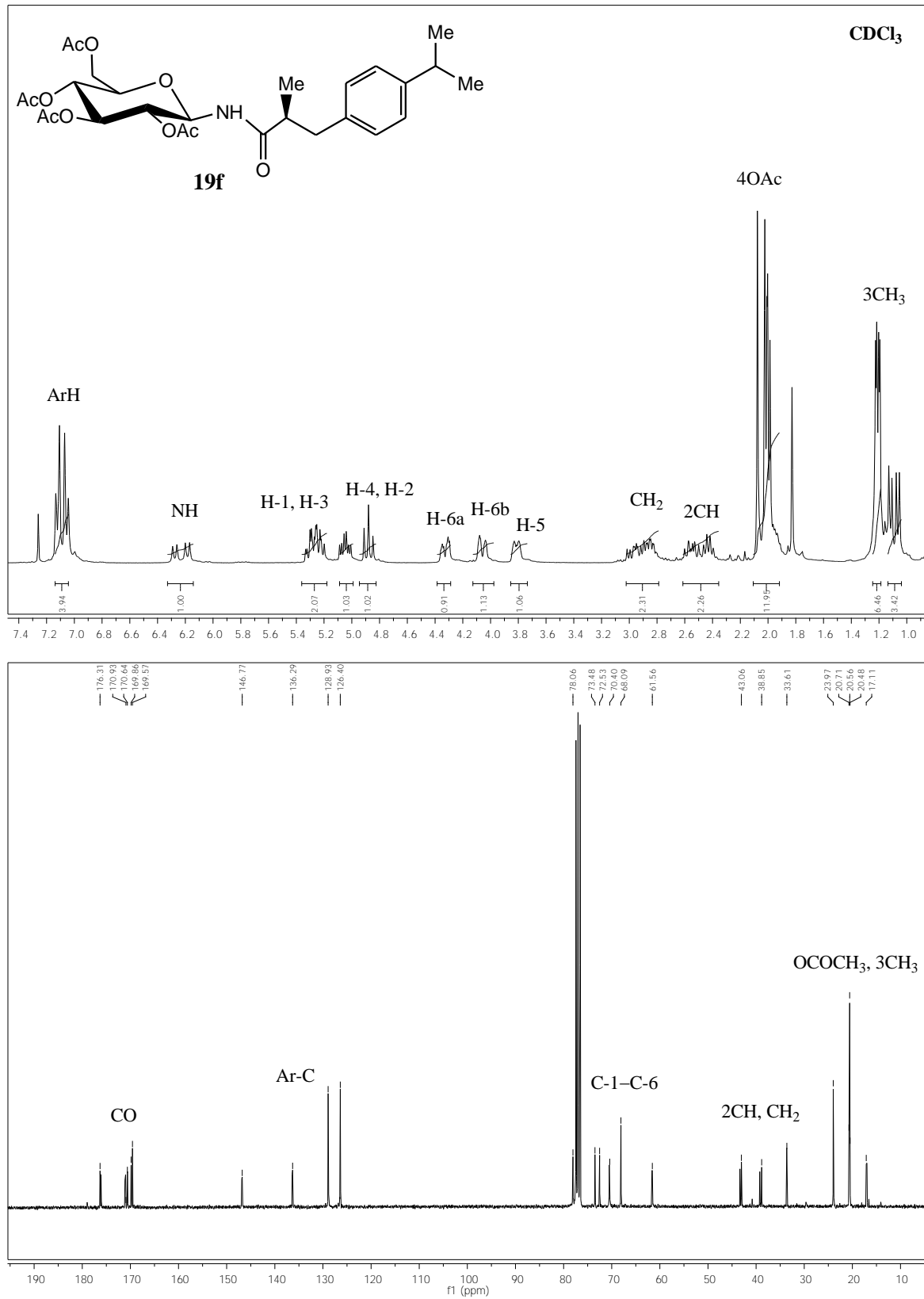
Σχήμα 12. Φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR ένωσης **19d**.



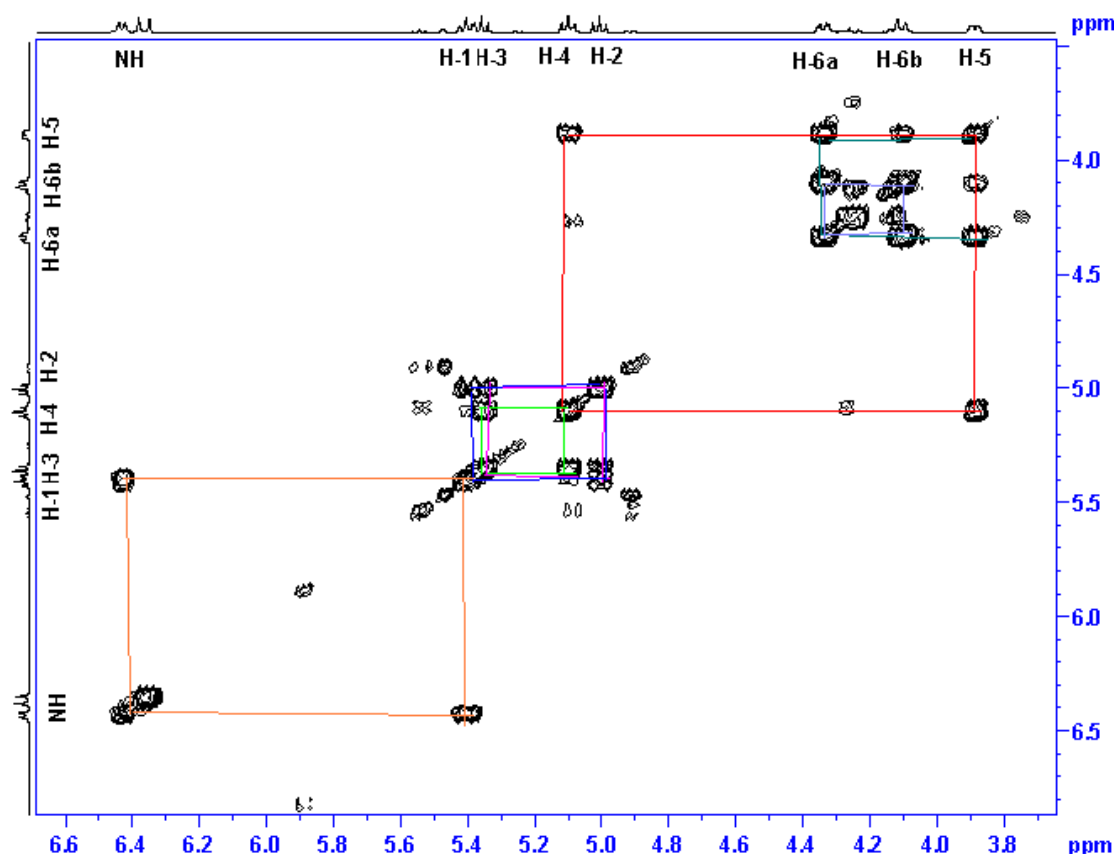
Σχήμα 13. Φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR ένωσης **19e**.



Σχήμα 14. Φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR ένωσης **19f**.



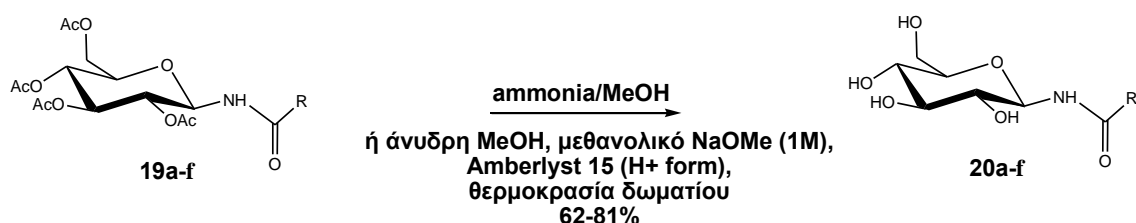
Στο παρακάτω σχήμα παρατίθεται το φάσμα ^1H - ^1H COSY της προστατευμένης ένωσης **19a** όπου παρατηρείται αρχικά η διπλή κορυφή της NH ομάδας η οποία συσχετίζεται με το πρωτόνιο H-1 στην περιοχή 5.44-5.33 ppm ενώ ακολουθεί το πρωτόνιο H-3 το οποίο αλληλεπιδρά με τα πρωτόνια H-4 και H-2 στα 5.11 και 5.01 ppm, αντίστοιχα. Εμφανίζονται, τέλος, στο φάσμα COSY, τα πρωτόνια H-6a και H-6b και οι μεταξύ τους συσχετισμοί με το πρωτόνιο H-5 στα 3.89 ppm.



Αξιοσημείωτο είναι δε το γεγονός ότι κατά το φασματοσκοπικό χαρακτηρισμό της ένωσης **19f** παρατηρήθηκε το φαινόμενο της παρεμποδιζόμενης περιστροφής πέριξ του αμιδικού δεσμού (hindered rotation), όπως προκύπτει από τα πολλαπλά σήματα πρωτονίου τόσο στην περιοχή του σακχάρου, όσο και του υποκαταστάτη (Σχήμα 14, φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR της ένωσης). Το φαινόμενο αναλύεται περαιτέρω στην επόμενη παράγραφο. (IIa.2)

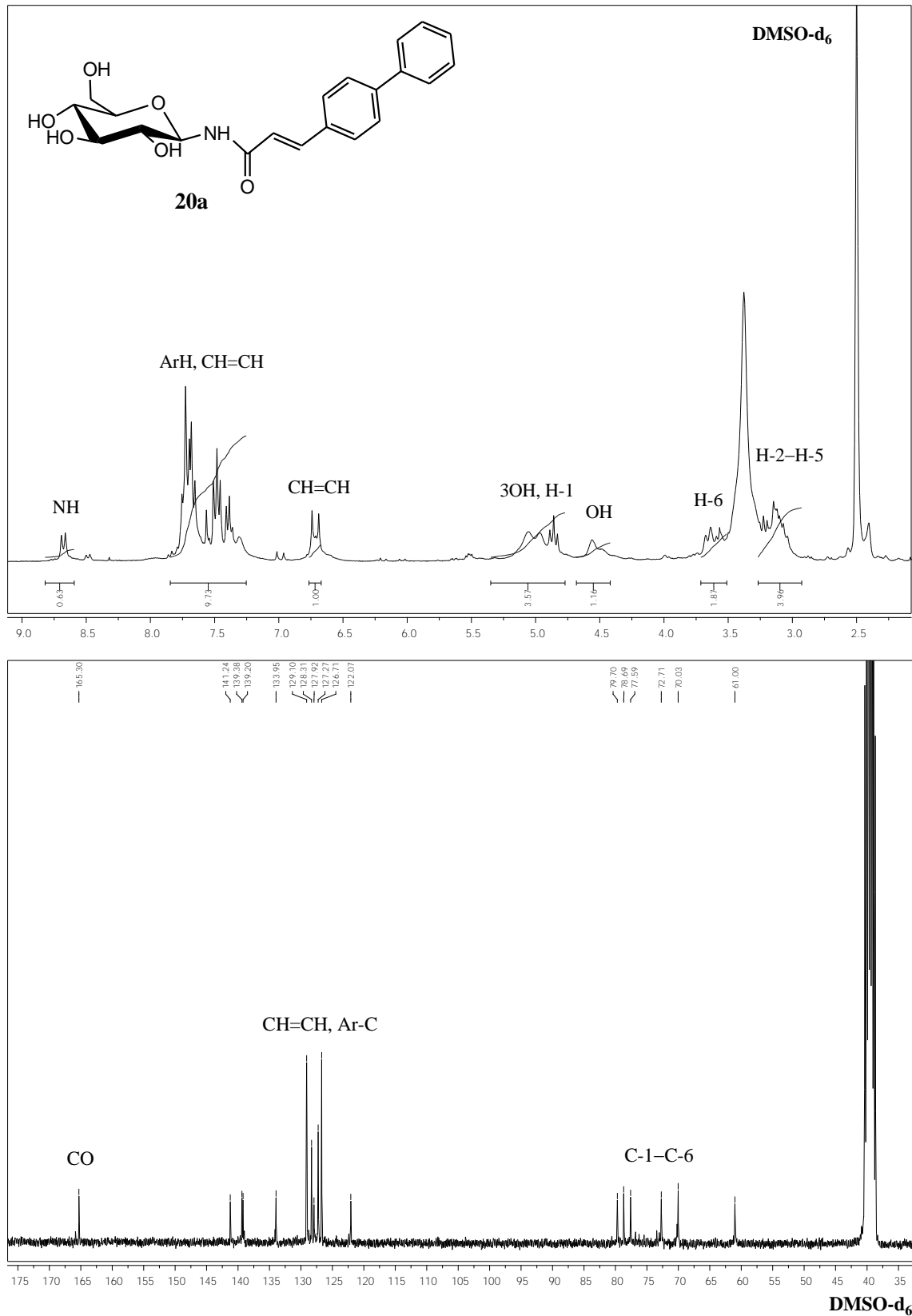
Για τη λήψη τέλος των επιθυμητών τελικών προϊόντων **20a-f**, ακολούθησε αποπροστασία των ενώσεων **19a-f** σε διάλυμα μεθανολικής αμμωνίας (κορεσμένη στους 0 °C) για 24 h. Μετά το πέρας των 24 h ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό και οι ενώσεις ελήφθησαν ως παχύρευστα έλαια σε ικανοποιητικές έως πολύ καλές αποδόσεις (68-81%). Στα φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR των ενώσεων **20a-f**, που

ελήφθησαν εκτός από την ύπαρξη του επιθυμητού προϊόντος παρατηρήθηκαν και κορυφές στα ~1.5 ppm (^1H NMR) και ~170 και ~21 ppm (^{13}C NMR). Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι οι συγκεκριμένες κορυφές δεν ξαναεμφανίστηκαν στα ίδια φάσματα όταν έγινε αποπροστασία με την ίδια μέθοδο ακολουθούμενη από τον καθαρισμό του προκύπτοντος ελαίου με χρωματογραφία στήλης. Οι κορυφές αυτές αποδόθηκαν στο ακεταμίδιο κατά την αποπροστασία, που, όμως, δεν εμφανίζεται στο TLC κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Για να επιβεβαιωθεί η ανωτέρω υπόθεση πραγματοποιήθηκε αποπροστασία με μεθοξείδιο του νατρίου σε άνυδρη μεθανόλη, σε θερμοκρασία δωματίου, ως σχηματισμό των επιθυμητών προϊόντων **20a-f**. Το διάλυμα εξουδετερώθηκε με όξινη ρητίνη (Amberlyst 15), διηθήθηκε, ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό και στο προκύπτον έλαιο πραγματοποιήθηκε επίσης χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διαλυτών οξικός αιθυλεστέρας/ μεθανόλη σε αναλογία 4:1 (Σχήμα 15).

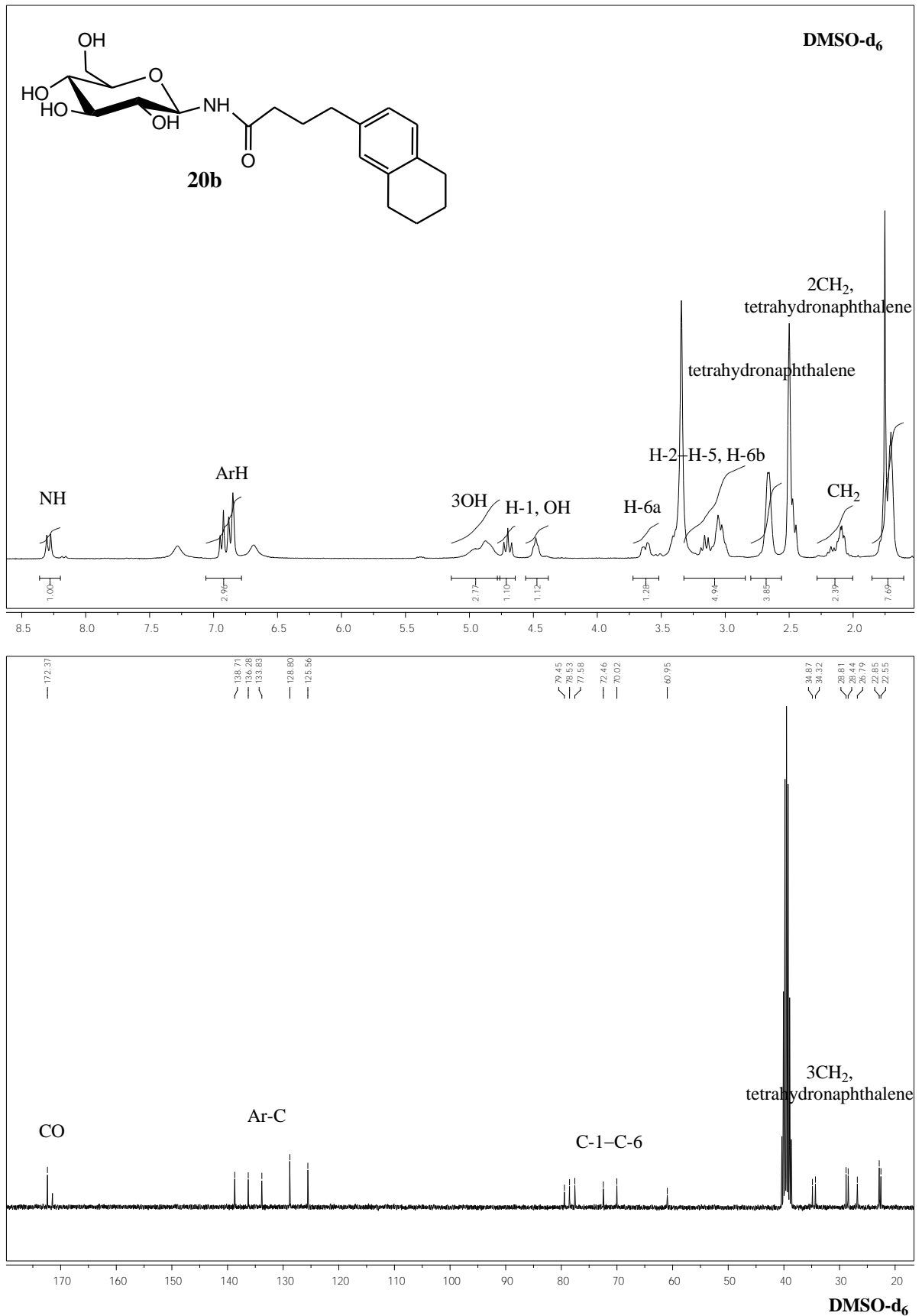


Σχήμα 15. Σύνθεση των αποπροστατευμένων *N*-ακυλο- β -D-γλυκοκυρανοζυλαμινών **20a-f** είτε με διάλυμα μεθανολικής αμμωνίας (κορεσμένη στους 0 °C) είτε με μεθοξείδιο του νατρίου.

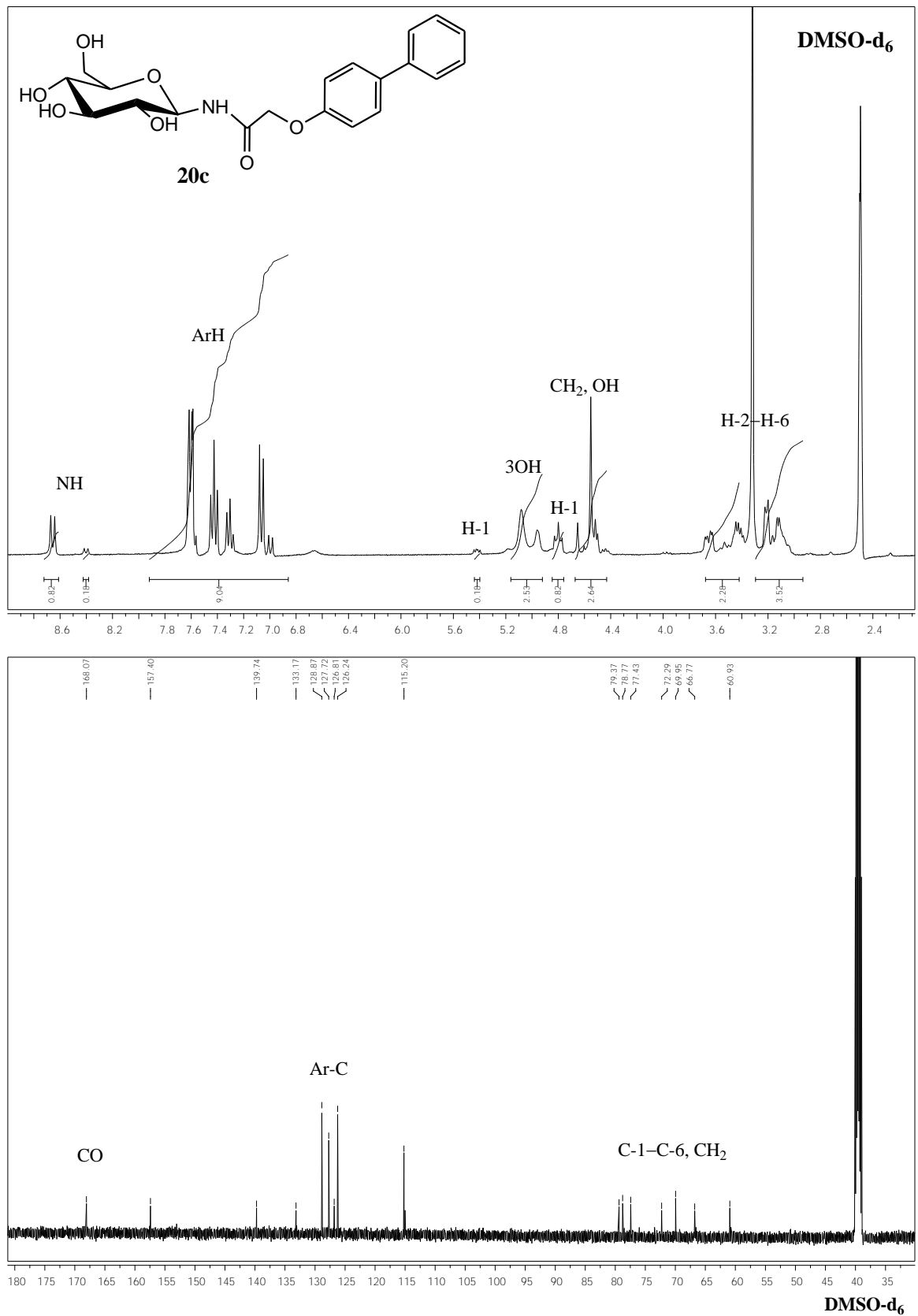
Τα φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR των τελικών ενώσεων **20a-f** απεικονίζονται στα σχήματα 16 έως και 21, αντίστοιχα. Κατά το φασματοσκοπικό χαρακτηρισμό των ενώσεων **20c** και **20f** παρατηρήθηκε επίσης το φαινόμενο της παρεμποδιζόμενης περιστροφής γύρω από τον αμιδικό δεσμό, όπως προκύπτει από τα πολλαπλά σήματα πρωτονίου τόσο στην περιοχή του σακχάρου όσο και του υποκαταστάτη (Σχήμα 18 και 21, φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR των ενώσεων **20c** και **20f**, αντίστοιχα).

Σχήμα 16. Φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR της ένωσης **20a**.

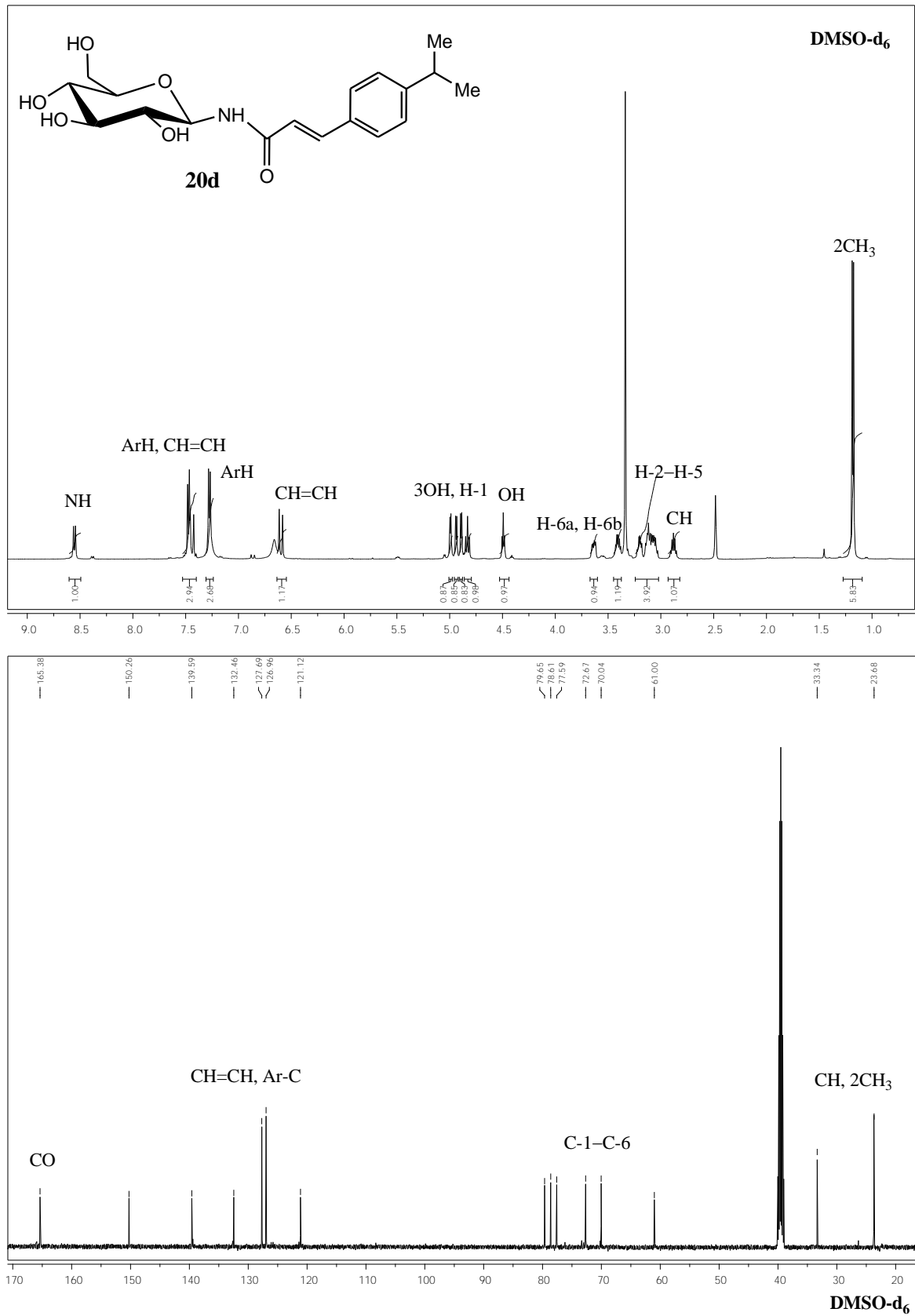
Σχήμα 17. Φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR της ένωσης **20b**.



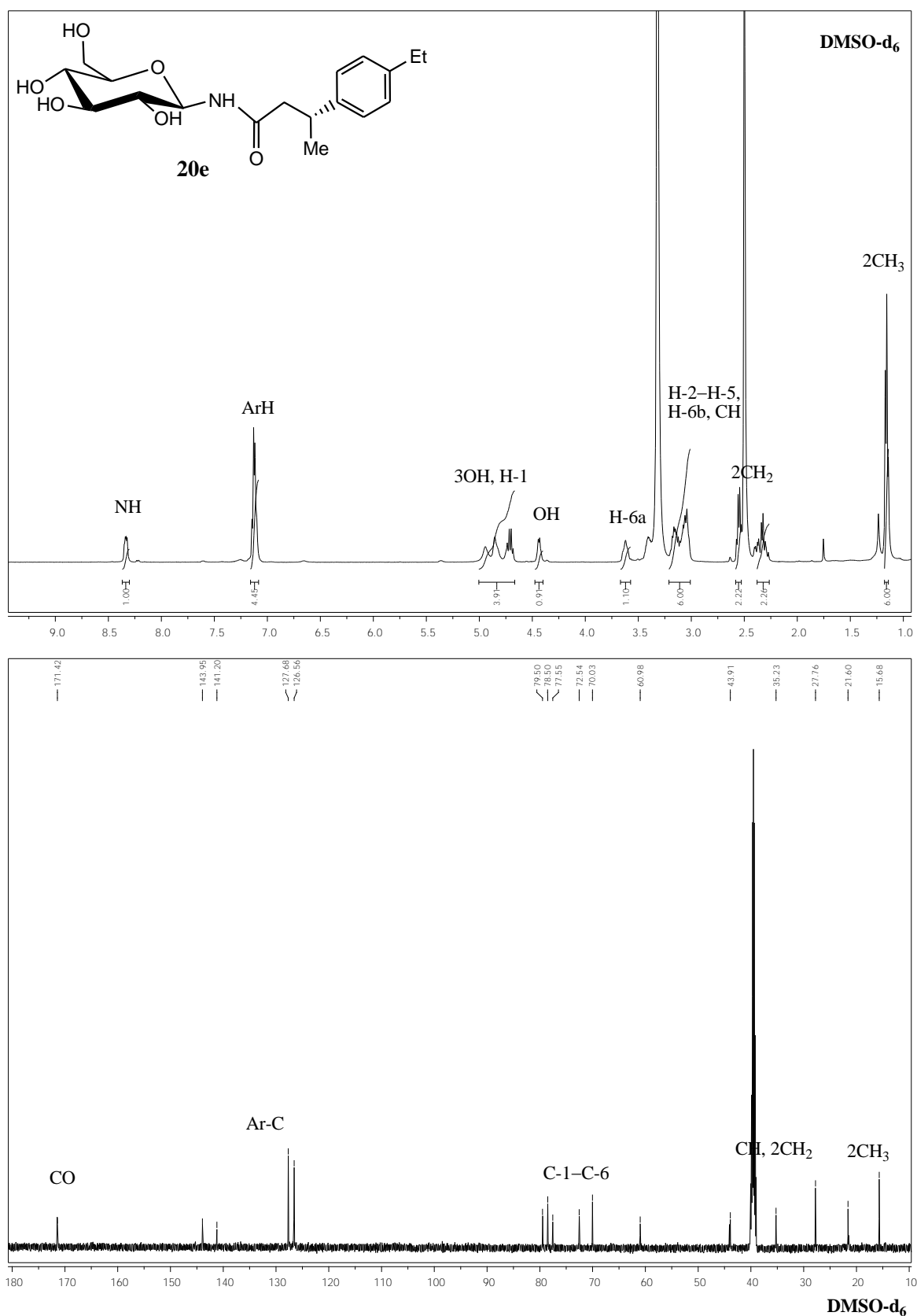
Σχήμα 18. Φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR της ένωσης **20c**.



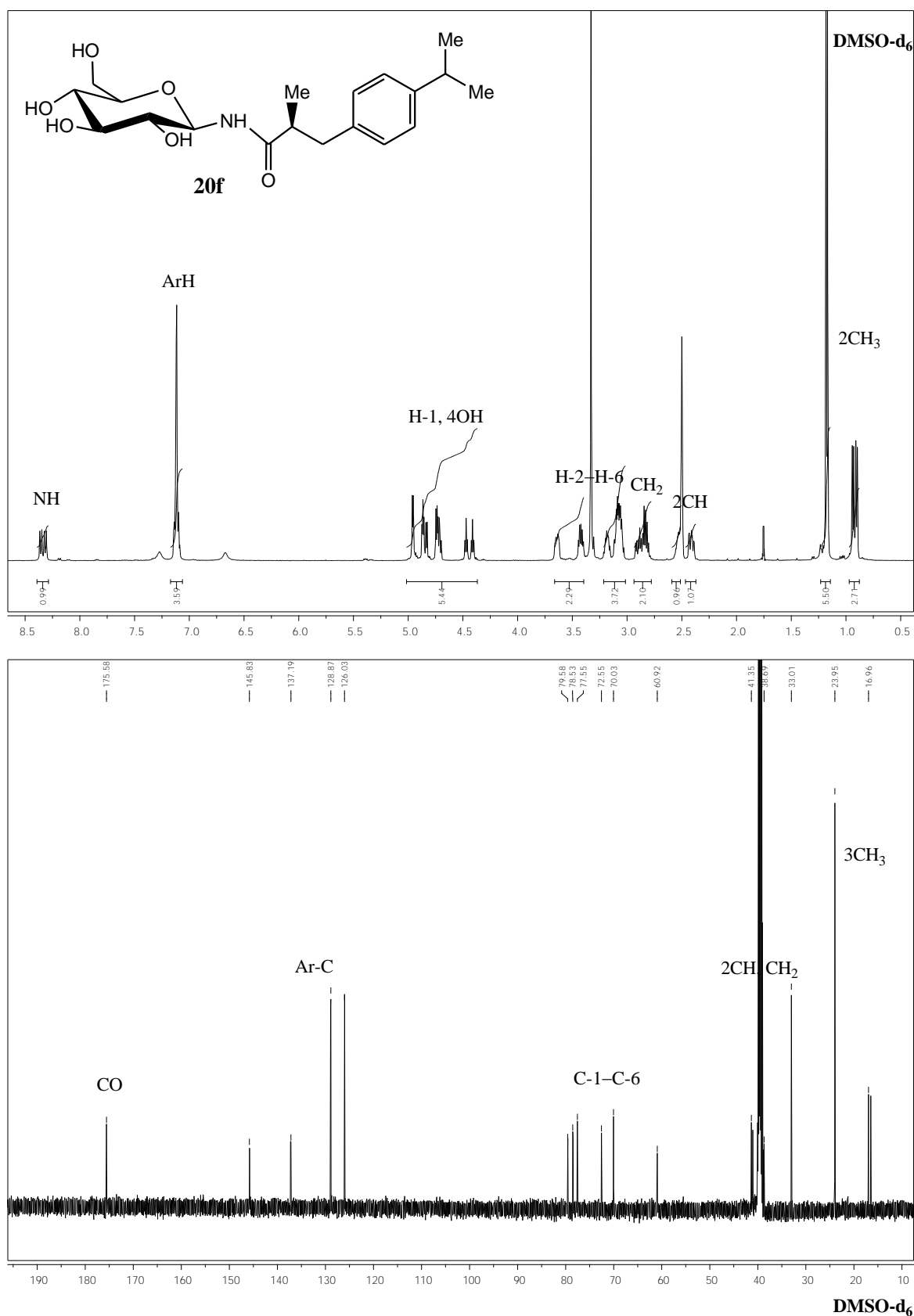
Σχήμα 19. Φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR της ένωσης **20d**.



Σχήμα 20. Φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR της ένωσης 20e.

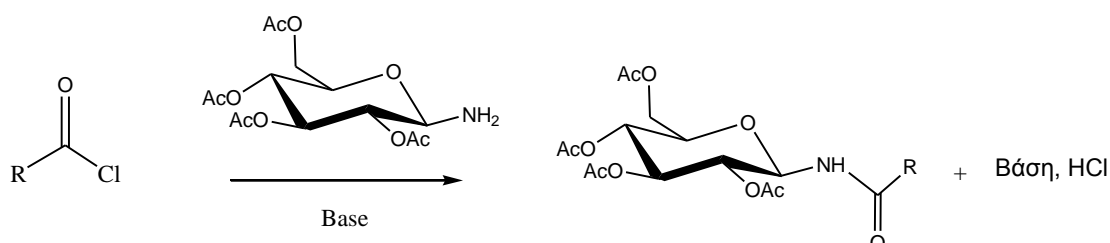


Σχήμα 21. Φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR της ένωσης **20f**.



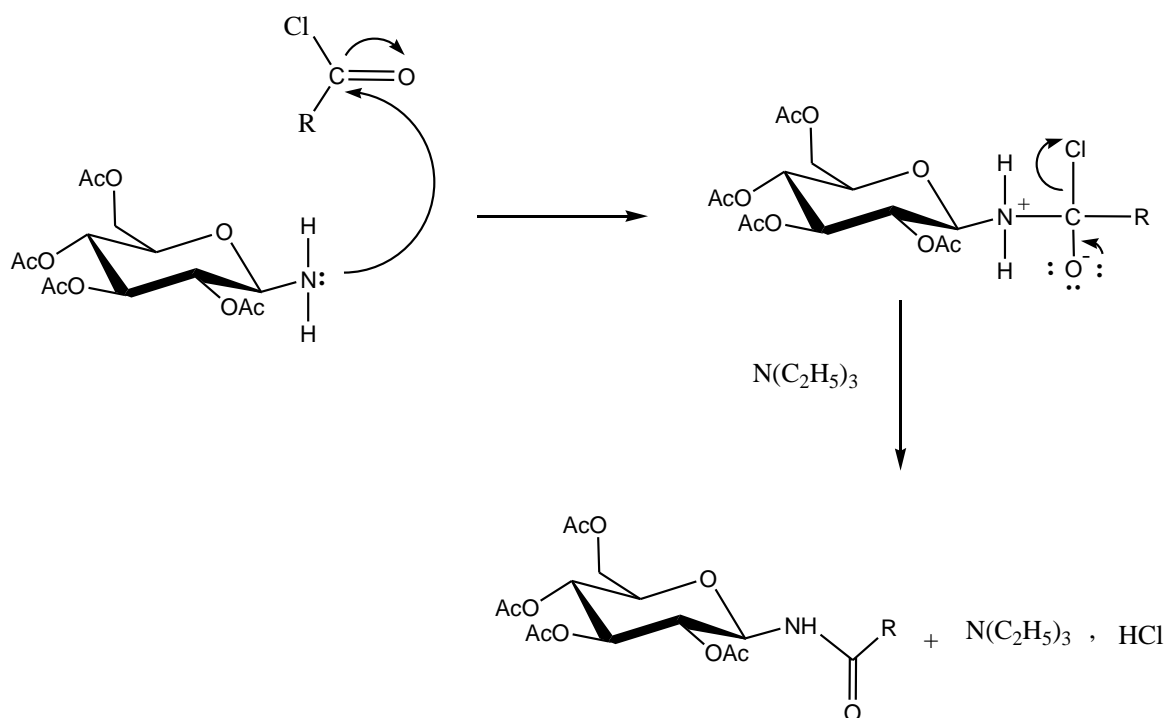
Πα.2. Σχηματισμός αμιδικού δεσμού και παρεμποδιζόμενη περιστροφή πέριξ του αμιδικού δεσμού (hindered rotation)

Ο αμιδικός δεσμός σχηματίζεται κατόπιν αντίδρασης σύζευξης του αντίστοιχου ακυλοχλωριδίου με την αμίνη. (Σχήμα. 22)



Σχήμα 22. Αμινόλυση

Στις αντιδράσεις αυτού του τύπου μία επιπρόσθετη βάση είναι απαραίτητη ώστε να δεσμευθεί το σχηματιζόμενο HCl και να αποφευχθεί ο σχηματισμός του αντίστοιχου άλατος (Montalbetti *et al.*, 2005). Το ρόλο της βάσης αυτής διαδραματίζει η τριαθυλαμίνη (Et₃N). Ο μηχανισμός της αντίδρασης απεικονίζεται ως εξής:



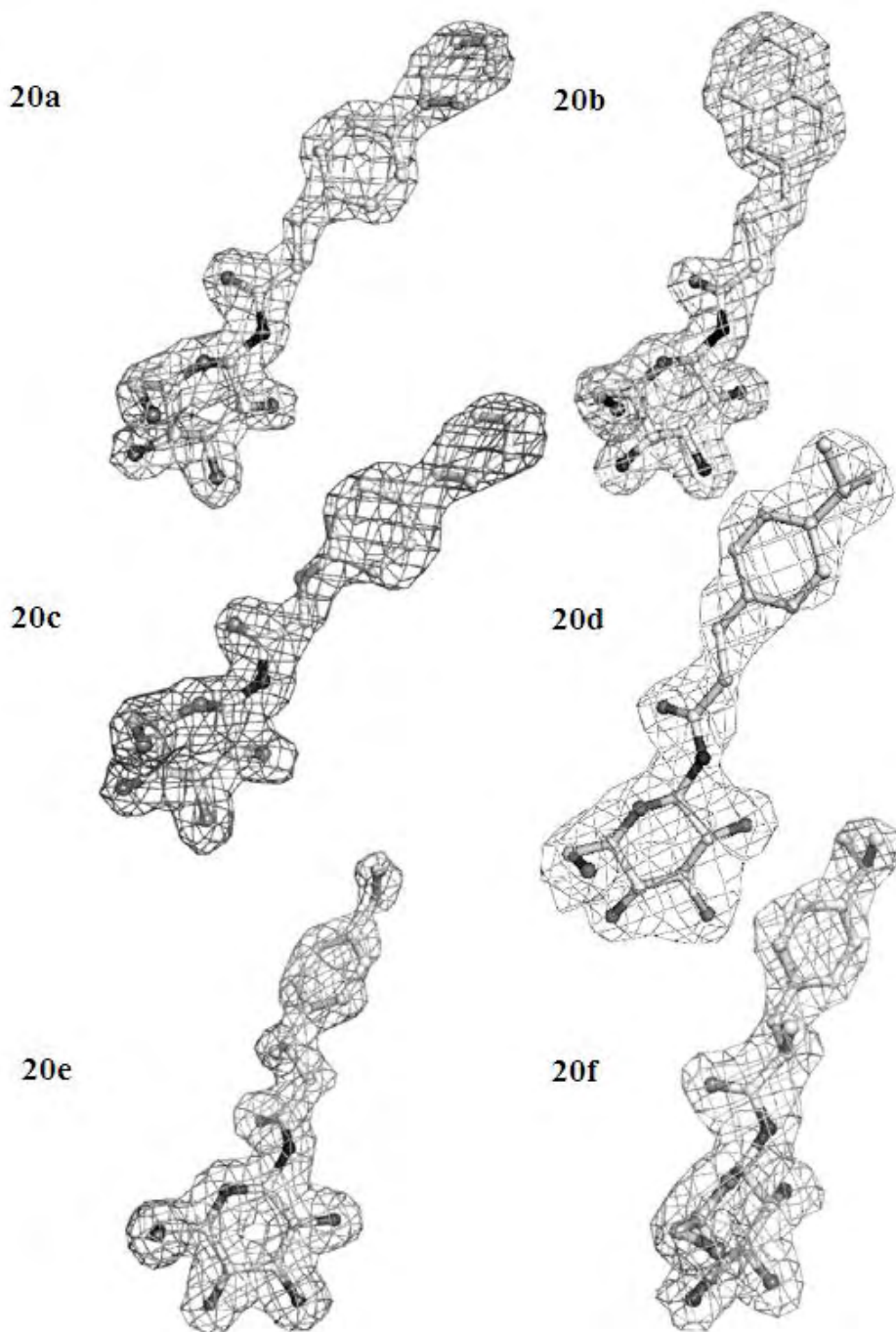
Ένα φαινόμενο που έχει απασχολήσει το επιστημονικό κοινό και βρίσκεται υπό μελέτη είναι αυτό της παρεμποδιζόμενης περιστροφής πέριξ του αμιδικού δεσμού, και αυτό διότι ο αμιδικός δεσμός είναι ένα δομικό στοιχείο πολλών βιολογικών συστημάτων, όπως π.χ οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα. Δεδομένο είναι ότι η

περιστροφή του C-N δεσμού στο μόριο λαμβάνει χώρα με αργό ρυθμό, καθώς περιλαμβάνει την «αποδιάταξη» ενός διπλού δεσμού και επηρεάζεται από παράγοντες όπως ο διαλύτης αλλά και το είδος του υποκαταστάτη που βρίσκεται παρακείμενα ο οποίος μπορεί να ευνοεί ή να αποτρέπει την περιστροφή. Το γεγονός αυτό είναι που καθορίζει τελικά και την αναλογία μεταξύ της *syn*- και *anti*- διαμόρφωσης (Smith *et al.*, 2004).

Τα στερεοϊσομερή που προέκυψαν κατά τη σύνθεση των ενώσεων **19f**, **20c** και **20f** ήταν χρωματογραφικά μη διαχωρίσιμα και εμφάνισαν όπως φάνηκε στα φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR χαρακτηριστικά σήματα (Σχήματα 14, 18 και 21).

Πα.3. Κρυσταλλογραφική μελέτη *N*-ακυλο- β -D-γλυκοπυρανοζυλαμινών

Η μελέτη που πραγματοποιήθηκε περιελάμβανε την κρυστάλλωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b (διαμόρφωση T), τον εμποτισμό κρυστάλλου με διάλυμα της υπό μελέτη ουσίας, τη συλλογή και την επεξεργασία των κρυσταλλογραφικών δεδομένων. Στη συνέχεια η δομή της GPb ως συμπλόκου με την α -D-γλυκόζη χρησιμοποιήθηκε ως αρχικό μοντέλο το οποίο υποβλήθηκε σε βελτιστοποίηση έναντι των πειραματικών δεδομένων για τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής του νέου συμπλόκου.



Εικόνα 7. Στερεοδιάγραμμα του τελικού μοντέλου των *N*-ακυλο- β -D-γλυκοπυρανοζυλαμινών **20a-f** και του χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας 2Fo-Fc.

Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν οι κρυσταλλικές δομές των συμπλόκων των έξι αναστολέων με τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Όλοι οι αναστολείς βρέθηκαν ότι προσδένονται στο ενεργό κέντρο όπως φάνηκε και στους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας (Εικόνα 7). Το σημείο πρόσδεσης κάθε αναστολέα είναι το γλυκοζιτικό τμήμα, το οποίο δεσμεύεται μέσω αλληλεπιδράσεων δεσμών υδρογόνου και van der

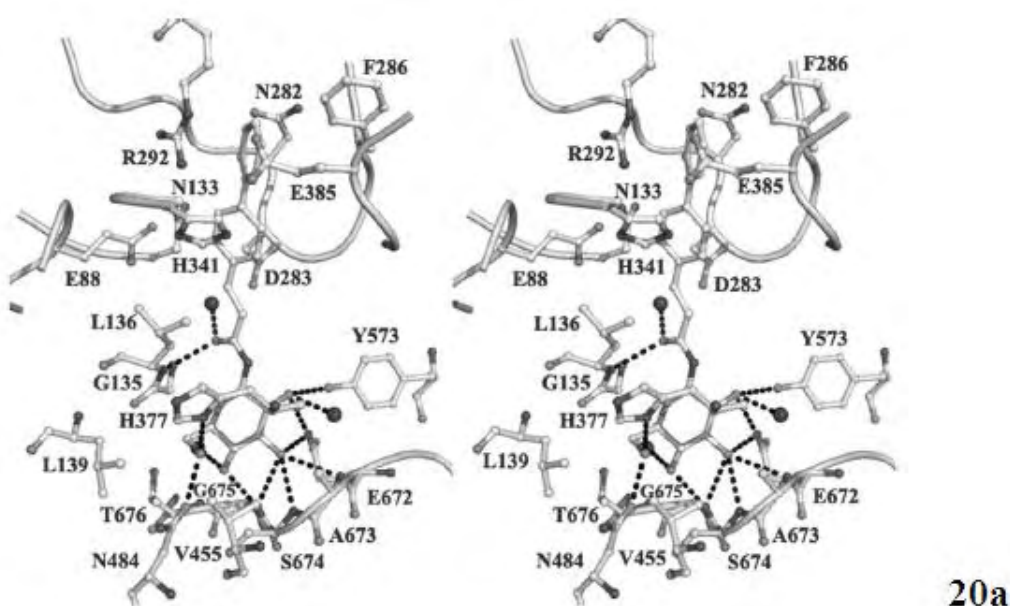
Waals με κατάλοιπα του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου σχεδόν πανομοιότυπες με εκείνες που παρατηρούνται για τη γλυκόζη και άλλους αναστολείς-ανάλογα γλυκόζης. Οι αναστολείς **20a** και **20c**, που είναι και οι πιο ισχυροί, προσδέονται παρόμοια στη β-εσοχή συμμετέχοντας σε αλληλεπιδράσεις van der Waals με τα κατάλοιπα Glu88, Asn133, Tyr280, Asn282, Asp283, Phe286, Arg292, His341 και Glu385 του ενεργού κέντρου. Η εισαγωγή ενός αιθερικού οξυγόνου στον υποκαταστάτη (**20c**) αντί για μεθυλομάδα, δε φάνηκε να επηρεάζει την πρόσδεση καθώς το οξυγόνο αυτό δε συμμετέχει σε δεσμούς υδρογόνου με τα κατάλοιπα της πρωτεΐνης (Εικόνα 8). Οι αλληλεπιδράσεις van der Waals αυτού του οξυγόνου στο σύμπλοκο ενζύμου- αναστολέα **20c** είναι όμοιες με εκείνες του αντίστοιχου άνθρακα στο αντίστοιχο σύμπλοκο με τον αναστολέα **20a**.

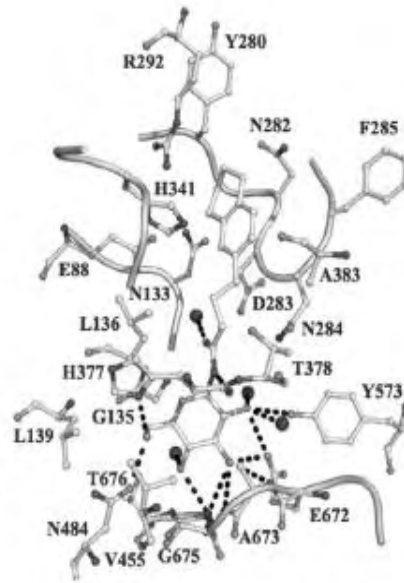
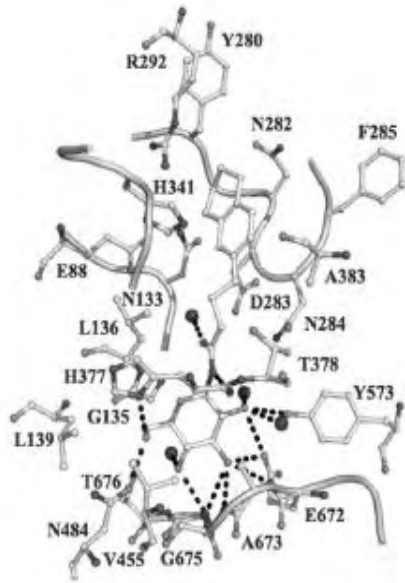
Οι αναστολείς **20d**, **20e** και **20f** προσδέονται όμοια αλλά με ουσιώδεις διαφοροποιήσεις σε σχέση με τους **20a** και **20c**. Οι υποκαταστάτες τους είναι πλησιέστερα στην περιοχή του βρόχου 280s στην ελεύθερη GPb σε σχέση με εκείνους των **20a** και **20c**, αντίστοιχα. Ωστόσο, οι μεθυλομάδες των **20d** και **20f** καθώς και το αιθύλιο του **20e**, στο βενζολικό δακτύλιο, οριοθετούνται στην ίδια περιοχή και εμπλέκονται σε παρόμοιες αλληλεπιδράσεις van der Waals με τα κατάλοιπα Tyr280, Asn282, Phe285, His341 και Ala383. Οι μεθυλομάδες των υποκαταστατών των αναστολέων **20e** και **20f** διευθετούνται προς την ίδια κατεύθυνση και συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις van der Waals με άτομα των πλευρικών αλυσίδων των καταλοίπων Leu136 και Asp339. Ο αναστολέας **20b** προσδέεται όμοια με τον **20a** αλλά ακολουθεί διαφορετική κατεύθυνση ώστε να τοποθετείται στο σημείο όπου προσδέονται τα φαινύλια των **20a** και **20b** δημιουργώντας παρόμοιες αλληλεπιδράσεις van der Waals με τα κατάλοιπα της πρωτεΐνης.

Οι παρατηρούμενες αλλαγές στη διαμόρφωση του υποκαταστάτη καθορίζονται πιθανότατα από την αρχιτεκτονική της β-εσοχής στην πρωτεΐνη και τα υδρόφοβα χαρακτηριστικά της που τον έλκουν και στους έξι αναστολείς. Έτσι καθώς ο υποκαταστάτης έλκεται στην περιοχή αυτή, ο σύνδεσμος επαναπροσδιορίζεται (σύμφωνα με τη στερεοχημεία του) στις δομές που είναι ελεύθερες. Με τον τρόπο αυτό, φαίνεται ότι ο υποκαταστάτης των ικανότερων αναστολέων περιορίζει την κίνηση του βρόχου μακριά από το ενεργό κέντρο κάνοντας χώρο για τον αναστολέα. Τα άτομα των καταλοίπων 282-287 όταν συγκριθούν με εκείνα της ελεύθερης GPb δείχνουν μια μετατόπιση σε σχέση με εκείνα των συμπλόκων ενζύμου-αναστολέα,

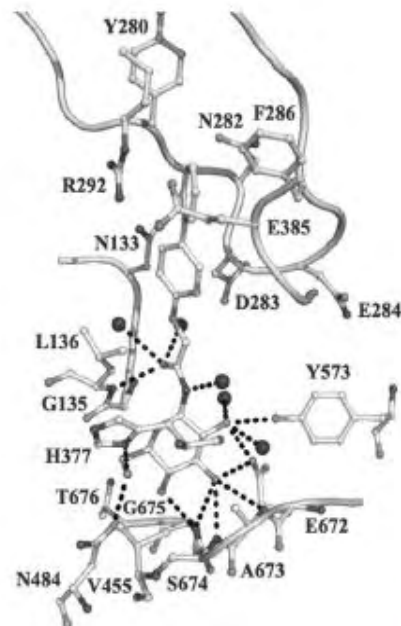
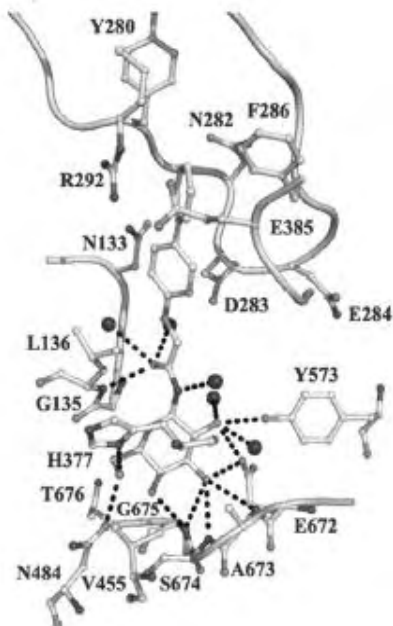
αντίστοιχα. Από τις τιμές αυτές γίνεται κατανοητό ότι οι αναστολείς **20b** και **20e** προκαλούν τη μικρότερη αναδιάταξη στο βρόχο 280s. Όταν συγκρίνουμε τη δομική μεταβολή στο βρόχο που προκαλείται από κάθε αναστολέα φαίνεται ότι οι **20a**, **20b** και **20e** μόλις που τον διαταράσσουν ενώ οι υπόλοιποι προκαλούν μεγαλύτερες αλλαγές.

Συνοπτικά, στα σύμπλοκα με τους αναστολείς **20c**, **20d** και **20f** η Asp283 και η Asn284 απομακρύνονται από το μόριο του αναστολέα αναδιοργανώνοντας και τα υπόλοιπα κατάλοιπα του βρόχου. Πιο συγκεκριμένα, η Asn284 στρέφεται 180° και τοποθετείται μεταξύ των φαινυλίων της Phe285 και Tyr613, δύο κατάλοιπα στην είσοδο του ενεργού κέντρου του ενζύμου στην περιοχή όπου προσδέεται ο αναστολέας. Η αναδιάταξη του βρόχου 280s που οδηγεί στη μετάπτωση του ενζύμου από την κατάσταση R στην T έχει παρουσιαστεί και σε άλλα σύμπλοκα ενζύμου-αναστολέα. Στην παρακάτω εικόνα συνοψίζονται οι αλληλεπιδράσεις των νέων ενώσεων με το ένζυμο.

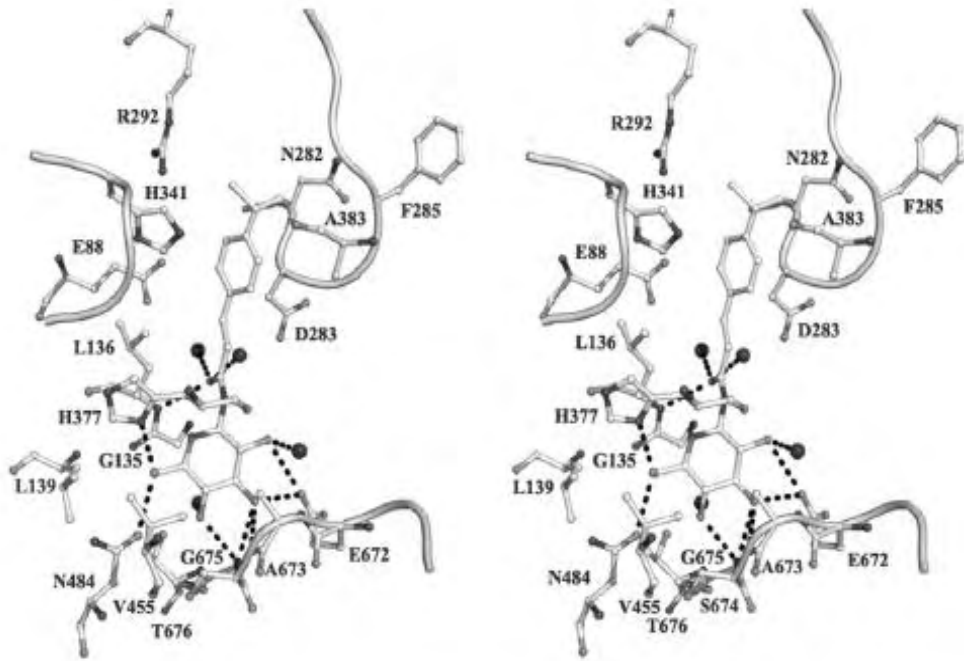




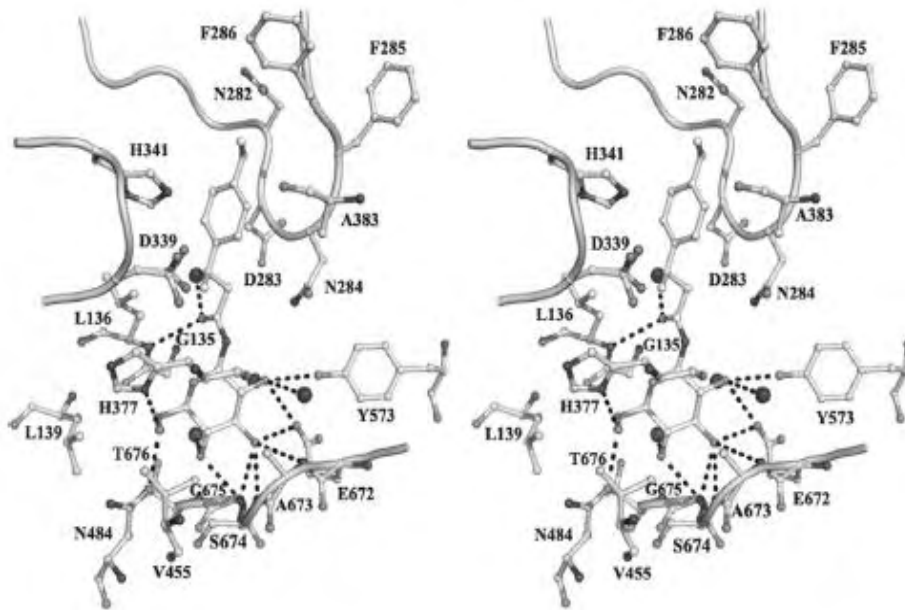
20b



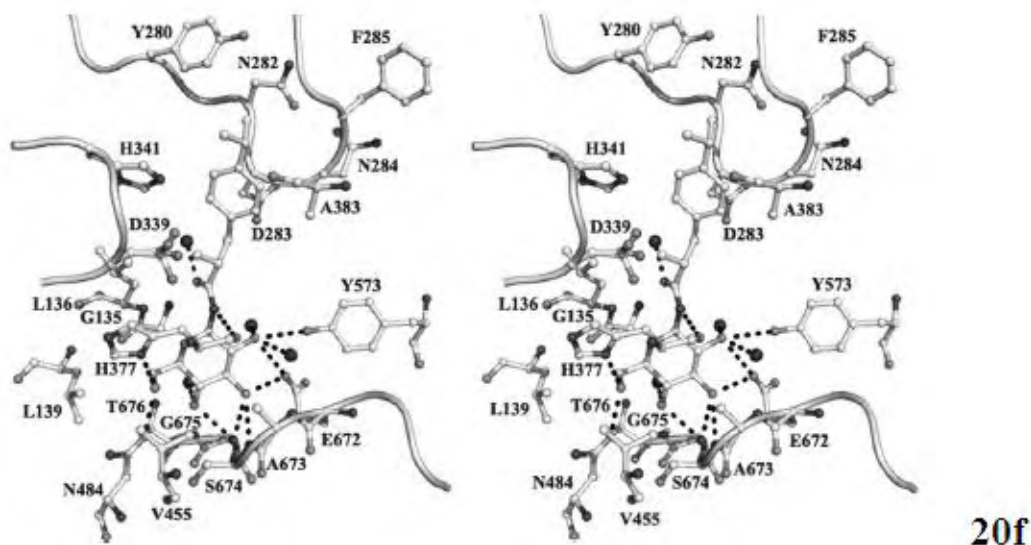
20c



20d



20e



Εικόνα 8. Στερεοσκοπική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων των *N*-ακυλο- β -D-γλυκοπυρανοζυλαμινών **20a-f** με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου. Στην εικόνα παρουσιάζονται τα μόρια ύδατος ως μαύρες σφαίρες ενώ οι δεσμοί υδρογόνου αναπαριστώνται με διακεκομμένες γραμμές.

Πίνακας 5. Δεσμοί υδρογόνου των *N*-ακυλο- β -D-γλυκοπυρανοζυλαμινών **20a-f** με τα κατάλοιπα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου στην κρυσταλλική μορφή.

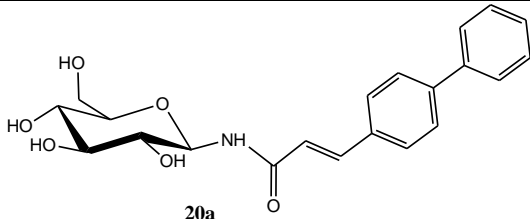
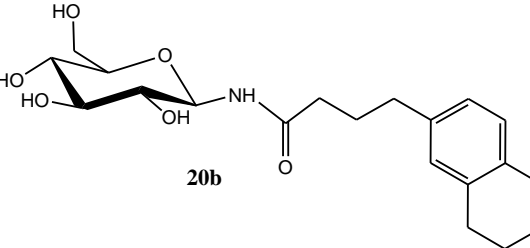
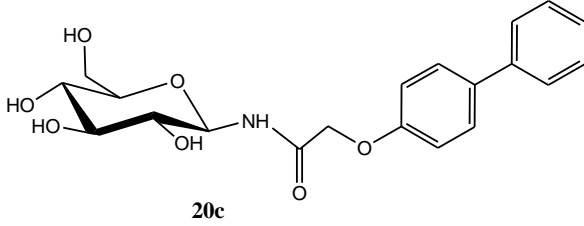
Inhibitor atom	Protein atom	Distance (Å)					
		20a	20b	20c	20d	20e	20f
O2'	Tyr573 OH	3.2	3.1	3.1	-	3.1	3.2
	Glu672 OE1	3.2	3.2	3.1	3.1	3.0	3.1
	Water	2.6	2.6	2.7	2.7	3.2	2.8
	Water	-	2.8	2.9	-	2.8	2.7
O3'	Glu672 OE1	2.8	2.8	2.8	2.6	2.8	2.8
	Ala673 N	3.3	3.3	3.3	-	3.3	-
	Ser674 N	3.0	3.0	3.1	3.1	3.0	2.9
O4'	Gly675 N	3.2	3.1	3.3	3.0	3.1	3.0
	Water	2.8	2.9	2.8	2.8	2.9	2.9
O6'	His377 ND1	2.7	2.7	2.6	2.6	2.7	2.8
	Asn484 OD1	2.7	2.8	2.9	2.9	2.8	2.7
O3	Leu136 N	3.0	-	3.0	3.0	3.2	-
	Water	2.8	2.8	3.0	3.1	2.6	-
	Water	-	-	3.2	2.9	-	2.7
N1	His377 O	-	2.9	-	-	-	3.3
	Water	-	-	2.8	-	-	-
Total		13	14	16	12	14	13

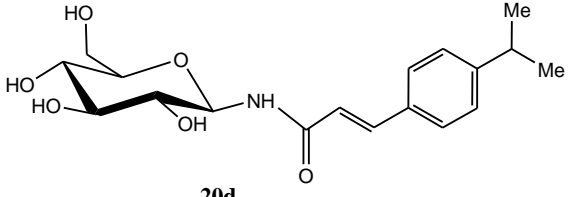
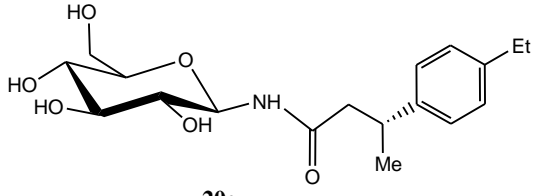
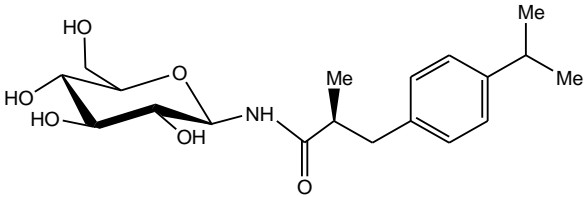
Πα.4. Κινητική μελέτη *N*-ακυλο- β -D-γλυκοκυρανοζυλαμινών

Η βιοδραστικότητα των νέων αναστολέων αποτιμήθηκε στην gmGPb που είχε προηγούμενα απομονωθεί από το μυϊκό ιστό κουνελιού. Δεδομένου ότι η ανθρώπινη GP του ήπατος και η gmGPb έχουν πανομοιότυπη αλληλουχία αμινοξέων και αρχιτεκτονική δομή στο καταλυτικό κέντρο αναμένεται ότι οι αναστολείς θα έχουν παρόμοια δράση και στα δυο ισoenζυμα.

Όλοι οι αναστολείς επέδειξαν συναγωνιστική αναστολή ως προς το υπόστρωμα (1-φωσφορική γλυκόζη), ενώ οι ισχυρότεροι αναστολείς εμφανίστηκαν κατά σειρά οι **20d** ($K_i = 4.98 \mu\text{M}$), **20a** ($K_i = 5.14 \mu\text{M}$) και **20c** ($K_i = 8.25 \mu\text{M}$). Ο βαθμός ελευθερίας του συνδέσμου που συνδέει το σάκχαρο με το αρωματικό τμήμα, στους αναστολείς **20b**, **20f** και **20e** αντίστοιχα, φαίνεται να επηρεάζει την ικανότητα αναστολής τους. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

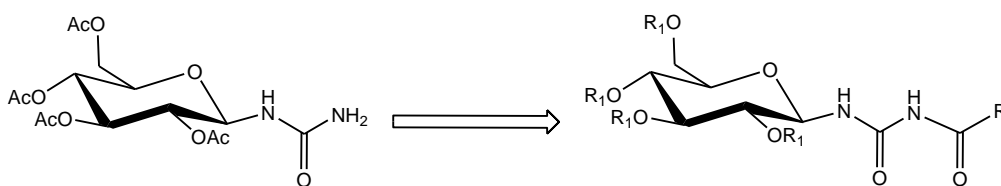
Πίνακας 6: Αποτελέσματα κινητικής μελέτης *N*-ακυλο- β -D-γλυκοκυρανοζυλαμινών **20a-f**.

Ένωση	K_i (μM)
 <p>20a</p>	5.14 ± 0.77
 <p>20b</p>	48.68 ± 4.49
 <p>20c</p>	8.25 ± 0.77

 <p style="text-align: center;">20d</p>	4.98. ± 0.58
 <p style="text-align: center;">20e</p>	376.87 ± 17.04
 <p style="text-align: center;">20f</p>	75.29 ± 6.96

Πα.5. Σύνθεση *N*-ακυλο-*N'*-β-D-γλυκοκυρανοζυλουριών

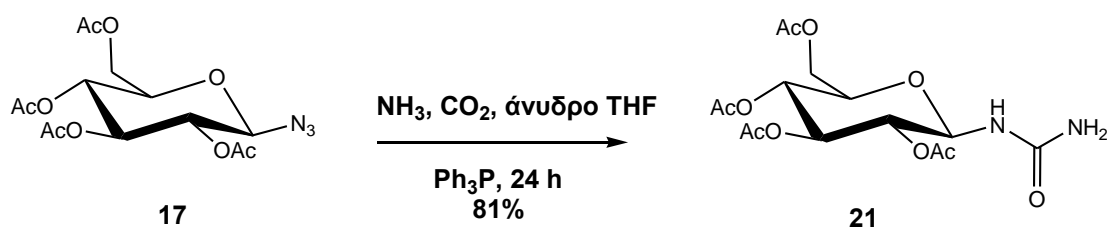
Εφόσον πραγματοποιήθηκε η σύνθεση των *N*-ακυλο-β-D-γλυκοκυρανοζυλαμινών **20a-f** και διαπιστώθηκαν όλα τα κινητικά και χαρακτηριστικά πρόσδεσης των νέων αναστολέων στο ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου, αποφασίστηκε η αντικατάσταση του συνδέσμου NHCO από τον μακρύτερο NHCONHCO, ώστε να διερευνηθούν οι αλληλεπιδράσεις των νέων μορίων που θα έφεραν τους ίδιους υποκαταστάτες σε σχέση με τα μητρικά. Για τη σύνθεση των επιθυμητών *N*-ακυλο-*N'*-β-D-γλυκοκυρανοζυλουριών, ως αναστολέων έναντι του ενζύμου, από τη ρετροσυνθετική προσέγγιση προέκυψε ως πρόδρομη ένωση η κατάλληλη ακετυλιωμένη β-D-γλυκοκυρανοζυλουρία, η οποία στη συνέχεια συζεύχθηκε με τα εμπορικά διαθέσιμα ακυλοχλωρίδια **a-f** για τη δημιουργία των προστατευμένων αναλόγων, τα οποία έπειτα από αποπροστασία οδηγούν στα τελικά μόρια-στόχο όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα:



R₁ = Προστατευτική ομάδα ή υδρογόνο

Υποκαταστάτες (R)					
a	b	c	d	e	f

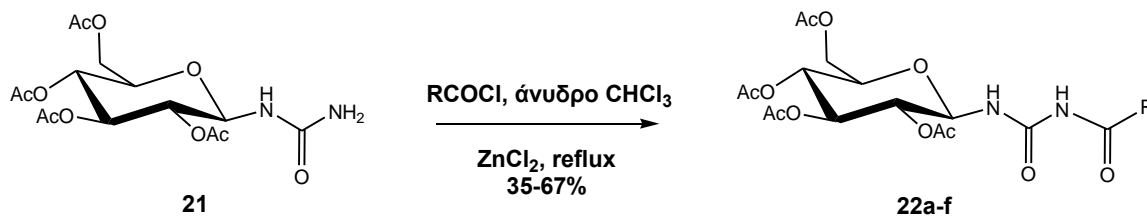
Αρχικά πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της 2,3,4,6-τετρακίς-*O*-ακετυλο- β -D-γλυκοκυρανοζυλουργίας (**21**) από το αζιδιοσάκχαρο **17** με τη μέθοδο του Pinter (Pinter *et al.*, 1995) (Σχήμα 23). Σε άνυδρο διαλύτη τετραϋδροφουράνιο (Tetrahydrofuran, THF), στο οποίο έχει παροχετευθεί ταυτόχρονα NH_3 και CO_2 για 30 λεπτά ως σχηματισμό του καρβαμδικού αμμωνίου με τη μορφή ιζήματος, προστίθεται διάλυμα της ένωσης **17** σε THF, και αμέσως μετά προστίθεται στάγδην διάλυμα τριφαινυλοφωσφίνης (Ph_3P) σε THF. Το εναιώρημα που προκύπτει αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h και εφόσον διαπιστωθεί η δημιουργία του επιθυμητού προϊόντος (TLC διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη 9.5:0.5), διηθείται και καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με διαλύτη έκλουσης το σύστημα διαλυτών διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη σε αναλογία 9.5:0.5, οπότε η ένωση **17** λαμβάνεται με απόδοση 81%.



Σχήμα 23. Σύνθεση της 2,3,4,6-τετρακίς-*O*-ακετυλο- β -D-γλυκοκυρανοζυλουργίας με τη μέθοδο του Pinter. (Pinter *et al.*, 1995)

Εφόσον διαπιστώθηκε η διαθεσιμότητα της ουρίας **21**, η συγκεκριμένη ένωση χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια ως πρώτη ύλη για μια αντίδραση ακυλίωσης από τα ακυλογλωρίδια **a-f**. Σε διάλυμα των ακυλογλωριδίων **a-f** σε άνυδρο χλωροφόρμιο (CHCl_3) προστίθεται καταλυτική ποσότητα χλωριούχου ψευδαργύρου (ZnCl_2) και το προκύπτον εναιώρημα αναδεύεται με κάθετο ψυκτήρα ροής (reflux) ως τη δημιουργία του επιθυμητού προϊόντος (TLC *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 1:1). Στη συνέχεια το μίγμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου κι αφού εκχυλιστεί με CHCl_3 (x2), η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο Na_2SO_4 και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό

κενό. Οι ενώσεις **22a-f** λαμβάνονται σε απόδοση 35-67% ύστερα από χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διαλυτών *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας (1:1). (Σχήμα 24).



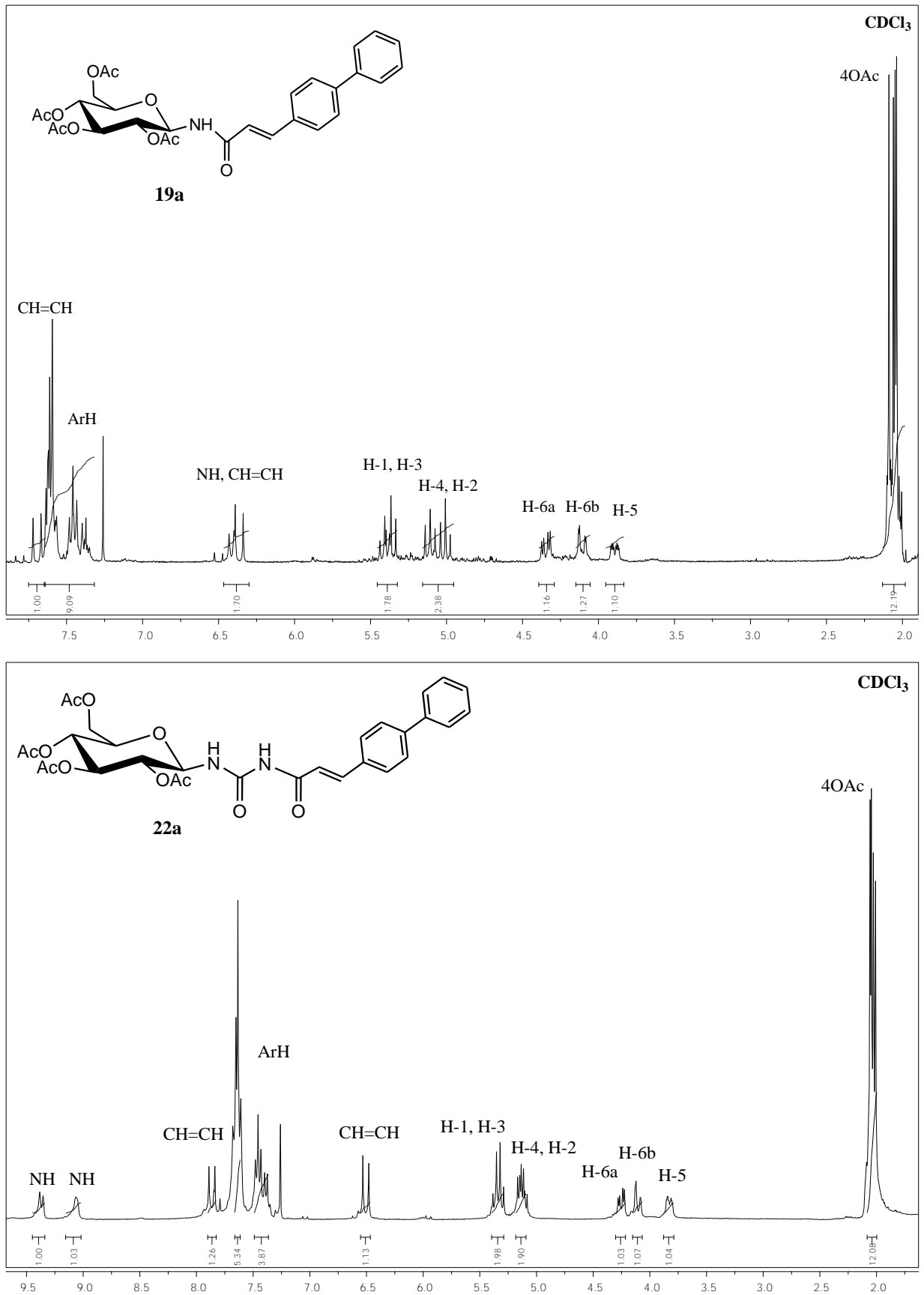
Σχήμα 24. Σύνθεση των προστατευμένων *N*-ακυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλουριών **22a-f**.

Παρόλο που ο ZnCl₂ ως καταλύτης δεν ενεργοποιεί μόνο τα ακυλοχλωρίδια για την αντίδραση αλλά καταλύει και το σχηματισμό ενός ιόντος ιμίνης (Paulsen *et al.*, **1980**; Isbell *et al.*, **1958**) συντελώντας στη δημιουργία ενός ανωμερικού μίγματος (Somsák *et al.*, **2008β**), όπως φάνηκε από τα φάσματα ¹H NMR των ενώσεων **22a-f**, μόνο τα β-ανωμερή ($J_{1,2} \geq 9.4$ Hz) απομονώθηκαν, γεγονός που υποδεικνύει είτε ότι η αντίδραση οδήγησε αποκλειστικά στη δημιουργία του β-ανωμερούς είτε ότι το α-ανωμερές ήταν ασταθές και πιθανότατα χάθηκε κατά την επεξεργασία.

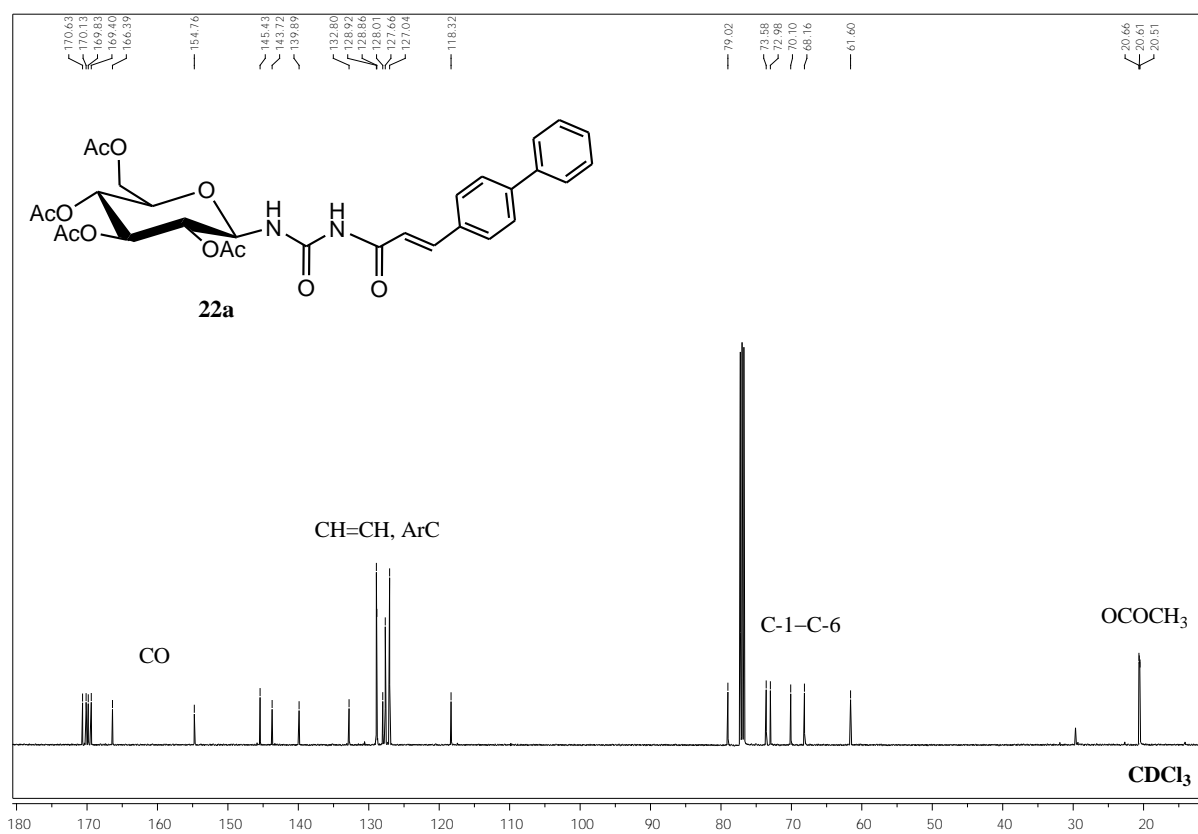
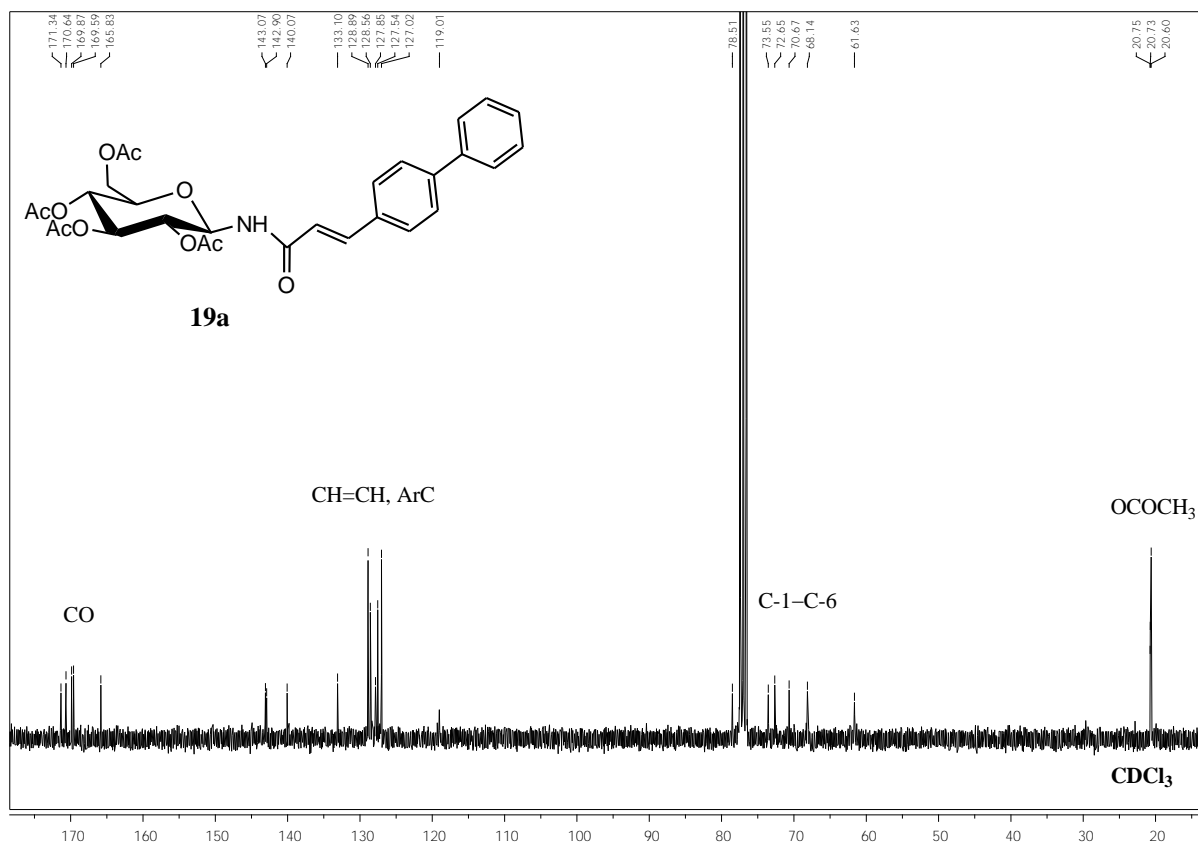
Για να ταυτοποιηθούν και να διευκρινιστούν τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά των ενώσεων **22a-f** λήφθηκαν τα αντίστοιχα φάσματα ¹H NMR και ¹³C NMR των ενώσεων. Τα φάσματα ¹H NMR και ¹³C NMR των ενώσεων αυτών ήταν όμοια με εκείνα των ενώσεων **19a-f** για τα σήματα πρωτονίου στην περιοχή του σακχάρου, των αρωματικών πρωτονίων, των πρωτονίων του διπλού δεσμού καθώς και των ακετυλομάδων-μεθυλίων, στον ίδιο διαλύτη, ενώ ήταν εμφανές και το επιπρόσθετο πρωτόνιο του αμιδικού δεσμού μετά την επιμήκυνση του συνδέσμου (NH). Παρόλα αυτά ενώ το σήμα πρωτονίου για τον αμιδικό δεσμό είχε ταυτοποιηθεί για τις ενώσεις **19a,b,d,f** στα 6.16-6.42 ppm και για την ένωση **19c** στην περιοχή 7.56-7.32 ppm, στις ενώσεις **22a,c-f** τα πρωτόνια των δύο αμιδικών δεσμών εμφανίστηκαν αρκετά πιο μετατοπισμένα και στην περιοχή 8.1-10.0 ppm. Εξαιρέση αποτελεί η ένωση **22b** της οποίας το φάσμα ¹H NMR εμφάνισε τα δύο πρωτόνια των αμιδικών δεσμών στην περιοχή 6.99-6.86 και 6.13 ppm, αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα σήματα των ανθράκων των ενώσεων **22a-f** δεν εμφάνισαν κάποια σημαντική μετατόπιση στα φάσματα ¹³C NMR τους σε σχέση με τα μητρικά μόρια **19a-f**. Το καρβονύλιο του επιπλέον αμιδικού δεσμού εντοπίστηκε στα 153.8-154.4 ppm για τις ενώσεις **22b,c-f** και στα 169.3 ppm για την ένωση **22c**.

Στα σχήματα 25 και 26 φαίνεται ενδεικτικά η παράθεση των φασμάτων ^1H NMR και ^{13}C NMR, αντίστοιχα, για τις ενώσεις **19a** και **22a**.

Σχήμα 25. Αντιπαραβολή των φασμάτων ^1H NMR για τις ενώσεις **19a** και **22a**.

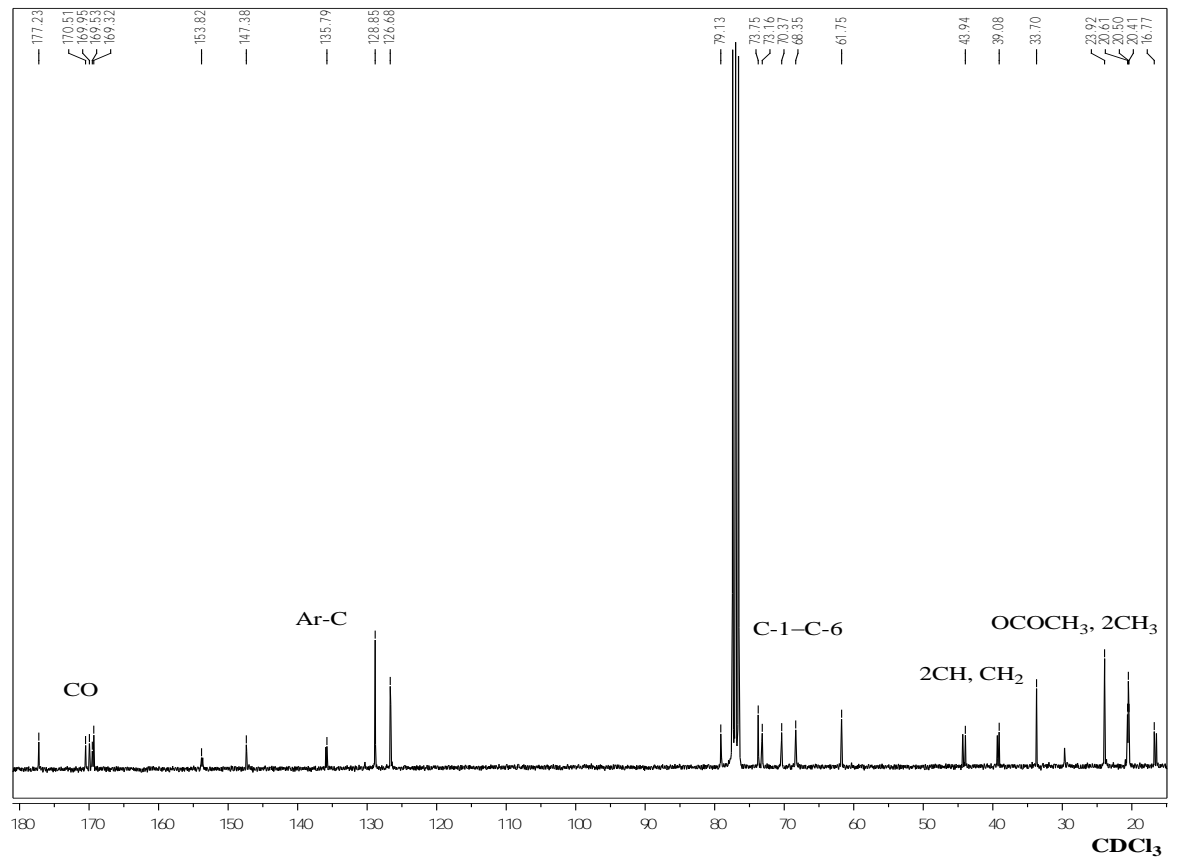
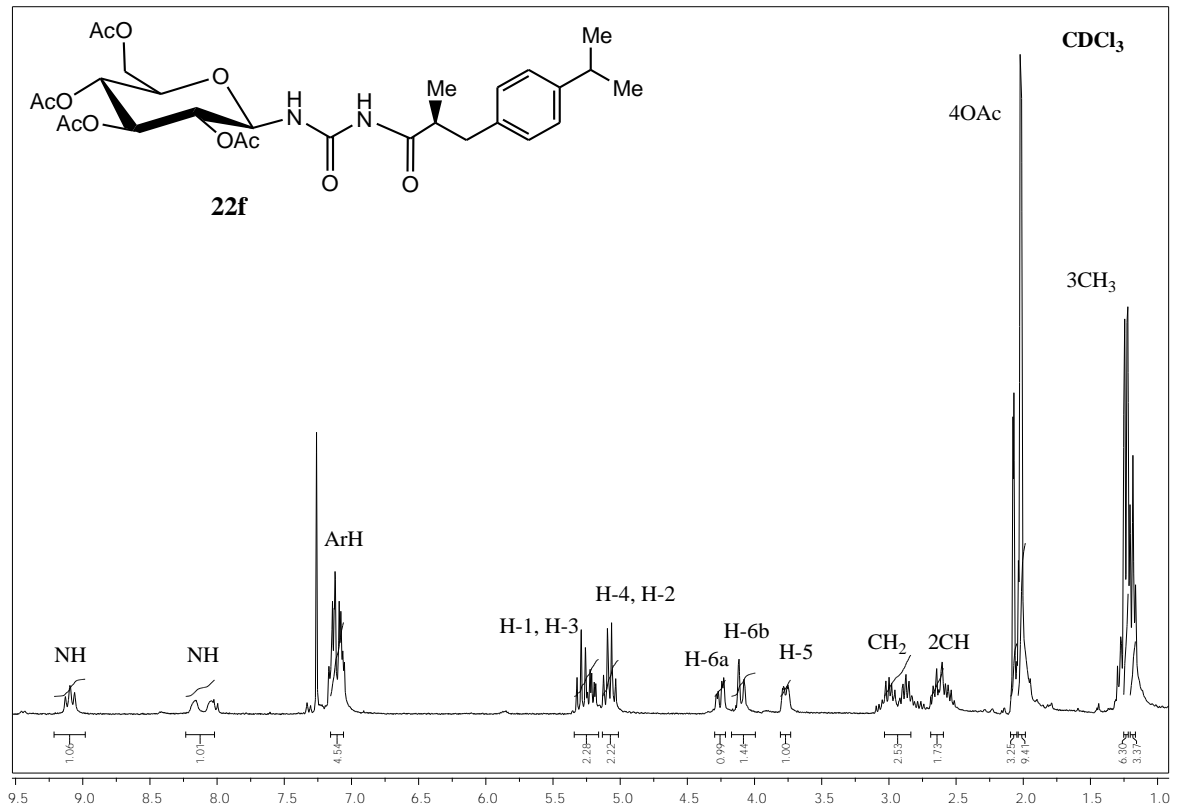


Σχήμα 26. Αντιπαραβολή των φασμάτων ^{13}C NMR για τις ενώσεις **19a** και **22a**.

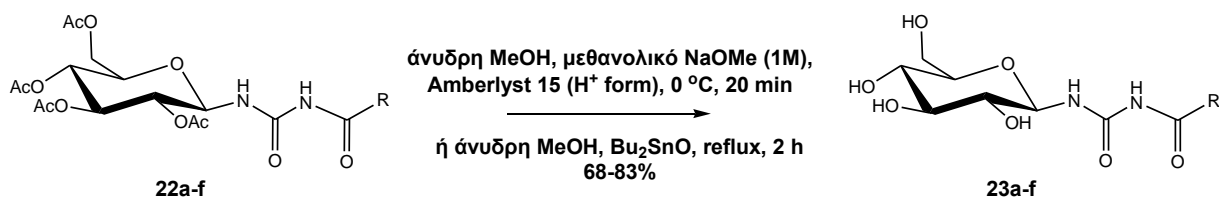


Κατά το φασματοσκοπικό χαρακτηρισμό της ένωσης **22f** παρατηρήθηκε επίσης το φαινόμενο της παρεμποδιζόμενης περιστροφής πέριξ του αμιδικού δεσμού (hindered rotation), όπως αναμενόταν έχοντας ως βάση τα φασματοσκοπικά δεδομένα για τη μητρική ένωση **19f**. Από τη μελέτη των φασμάτων ^1H NMR και ^{13}C NMR της ένωσης **22f**, εμφανίζονται διπλά σήματα τόσο στην περιοχή του σακχάρου όσο και του υποκαταστάτη (Σχήμα 27, φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR της ένωσης).

Σχήμα 27. Φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR της ένωσης **22f**.



Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αποπροστασία των ενώσεων **22a,b,d-f** με διάλυμα μεθοξειδίου του νατρίου (1M) σε άνυδρη μεθανόλη, στους 0 °C, υπό ατμόσφαιρα αζώτου για το σχηματισμό των επιθυμητών προϊόντων **23a,b,d-f**. Έπειτα από 20 λεπτά, το διάλυμα εξουδετερώθηκε με όξινη ρητίνη (Amberlyst 15), φιλτραρίστηκε, ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό και στο προκύπτον έλαιο πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης με διαλύτη έκλυση το σύστημα διαλυτών οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη (4:1), οπότε και ελήφθησαν τα επιθυμητά προϊόντα σε ικανοποιητικές ως πολύ καλές αποδόσεις 68-83% (Σχήμα 28).



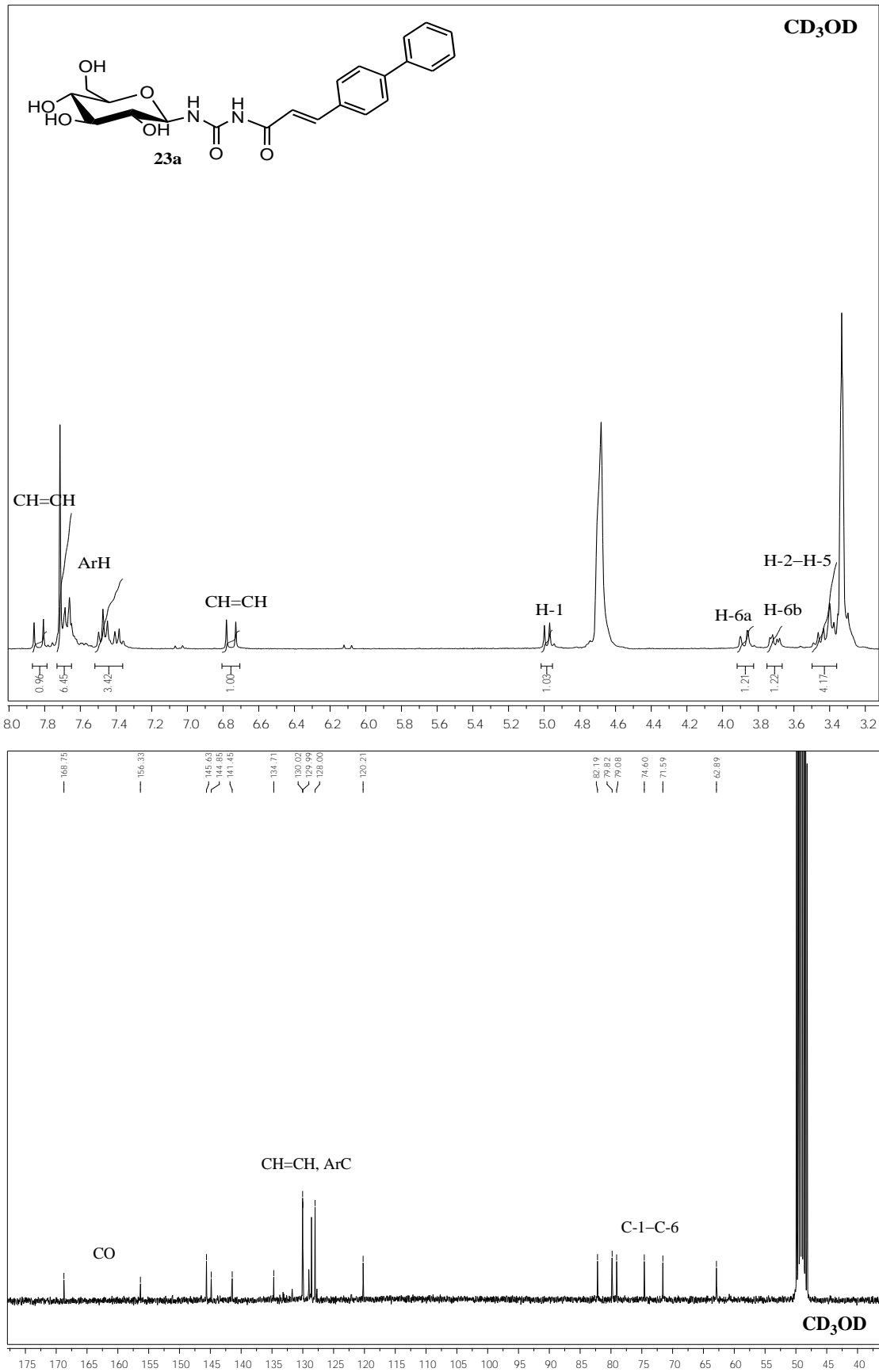
Σχήμα 28. Σύνθεση των αποπροστατευμένων *N*-ακυλο-β-D-γλυκοκυρανοζυλουριών **23a,b,d-f** με μεθοξείδιο του νατρίου. Η αποπροστασία της ένωσης **22c** πραγματοποιήθηκε υπήρξε πιο πολύπλοκη και πραγματοποιήθηκε με οξείδιο του διβουτυλοκασσιτέρου (Bu_2SnO) (Liu *et al.*, 2002).

Η προσπάθεια αποπροστασίας της άκυλο ουρίας **22c** με την ανωτέρω μέθοδο υπήρξε ανεπιτυχής εξαιτίας της ισχυρής τάσης του μορίου να αποκόπτει το άκυλο τμήμα του υποκαταστάτη, γρηγορότερα από την αφαίρεση των ακετυλομάδων του. Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε είτε κατά την αποπροστασία με βασικές είτε με όξινες συνθήκες (μεθοξείδιο του νατρίου, μεθανολική αμμωνία, μεθανολικό υδροχλώριο). Η προσπάθεια σύζευξης της ελεύθερης γλυκοκυρανοζυλουρίας (McKay *et al.*, 2014; Helm *et al.*, 1989) με το αντίστοιχο ακυλοχλωρίδιο υπήρξε επίσης ανεπιτυχής. Τελικά, το επιθυμητό ανάλογο **23c** λήφθηκε με καλή απόδοση (83%) όταν στο προστατευμένο του ανάλογό του (**22c**) προστέθηκαν 0.5 mmol οξειδίου του διβουτυλοκασσιτέρου (Bu_2SnO) και το προκύπτον εναιώρημα αναδεύτηκε με κάθετο ψυκτήρα για 2 h.

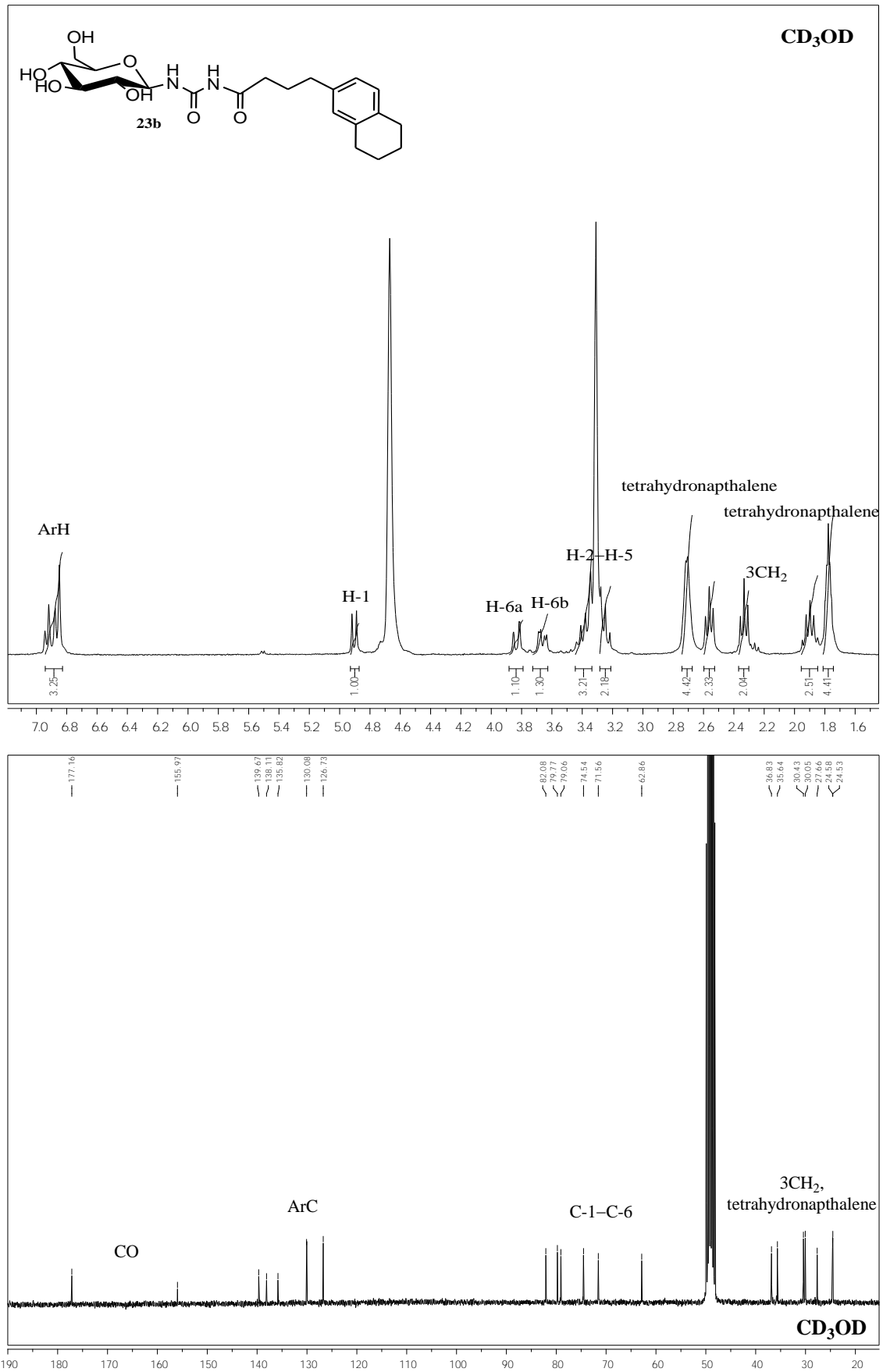
Όλα τα τελικά μόρια **23a-f** ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία ^1H NMR και ^{13}C NMR σε δευτεριωμένη μεθανόλη (CD_3OD). (Σχήματα 29-34) Εξαιτίας του διαλύτη, στα φάσματα ^1H NMR δε διαφαίνονται τα πρωτόνια NH των αμιδικών δεσμών, τα πρωτόνια των υδροξυλίων, το σήμα πρωτονίου H-1 εμφανίζεται ως διπλή κορυφή ενώ σε κανένα από τα φάσματα από τα φάσματα των ενώσεων **23a-f** δεν

παρατηρήθηκε το φαινόμενο της παρεμποδιζόμενης περιστροφής περίξ του αμιδικού δεσμού (hindered rotation).

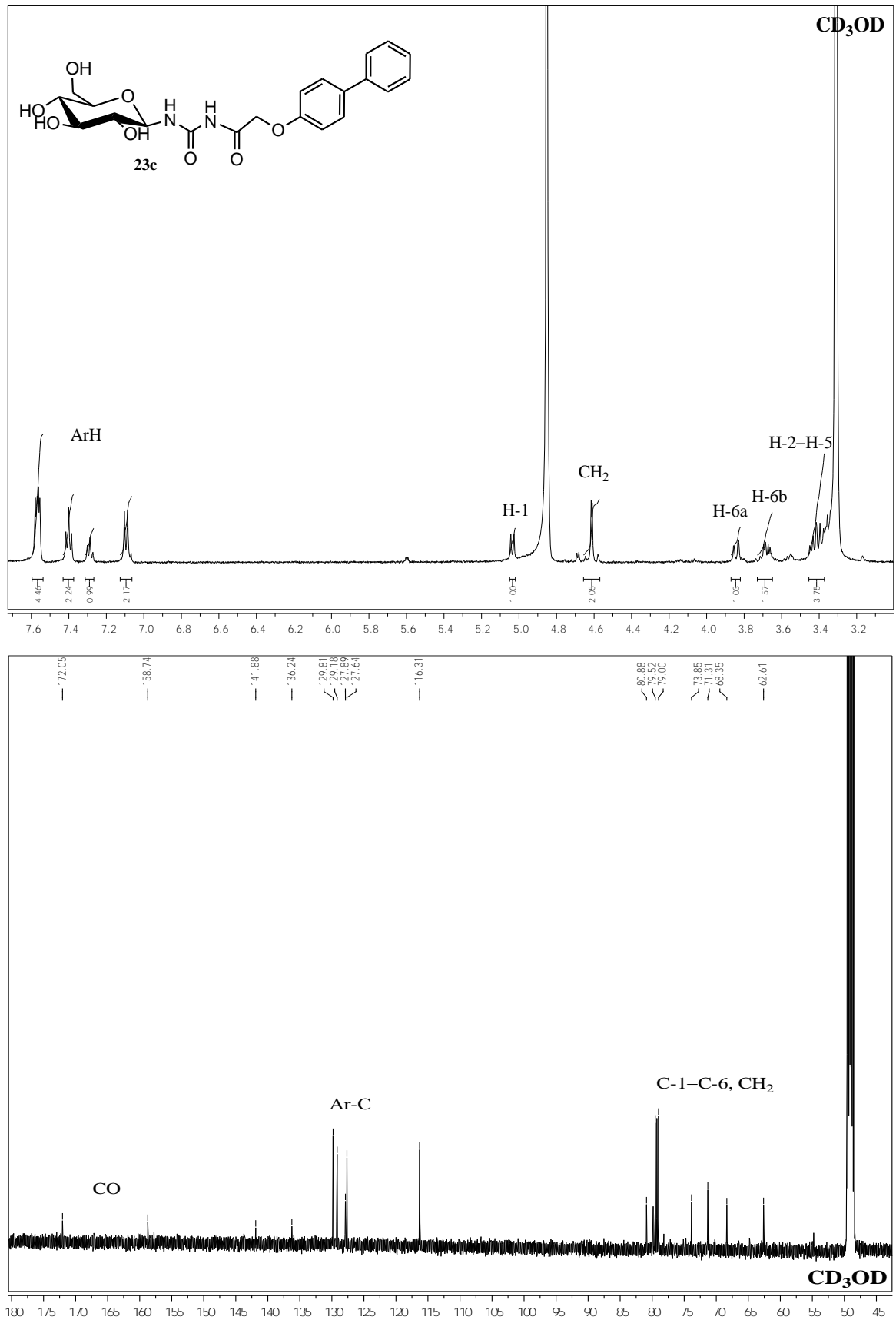
Σχήμα 29. Φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR της ένωσης **23a**.



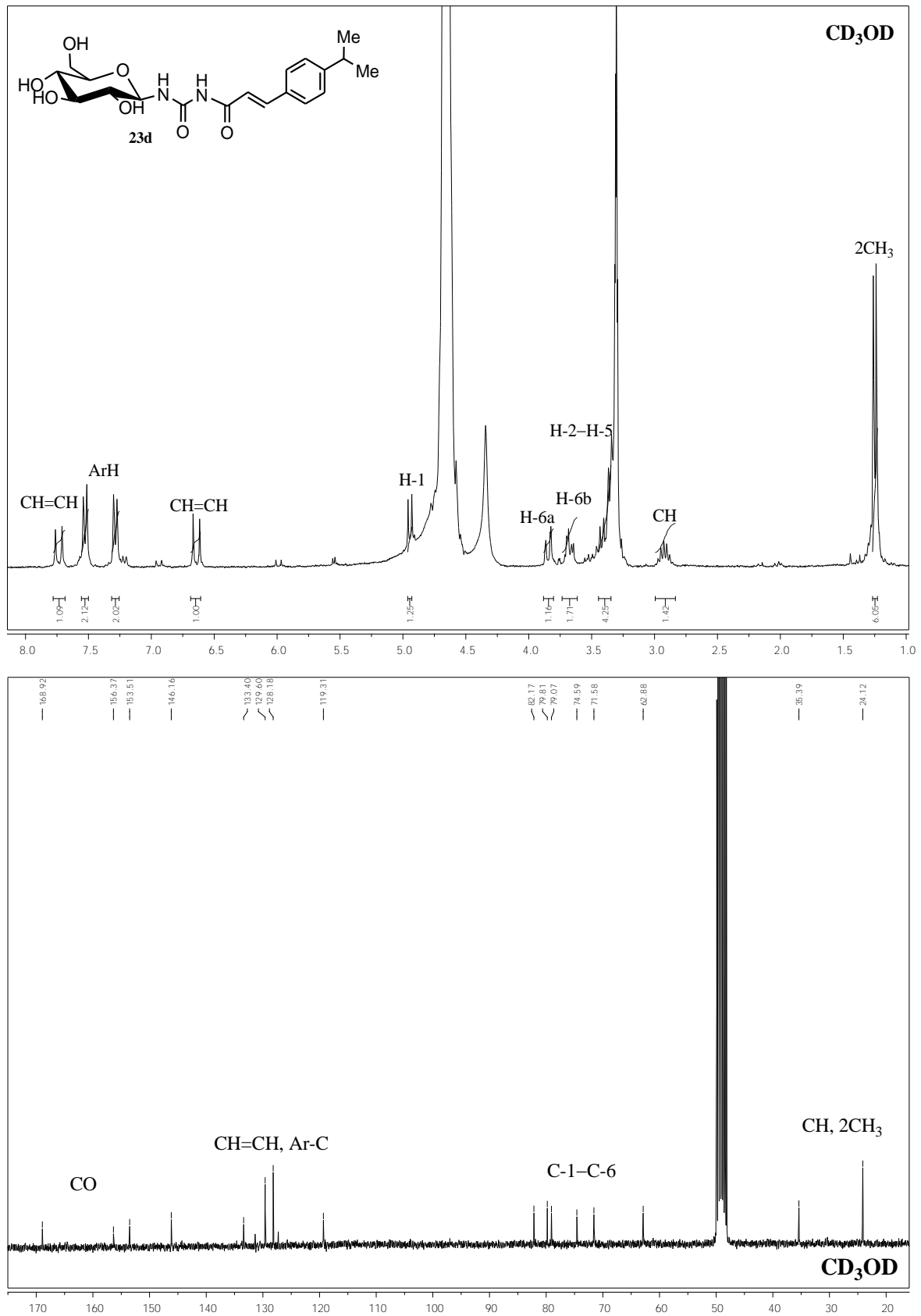
Σχήμα 30. Φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR της ένωσης **23b**.



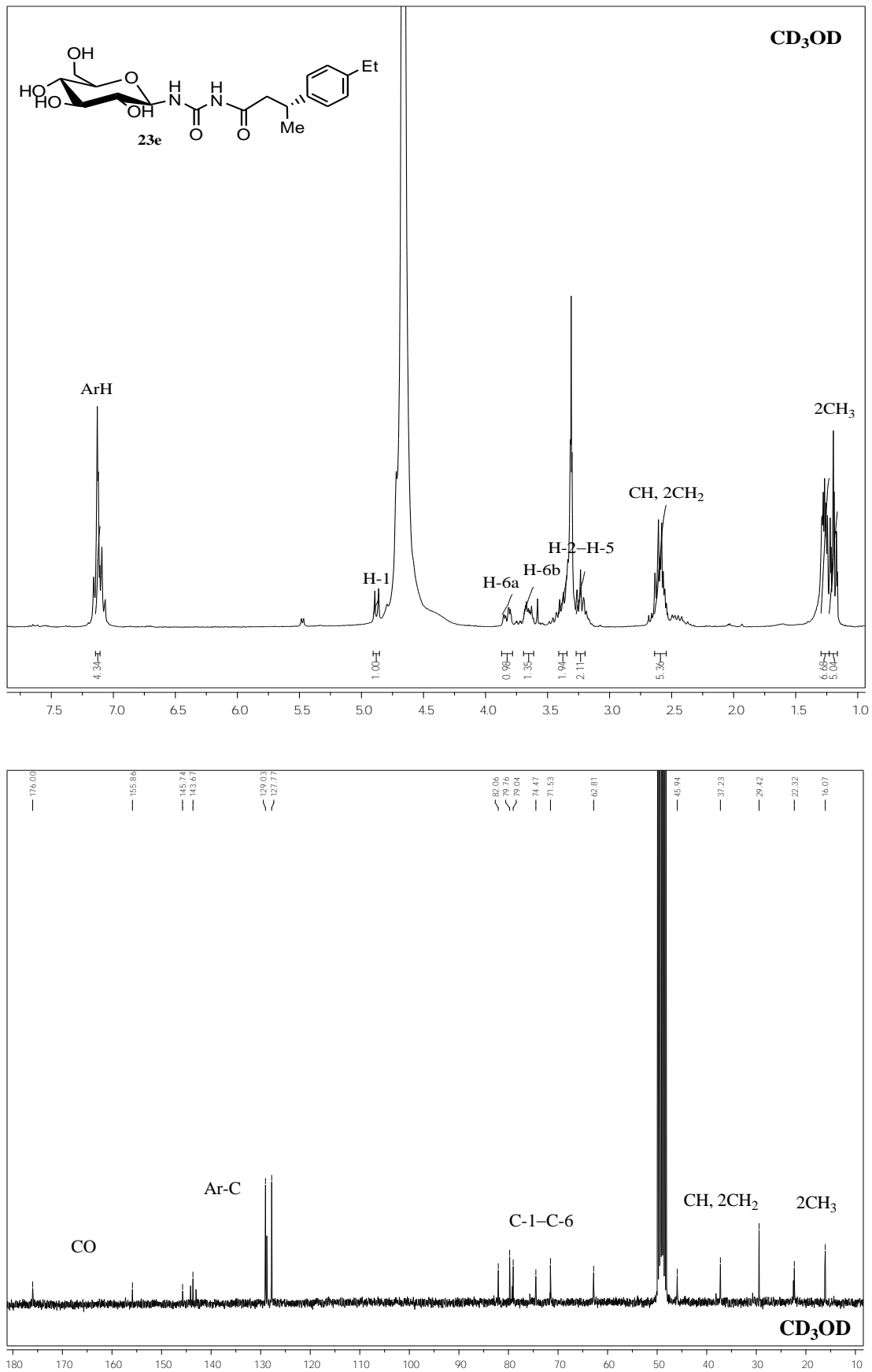
Σχήμα 31. Φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR της ένωσης **23c**.



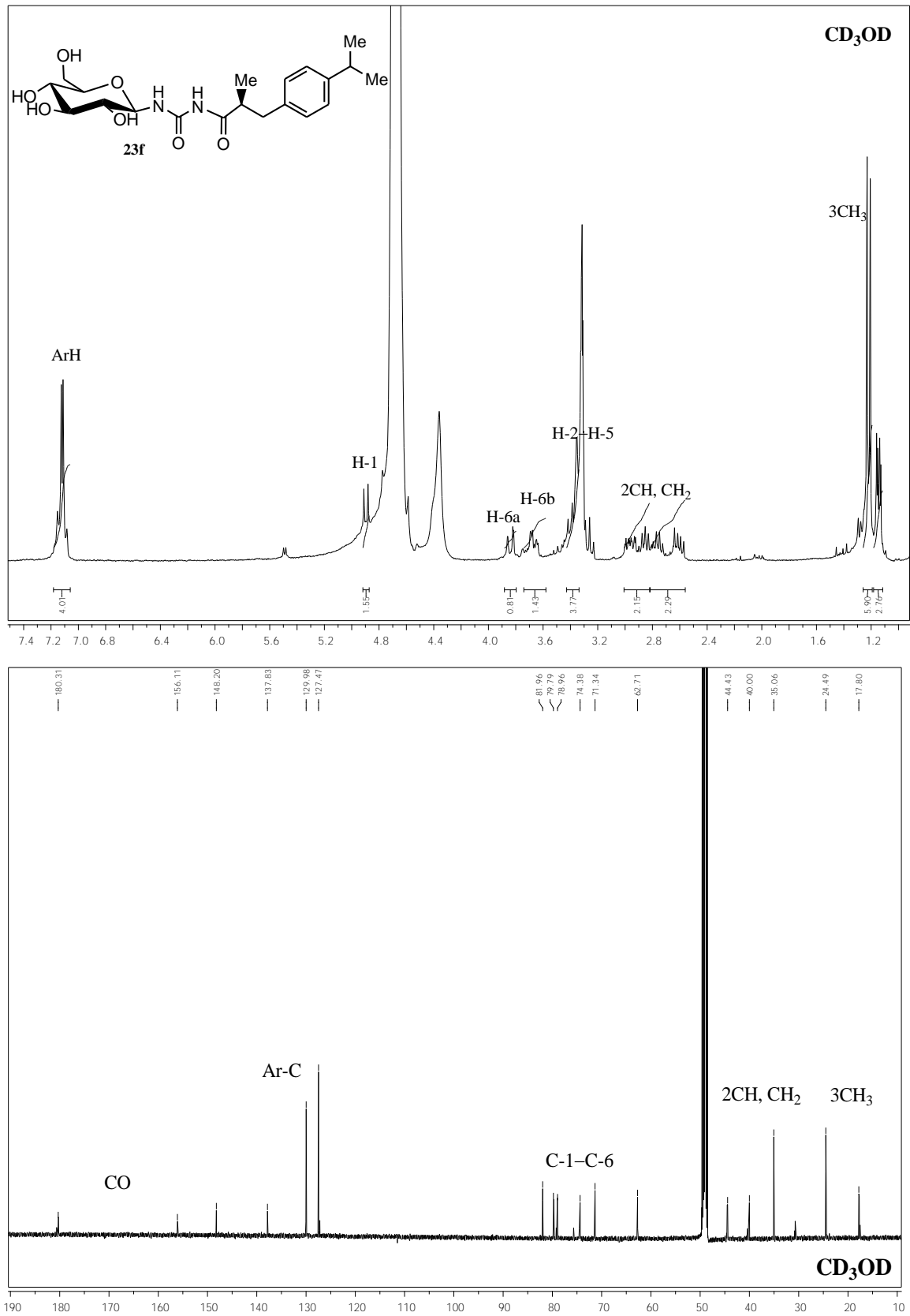
Σχήμα 32. Φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR της ένωσης **23d**.



Σχήμα 33. Φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR της ένωσης **23e**.



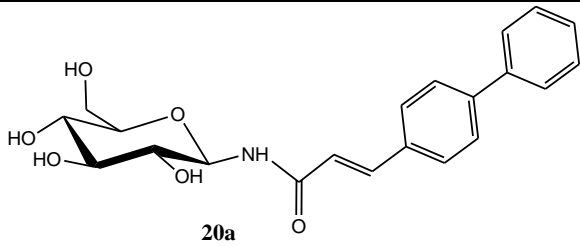
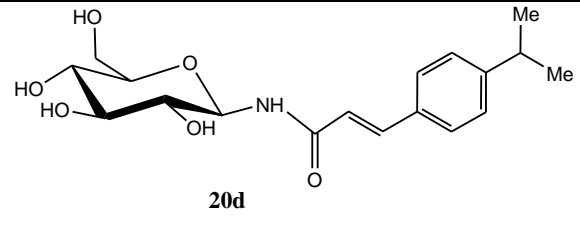
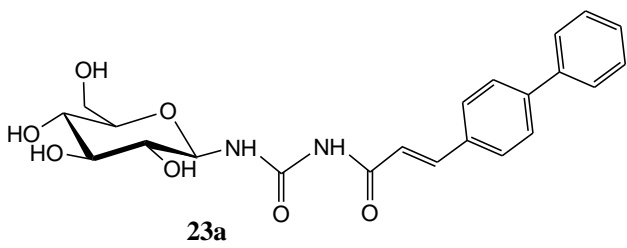
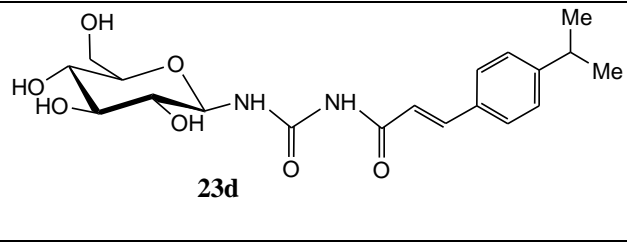
Σχήμα 34. Φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR της ένωσης **23f**.



Πα.6. Κινητική μελέτη *N*-ακυλο-*N'*-β-D-γλυκοκυρανοζυλουριών

Η βιοδραστικότητα των νέων αναστολέων αποτιμήθηκε στην mGPrb. Οι ενώσεις **23a** και **23b** παρατηρήθηκε ότι αναστέλλουν το ένζυμο συναγωνιστικά ως προς το υπόστρωμα του. Το μεγαλύτερο μήκος του συνδέσμου όπως φάνηκε από την παράμετρο K_i δε βελτίωσε το μέγεθος αναστολής της ένωσης **20a** (4.95 και 5.14 μM , αντίστοιχα). Ωστόσο, ο μακρύτερος σύνδεσμος στην ένωση **23b** οδήγησε σε ελάττωση της σταθεράς αναστολής της ένωσης **20b** κατά το ήμισυ ($K_i = 4.98 \mu\text{M}$ και 2.53 μM , αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα αυτά συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 7: Αποτελέσματα κινητικής μελέτης *N*-ακυλο-*N'*-β-D-γλυκοκυρανοζυλουριών **20a,d**.

Ένωση	K_i (μM)
 <p>20a</p>	5.14 ± 0.77
 <p>20d</p>	4.98 ± 0.58
 <p>23a</p>	4.95 ± 0.29
 <p>23d</p>	2.53 ± 0.07

Πα.7. Αντικαρκινική και Αντική δράση προστατευμένων και αποπροστατευμένων *N*-ακυλο- β -D-γλυκοκυρανοζυλαμινών και *N*-ακυλο- N' - β -D-γλυκοκυρανοζυλουριών

Μετά την επιτυχή ολοκλήρωση της σύνθεσης και μελέτης των ενώσεων που είχαν ως στόχο τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου, γνωρίζοντας ότι διάφοροι αναστολείς κινασών μικρού μοριακού βάρους φέρουν δομές ανάλογες των ενώσεων που εξετάσαμε και χρησιμοποιούνται ευρέως έναντι του καρκίνου (Sausville *et al.*, 2000; Blanc *et al.*, 2013; Davis *et al.*, 2011), θεωρήθηκε σκόπιμο να μελετηθεί και η αντική και αντικαρκινική δράση των εν λόγω ενώσεων με πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Ιολογίας και Χημειοθεραπείας του Ινστιτούτο Ιατρικής Έρευνας Rega στο Βέλγιο.

Οι προστατευμένες και αποπροστατευμένες *N*-ακυλο- β -D-γλυκοκυρανοζυλαμίνες αξιολογήθηκαν για την κυτταροστατική τους δράση έναντι του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων λευχαιμίας (L1210), των ανθρώπινων T-λεμφοκυττάρων (CEM), καθώς επίσης και των ανθρώπινων τραχηλικών καρκινικών κυττάρων (HeLa). Τα αποτελέσματα από τα πειράματα αυτά συνοψίζονται στον Πίνακα 8. Αποδείχθηκε ότι οι ακετυλιωμένες *N*-ακυλο- β -D-γλυκοκυρανοζυλαμίνες (**19b-f**) και ουρίες (**22a,b,e,f**) είχαν καλύτερη κυτταροστατική δράση έναντι των αποπροστατευμένων αναλόγων **20b-f** και **23a,b,e,f**, αντίστοιχα (Πίνακας 8). Εξάιρεση στη γενική αυτή παρατήρηση αποτέλεσαν τα ανάλογα **20a** και **23c**, τα οποία έδειξαν καλύτερη δράση έναντι των ακετυλιωμένων τους προδρόμων **19a** και **22c**, αντίστοιχα. Πιο συγκεκριμένα η ένωση **23c** εμφάνισε την καλύτερη κυτταροστατική δράση έναντι των τριών καρκινικών σειρών που εξετάσαμε (IC₅₀ 9, 24 και 19 μ M, αντίστοιχα), με δράση μόλις 5-15 φορές ασθενέστερη από το χρησιμοποιούμενο αντικαρκινικό φάρμακο 6-μερκαπτοπουρίνη. Τέλος, η ακετυλιωμένη ένωση **22d** καθώς και η αποπροστατευμένη **23d** εμφάνισαν ανάλογο βαθμό δράσης (IC₅₀ μεταξύ 16-45 μ M). Οι ενώσεις δεν ήταν επιπλέον κυτταροτοξικές έναντι φυσιολογικών κυττάρων κυτταρικής σειράς που χρησιμοποιήθηκαν ως control (human lung fibroblast cell cultures, HEL) (MCC₅₀ > 100 μ M).

Πίνακας 8. Αντικαρκινική δράση προστατευμένων και αποπροστατευμένων *N*-ακυλο- β -D-γλυκοπυρανοζυλαμινών (**19a-f**, **20a-f**) και *N*-ακυλο-*N'*- β -D-γλυκοπυρανοζυλουριών (**22a-f**, **23a-f**).

Ένωση	IC ₅₀ ^a (μ M)			MCC ^b (μ M)
	L1210	CEM	HeLa	HEL
19a	≥ 250	≥ 250	≥ 250	> 100
19b	106 \pm 6	116 \pm 9	118 \pm 23	> 100
19c	139 \pm 8	180 \pm 100	≥ 250	> 100
19d	110 \pm 6	99 \pm 15	124 \pm 18	> 100
19e	184 \pm 2	118 \pm 5	≥ 250	> 100
19f	103 \pm 1	110 \pm 5	64 \pm 16	> 100
20a	134 \pm 1	192 \pm 82	84 \pm 21	> 100
20b	> 250	> 250	> 250	> 100
20c	> 250	> 250	> 250	> 100
20d	> 250	> 250	> 250	> 100
20e	> 250	> 250	> 250	> 100
20f	> 250	> 250	> 250	> 100
22a	91 \pm 15	110 \pm 29	100 \pm 14	> 100
22b	78 \pm 0	38 \pm 10	66 \pm 12	> 100
22c	> 250	> 250	> 250	> 100
22d	24 \pm 0	16 \pm 1	44 \pm 24	> 100
22e	71 \pm 16	41 \pm 4	88 \pm 17	> 100
22f	47 \pm 8	32 \pm 1	39 \pm 23	> 100
23a	206 \pm 44	141 \pm 5	> 250	> 100
23b	> 250	> 250	> 250	> 100

23c	9.0 ± 5.9	24 ± 1	19 ± 3	> 100
23d	25 ± 2	22 ± 4	45 ± 27	> 100
23e	> 250	> 250	> 250	> 100
23f	> 250	> 250	> 250	> 100
5-Φθοροουρακίλη	0.33 ±	18 ± 5	0.54 ± 0.12	-
6-Μερκαπτοπουρίνη	2.8 ± 1.1	2.8 ± 1.3	1.1 ± 0.1	-

^aΣυγκέντρωση της ένωσης που απαιτείται για αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού κατά 50%.

^bΣυγκέντρωση της ένωσης που απαιτείται για αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού καλλιέργειας φυσιολογικών κυττάρων ινοβλαστών του πνεύμονα ανθρώπου.

Οι ενώσεις **19a-f**, **20a-f**, **22a-f** και **23a-f** αξιολογήθηκαν επίσης για τη δράση τους έναντι ενός ευρέως φάσματος DNA και RNA ιών που περιελάμβαναν τους ιούς herpes simplex virus type 1 [HSV-1(KOS)], HSV-2 (G), vaccinia virus, ιός της στοματίτιδας (VSV) σε καλλιέργειες κυττάρων HEL cultures; VSV, Coxsackie virus B4 and respiratory syncytial virus (RSV) σε κύτταρα HeLa; parainfluenza-3 virus, reovirus-1, Sindbis virus, Coxsackie virus B4 και Punta Toro virus σε καλλιέργειες κυττάρων Vero; influenza virus A (H1N1, H3N2) και influenza virus B σε κύτταρα της σειράς MDCK, feline corona virus (FIPV) and feline herpes virus στην κυτταρική σειρά CRFK καθώς και έναντι του ιού της επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (HIV-1III_B and HIV-2ROD) σε κύτταρα CEM.

Από τις ενώσεις μόνο η ακετυλιωμένη γλυκοπυρανοζυλουρία **22f** βρέθηκε ότι μπορεί να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό των ιών parainfluenza-3, Sindbis και Coxsackie B4 σε καλλιέργειες κυττάρων Vero και σε συγκεντρώσεις 45, 58 and 58 μM (*vide* IC₅₀), αντίστοιχα τη στιγμή που το γνωστό χρησιμοποιούμενο αντιικό φάρμακο Ribavirin δεν επέδειξε καμιά δράση ($\geq 250 \mu\text{M}$). (Πίνακας 9).

Πίνακας 9. Κυτταροτοξική δράση της *N*-ακυλο-*N'*-β-D-γλυκοπυρανοζυλουρίας **22f** σε κύτταρα Vero.

Ένωση	MCC ^a (μM)	IC ₅₀ ^b (μM)				
		Ιός Παραγρίπης Τύπου 3	Ρεοϊός-1	Ιός Sindbis	Ιός Coxsackie B4	Ιός Punta Toro
22f	> 100	45	> 100	58	58	100
DS-10.000 (μg/mL)	> 100	> 100	> 100	20	100	100
Ribavirin	> 250	250	> 250	> 250	> 250	146

^aΣυγκέντρωση της ένωσης που απαιτείται για τη δημιουργία μικροσκοπικά ανιχνεύσιμης αλλοίωσης της μορφολογίας φυσιολογικών κυττάρων ινοβλαστών του πνεύμονα ανθρώπου.

^bΣυγκέντρωση της ένωσης που απαιτείται για αναστολή της παθογονικότητας του ιού κατά 50%.

IIIα. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

IIIα.1 Γενικές Μέθοδοι

Ξήρανση Διαλυτών

Όλες οι αντιδράσεις που περιελάμβαναν άνυδρους διαλύτες ή ουσίες ευαίσθητες στην ατμόσφαιρα έλαβαν χώρα υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου. Το *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) αποστάχθηκε υπεράνω υδριδίου του ασβεστίου και το απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 4 Å, όπου και αποθηκεύτηκε. Το χλωροφόρμιο (CHCl₃) αποστάχθηκε παρουσία πεντοξειδίου του φωσφόρου και το απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη που περιείχε μοριακά κόσκινα 4 Å, όπου και αποθηκεύτηκε. Το τετραϋδροφουράνιο (THF) αποστάχθηκε από νάτριο/βενζοφαινόνη αμέσως πριν τη χρήση του. Τέλος, η μεθανόλη (MeOH) αποθηκεύτηκε σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3 Å.

Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC: Thin Layer Chromatography)

Η παρακολούθηση της πορείας των αντιδράσεων και ο έλεγχος της καθαρότητας των ενώσεων έγινε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας σε πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με silica gel F₂₅₄ (0.2 mm) από την εταιρία E.Merck. Οι κηλίδες των χρωματογραφημάτων ήταν ορατές είτε με τη χρήση λυχνίας υπεριώδους (UV, 254 nm) είτε ύστερα από ψεκασμό με διάλυμα θειικού οξέος 30% και κατόπιν θέρμανση στους 120 °C.

Χρωματογραφία στήλης

Η χρωματογραφία στήλης για τον καθαρισμό και απομόνωση των συντιθέμενων ουσιών πραγματοποιήθηκε υπό πίεση (flash, column chromatography) ύστερα από την εισαγωγή αέρα εντός πακτωμένης στήλης με silica gel 60 (230-400 mesh) της εταιρίας E. Merck.

Μέτρηση οπτικής ενεργότητας

Οι μετρήσεις της γωνίας στροφής πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου με τη βοήθεια πολωσιμέτρου, τύπου Autopol I.

Φάσματα μάζας

Οι μετρήσεις μάζας έγιναν σε φασματόμετρο τύπου Thermo Quest Finnigan AQA και χρησιμοποιούμενη μέθοδος ιονισμού ήταν διά ψεκασμού (electron spray ionization, ESI).

Στοιχειακή ανάλυση

Οι στοιχειακές αναλύσεις έγιναν με τη χρήση αυτοματοποιημένων αναλυτών της εταιρίας Perkin-Elmer 2400 (% προσδιορισμός C, H και N) και οι τιμές κυμαίνονται σε εύρος ± 0.4 των θεωρητικών.

Φάσματα NMR

Τα φάσματα NMR καταγράφηκαν σε φασματόμετρο τύπου Varian 500 με συχνότητα συντονισμού τα 500 MHz για τους πυρήνες ^1H και τα 125 MHz για τους πυρήνες ^{13}C καθώς και σε φασματόμετρο Bruker AM300 με συχνότητα συντονισμού τα 300 MHz για τους πυρήνες ^1H και τα 75.5 MHz για τους πυρήνες ^{13}C , αντίστοιχα. Οι δευτεριωμένοι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υψηλής καθαρότητας και σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο αναφοράς το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS). Οι τιμές χημικής απορρόφησης δίνονται σε ppm (δ) ενώ οι τιμές των σταθερών σύζευξης σε Hz.

Φάσματα υπερύθρου (IR)

Τα φάσματα IR πάρθηκαν με χρήση του φασματοφωτομέτρου Thermo Scientific Nicolet IR100 FT-IR.

ΠΙα.2 Σύνθεση του 2,3,4,6-τετρακισ-*O*-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλαζιδίου (17)(Tropper *et. al.*, 1992)

Σε υπό ανάδευση διάλυμα 1,2,3,4,6-πεντακισ-*O*-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζης (**16**) (0.026 mmol) σε άνυδρο CH₂Cl₂ (126 mL) προστίθενται 0.031 mmol Me₃SiN₃ και 0.013 mmol SnCl₄, υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC), το διάλυμα αραιώνεται με CH₂Cl₂ και εκχυλίζεται με νερό. Η οργανική φάση ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου Na₂SO₄, ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό και το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας (1:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **17** σε απόδοση 86%. R_f = 0.28 (*n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 1:4).

$$[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +2^{\circ} (c = 0.20, \text{CHCl}_3)$$

ESIMS m/z: 374.15 (M+H⁺)Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₄H₁₉N₃O₉) C, H, N

Υπολ. (%) C: 45.04 H: 5.13 N: 11.26

Ευρ. (%) C: 44.74 H: 5.25 N: 11.50

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ 5.22 (t, 1H, *J* = 9.2 Hz, H-3), 5.11 (t, 1H, *J* = 9.8, H-4), 4.96 (t, 1H, *J* = 9.4 Hz, H-2), 4.65 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, H-1), 4.28 (dd, 1H, *J* = 4.7, 12.4 Hz, H-6a), 4.17 (dd, 1H, *J* = 1.8, 12.4 Hz, H-6b), 3.80 (ddd, 1H, *J* = 2.1, 4.1, 9.8 Hz, H-5), 2.11, 2.08, 2.03, 2.01 (4s, 12H, 4OAc).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃):

δ 170.6, 170.4, 169.2, 169.0, 86.3, 73.9, 72.1, 70.0, 67.8, 61.4, 20.7, 20.5, 20.3.

ΠΙ.3 Σύνθεση της 2,3,4,6-τετρακίς-*O*-ακετυλο-β-D-γλυκοκυρανοζυλαμίνης (18)
(Jarrahpour *et al.*, 2007)

Για τη λήψη του προϊόντος **18** πραγματοποιήθηκε υδρογόνωση της ένωσης **17** (13.4 mmol) με τη βοήθεια παλλαδίου σε άνθρακα 10% (0.95 g), σε διαλύτη EtOAc (184.6 mL), στους 20 °C για 24 h. Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC), το διάλυμα φιλτράρεται, ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό και το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης οξικό αιθυλεστέρα οπότε παραλαμβάνεται το προϊόν **17** με λευκή αφρώδη υφή και σε απόδοση 77%. Rf = 0.18 (*n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 2:3).

$$[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +4^{\circ} (c = 0.20, \text{CHCl}_3)$$

ESIMS m/z: 348.11(M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₄H₂₁NO₉) C, H, N

Υπολ. (%) C: 48.41 H: 6.09 N: 4.03

Ευρ. (%) C: 48.55 H: 6.40 N: 4.28

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ 5.27 (t, 1H, *J* = 9.4, H-3), 5.09 (t, 1H, *J* = 9.8 Hz, H-4), 4.82 (t, 1H, *J* = 9.5 Hz, H-2), 4.46-4.21 (m, 2H, H-6), 4.83 (dd, 1H, *J* = 8.6 Hz, H-1), 3.97-3.77 (m, 1H, H-5), 2.11, 2.08, 2.03, 2.02 (4s, 12H, 4OAc).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃):

δ 170.4, 170.2, 170.1, 169.9, 85.8, 76.1, 75.7, 72.0, 66.2, 61.7, 20.7, 20.6, 20.4.

IR (KBr, cm⁻¹): 3471-3260

ΠΙ.4 Σύνθεση των ακετυλιωμένων γλυκοπυρανοζυλαμινών 19a-f

N-(*E*)-3-(Διφαινυλο-4-υλο)ακρυλοϋλο-(2,3,4,6-τετρακίς-*O*-ακετυλο)-β-*D*-γλυκοπυρανοζυλαμίνη (19a)

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της ακετυλιωμένης β-*D*-γλυκοπυρανοζυλαμίνης **18** (1.44 mmol) σε άνυδρο DMF (3 mL) προστίθενται, υπό ατμόσφαιρα αζώτου, 0.96 mmol Et₃N και 0.96 mmol από το ακυλογλωρίδιο **a**. Μετά από ανάδευση 1 h, η αντίδραση ολοκληρώνεται (TLC), ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό και το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας (1:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **19a** με λευκή αφρώδη υφή και σε απόδοση 68%. R_f = 0.30 (*n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 1:1).

$[\alpha]_D^{22} = +6^\circ$ ($c = 0.20$, CHCl₃)

ESIMS *m/z*: 554.21(M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₉H₃₁NO₁₀) C, H, N

Υπολ. (%) C: 62.92 H: 5.64 N: 2.53

Ευρ. (%) C: 63.10 H: 5.52 N: 2.74

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃):

δ 7.69 (d, 1H, $J = 15.7$ Hz, CH=CH), 7.64-7.37 (m, 9H, ArH), 6.42 (d, 1H, $J = 9.4$ Hz, NH), 6.36 (d, 1H, CH=CH), 5.44-5.33 (2pseudo t, 2H, $J = 9.4, 9.5$ Hz, H-1, H-3), 5.11 (t, 1H, $J = 9.8$ Hz, H-4), 5.01 (t, 1H, $J = 9.6$ Hz, H-2), 4.35 (dd, 1H, $J = 4.3, 12.6$ Hz, H-6a), 4.11 (dd, 1H, $J = 1.9, 12.6$ Hz, H-6b), 3.89 (ddd, 1H, $J = 2.0, 4.1, 10.2$ Hz, H-5), 2.09, 2.06, 2.05, 2.04 (4s, 12H, 4OAc).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3):

δ 171.3, 170.6, 169.9, 169.6, 165.8 (CO), 143.1, 142.9, 140.1, 133.1, 128.9, 128.6, 127.9, 127.5, 127.0, 119.0 (CH=CH and Ar-C), 78.5, 73.6, 72.7, 70.7, 68.1, 61.6 (C-1—C-6), 20.8, 20.7, 20.6 (OCOCH₃).

N-4-(5,6,7,8-Τετραϋδروναφθαλενο-2-υλο)βουτανοϋλο-(2,3,4,6-τετρακίς-Ο-ακετυλο)-β-D-γλυκοπυρανοζυλαμίνη (19b)

Η γλυκοπυρανοζυλαμίνη **19b** συντίθεται ύστερα από ακυλίωση της αμίνης **18** από το ακυλοχλωρίδιο **b** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **19a**. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας (1:1) οπότε και παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν με κίτρινη αφρώδη υφή και σε απόδοση 63%. R_f = 0.6 (*n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 1:1).

$[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -8^\circ$ ($c = 0.20$, CHCl_3)

ESIMS m/z : 548.63 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Στοιχειακή Ανάλυση: ($\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{NO}_{10}$) C, H, N

Υπολ. (%) C: 61.41 H: 6.81 N: 2.56

Ευρ. (%) C: 61.75 H: 7.14 N: 2.30

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3):

δ 6.99-6.86 (m, 3H, ArH), 6.16 (d, 1H, $J = 9.3$ Hz, NH), 5.34-5.24 (2pseudo t, 2H, $J = 9.6, 9.5$ Hz, H-1, H-3), 5.06 (t, 1H, $J = 9.9$ Hz, H-4), 4.91 (t, 1H, $J = 9.6$ Hz, H-2), 4.32 (dd, 1H, $J = 4.3, 12.6$ Hz, H-6a), 4.07 (dd, 1H, $J = 1.9, 12.6$ Hz, H-6b), 3.82 (ddd, 1H, $J = 2.0, 4.1, 10.1$ Hz, H-5), 2.73 (m, 4H, τετραϋδροναφθαλένιο), 2.53 (t, 2H, $J =$

7.4 Hz, CH₂), 2.22-2.15 (m, 2H, CH₂), 2.07, 2.03, 2.02, 2.01 (4s, 12H, 4OAc), 1.94-1.87 (m, 2H, CH₂), 1.80-1.76 (m, 4H, τετραϋδροναφθαλένιο).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃):

δ 173.1, 171.1, 170.6, 169.9, 169.6 (CO), 138.1, 137.1, 134.8, 129.2, 129.0, 125.5 (Ar-C), 78.0, 73.5, 72.6, 70.5, 68.0, 61.6 (C-1—C-6), 35.8, 34.5, 29.3, 29.0, 26.6, 23.2, 23.1 (3CH₂ και 4CH₂ τετραϋδροναφθαλενίου), 20.7, 20.6, 20.5 (OCOCH₃)

***N*-2-(Διφαινυλο-4-υλοξυ)ακετυλ-(2,3,4,6-τετρακίς-*O*-ακετυλο)-β-*D*-γλυκοπυρανοζλαμίνη (19c)**

Το επιθυμητό προϊόν **19c** συντίθεται ύστερα από ακυλίωση της αμίνης **18** από το ακυλοχλωρίδιο **c** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **19a**. Όμοια, το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας (1:1) οπότε και παραλαμβάνεται το προϊόν **19c** με κίτρινη αφρώδη υφή και απόδοση 83%. R_f = 0.33 (*n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 1:1).

$[\alpha]_D^{22} = -6^\circ$ ($c = 0.20$, CHCl₃)

ESIMS m/z: 558.43 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₈H₃₁NO₁₁) C, H, N

Υπολ. (%) C: 60.32 H: 5.60 N: 2.51

Ευρ. (%) C: 60.72 H: 5.26 N: 2.40

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3):

δ 7.56-7.32 (m, 8H, ArH, NH), 6.98 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, ArH), 5.36-5.25 (2pseudo t, 2H, $J = 9.5, 9.2$ Hz, H-1, H-3), 5.10 (t, 1H, $J = 9.7$ Hz, H-4), 5.03 (t, 1H, $J = 9.6$ Hz, H-2), 4.58, 4.45 (q, AB-system, 2H, $J = 15.2$ Hz, CH_2), 4.35 (dd, 1H, $J = 4.1, 12.6$ Hz, H-6a), 4.10 (dd, 1H, $J = 1.5, 12.6$ Hz, H-6b), 3.86 (ddd, 1H, $J = 1.8, 3.7, 10.0$ Hz, H-5), 2.08, 2.03, 2.02, 1.88 (4s, 12H, 4OAc).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3):

δ 170.6, 170.5, 169.9, 169.5, 169.2 (CO), 156.4, 140.2, 135.3, 128.8, 128.4, 127.0, 126.7, 114.9 (Ar-C), 77.9, 73.6, 72.5, 70.0, 68.0, 67.1, 61.5 (CH_2 , C-1—C-6), 20.7, 20.5, 20.3 (OCOCH_3).

N-(E)-3-(4-Ισοπροπυλοφαινυλο)ακρυλοϋλο-(2,3,4,6-τετρακίς-O-ακετυλο)-β-D-γλυκοπυρανοζυλαμίνη (19d)

Η αμίνη **19d** συντίθεται ύστερα από ακυλίωση της γλυκοπυρανοζυλαμίνης **18** από το ακυλογλωρίδιο **d** με την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **19a**. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση με διαλύτη έκλυσης το σύστημα *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας (1:1) οπότε και παραλαμβάνεται με λευκή αφρώδη υφή και απόδοση 66% το επιθυμητό προϊόν **19d**. $R_f = 0.53$ (*n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 1:1).

$[\alpha]_D^{22} = +10^\circ$ ($c = 0.20$, CHCl_3)

ESIMS m/z : 520.58 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Στοιχειακή Ανάλυση: ($\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{NO}_{10}$) C, H, N

Υπολ. (%) C: 60.11 H: 6.40 N: 2.70

Ευρ. (%) C: 60.51 H: 6.15 N: 2.31

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3):

δ 7.63 (d, 1H, $J = 15.7$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}$), 7.44 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, ArH κουμενίου), 7.25 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, ArH κουμενίου), 6.34-6.26 (m, 2H, NH, $\text{CH}=\text{CH}$), 5.42-5.32 (2pseudo t, 2H, $J = 9.4, 9.5$ Hz, H-1, H-3), 5.09 (t, 1H, $J = 9.4$ Hz, H-4), 4.99 (t, 1H, $J = 9.6$ Hz, H-2), 4.33 (dd, 1H, $J = 4.4, 12.5$ Hz, H-6a), 4.10 (dd, 1H, $J = 1.7, 12.5$ Hz, H-6b), 3.88 (ddd, 1H, $J = 2.0, 4.1, 10.0$ Hz, H-5), 2.98-2.88 (m, 1H, $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$), 2.08, 2.04, 2.03 (3s, 12H, 4OAc), 1.28 (d, 6H, $J = 6.8$ Hz, $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3):

δ 171.3, 170.6, 169.9, 169.6, 166.0 (CO), 151.6, 143.3, 131.8, 128.2, 127.0, 118.2 ($\text{CH}=\text{CH}$, Ar-C), 78.5, 73.5, 72.7, 70.7, 68.2, 61.6 (C-1—C-6), 34.1, 23.8 ($\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$), 20.8, 20.7, 20.6 (OCOCH_3).

***N*-(*R*)-3-(4-Αιθυλοφαινυλο)βουτανοΐλο-(2,3,4,6-τετρακίς-*O*-ακετυλο)- β -*D*-γλυκοπυρανοζυλαμίνη (19e)**

Το επιθυμητό προϊόν **19e** συντίθεται ύστερα από ακυλίωση της αμίνης **18** από το ακυλοχλωρίδιο **e** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **19a**. Με τον ίδιο τρόπο, το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας (3:2) ώστε να ληφθεί το προϊόν **19e** με κίτρινη αφρώδη υφή και απόδοση 62%. $R_f = 0.42$ (*n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 3:2).

$[\alpha]_D^{22} = -2^\circ$ ($c = 0.20$, CHCl_3)

ESIMS m/z : 522.62 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Στοιχειακή Ανάλυση: ($\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{NO}_{10}$) C, H, N

Υπολ. (%) C: 59.87 H: 6.76 N: 2.69

Ευρ. (%) C: 60.24 H: 6.48 N: 2.98

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3):

δ 7.14-7.11 (m, 4H, ArH), 6.23 (d, 1H, $J = 9.2$ Hz, NH), 5.33-5.17 (2pseudo t, 2H, $J = 9.4, 9.5$ Hz, H-1, H-3), 5.04 (pseudo t, 1H, $J = 9.8$ Hz, H-4), 4.87 (pseudo t, 1H, $J = 9.6$ Hz, H-2), 4.32 (dd, 1H, $J = 4.3, 12.5$ Hz, H-6a), 4.06 (dd, 1H, $J = 2.0, 12.5$ Hz, H-6b), 3.80 (ddd, 1H, $J = 1.9, 4.0, 10.1$ Hz, H-5), 3.29-3.18 (m, 1H, CH), 2.65-2.41 (m, 4H, CH_2 , CH_2CH_3), 2.08-2.00 (m, 12H, 4OAc), 1.31-1.19 (m, 6H, CH_3 , CH_2CH_3).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3):

δ 176.6, 172.0, 171.0, 170.6, 169.6 (CO), 142.7, 142.2, 128.0, 126.6 (Ar-C), 78.0, 73.5, 72.6, 70.4, 68.0, 61.6 (C-1—C-6), 45.3, 42.4, 35.8 (CH, 2 CH_2), 28.3, 21.8, 20.7, 20.6, 15.5 (OCOCH_3 , CHCH_3 , CH_2CH_3).

***N*-(*S*)-3-(4-Ισοπροπυλοφαινυλο)-2-μεθυλοπροπανοϋλο-(2,3,4,6-τετρακίς-*O*-ακετυλο)- β -*D*-γλυκοπυρανοζυλαμίνη (**19f**)**

Το επιθυμητό ανάλογο **19f** συντίθεται από την ακετυλιωμένη αμίνη **18** ύστερα από ακυλίωση από το ακυλογλωρίδιο **f** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **19a**. Κατόπιν, το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας (1:1) ώστε να ληφθεί το προϊόν **19f** με κίτρινη αφρώδη υφή και απόδοση 63%. $R_f = 0.47$ (*n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 1:1).

$[\alpha]_D^{22} = +2^\circ$ ($c = 0.20$, CHCl_3)

ESIMS m/z : 536.38 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Στοιχειακή Ανάλυση: ($\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{NO}_{10}$) C, H, N

Υπολ. (%) C: 60.55 H: 6.96 N: 2.62

Ευρ. (%) C: 60.67 H: 6.72 N: 2.84

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3):

δ 7.13-7.04 (m, 4H, ArH κουμενίου), 6.23 (2d, 1H, $J = 9.3$ Hz, NH), 5.33-5.20 (2pseudo t, 2H, $J = 9.3, 9.5$ Hz, H-1, H-3), 5.05 (pseudo t, 1H, $J = 9.5$ Hz, H-4), 4.88 (t, 1H, $J = 9.6$ Hz, H-2), 4.33 (dd, 1H, $J = 3.6, 12.5$ Hz, H-6a), 4.06 (dd, 1H, $J = 2.0, 12.5$ Hz, H-6b), 3.81 (ddd, 1H, $J = 1.9, 4.9, 9.8$ Hz, H-5), 3.02-2.81 (m, 2H, CH_2), 2.57-2.40 (m, 2H, CH, $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$), 2.08, 2.02, 2.01, 1.99 (4s, 12H, 4OAc), 1.22, 1.20 (2d, 6H, $J = 6.9$ Hz, $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$), 1.12, 1.06 (2d, 3H, $J = 6.7$ Hz, CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3):

δ 176.3, 170.9, 170.6, 169.9, 169.6 (CO), 146.8, 136.3, 128.9, 126.4 (Ar-C), 78.1, 73.5, 72.5, 70.4, 68.1, 61.6 (C-1—C-6), 43.1, 38.9, 33.6 (2CH and CH_2), 24.0, 20.7, 20.6, 20.5, 17.1 ($\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$, OCOCH_3 , CHCH_3).

III.5 Σύνθεση αποπροστατευμένων γλυκοπυρανοζυλαμινών 20a-f

N-(*E*)-3-(Διφαινυλο-4-ολ)ακρυλοϋλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλαμίνη (20a)

Διάλυμα της ένωσης **19a** (0.18 mmol) σε μεθανολική αμμωνία (κορεσμένη στους 0 °C, 10 mL) αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h. Ο διαλύτης στη συνέχεια απομακρύνεται υπό κενό και το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης και διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη (4:1), οπότε παραλαμβάνεται το προϊόν **20a** ως λευκό παχύρευστο έλαιο και απόδοση 80%.

$R_f = 0.27$ (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 4:1).

$[\alpha]_D^{22} = -26^\circ$ ($c = 0.20$, MeOH)

ESIMS m/z: 386.67 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₁H₂₃NO₆) C, H, N

Υπολ. (%) C: 65.44 H: 6.02 N: 3.63

Ευρ. (%) C: 65.62 H: 5.74 N: 3.99

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆):

δ 8.68 (d, 1H, *J* = 9.2 Hz, NH), 7.76-7.30 (m, 10H, ArH, CH=CH), 6.72 (d, 1H, *J* = 15.7 Hz, CH=CH), 5.06, 4.97 (2brs, 3H, 3OH), 4.86 (t, 1H, *J* = 8.9 Hz, H-1), 4.56 (brs, 1H, OH), 3.68-3.53 (m, 2H, H-6), 3.23-3.04 (m, 4H, H-2–H-5).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆):

δ 165.3 (CO), 141.2, 139.4, 139.2, 134.0, 129.1, 128.3, 127.9, 127.3, 126.7, 122.1 (CH=CH, Ar-C), 79.7, 78.7, 77.6, 72.7, 70.0, 61.0 (C-1–C-6).

IR (KBr, cm⁻¹): 3423, 1655

***N*-4-(5,6,7,8-Τετραϋδروναφθαλενο-2-υλο)βουτανοϋλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλαμίνη
(20b)**

Το αποπροστατευμένο ανάλογο **20b** συντίθεται από τον ακετυλιωμένο πρόδρομό του **19b** με την ίδια πειραματική διαδικασία όπως περιγράφηκε για την ένωση **20a**. Το επιθυμητό προϊόν λήφθηκε ως κίτρινο παχύρευστο έλαιο, ύστερα από χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλυσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη (4:1) σε απόδοση 76%. R_f = 0.28 (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 4:1).

[α]_D²² = -36° (c = 0.20, MeOH)

ESIMS m/z: 380.71 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₀H₂₉NO₆) C, H, N

Υπολ. (%) C: 63.31 H: 7.70 N: 3.69

Ευρ. (%) C: 63.61 H: 8.01 N: 3.31

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆):

δ 8.29 (d, 1H, *J* = 9.2 Hz, NH), 6.95-6.85 (m, 3H, ArH), 4.97, 4.88 (2br s, 3H, 3OH), 4.70 (t, 1H, *J* = 9.0 Hz, H-1), 4.48 (br s, 1H, OH), 3.61 (dd, 1H, *J* = 3.7, 11.9 Hz, H-6a), 3.19-3.00 (m, 5H, H-2—H-5, H-6b), 2.67 (m, 4H, τετραϋδروναφθαλένιο), 2.19-2.07 (m, 2H, CH₂), 1.75-1.70 (m, 8H, 2CH₂, τετραϋδروναφθαλένιο).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆):

δ 172.4 (CO), 138.7, 136.3, 133.8, 128.8, 125.6 (Ar-C), 79.5, 78.5, 77.6, 72.5, 70.0, 61.0 (C-1—C-6), 34.9, 34.3, 28.8, 28.4, 26.8, 22.9, 22.6 (3CH₂ και 4CH₂ τετραϋδروναφθαλένιου).

IR (KBr, cm⁻¹): 3453, 1654

***N*-2-(Διφαινυλο-4-υλοξυ)ακετυλ-β-D-γλυκοπυρανοζυλαμίνη (20c)**

Το αποπροστατευμένο ανάλογο **20c** συντίθεται από τον ακετυλιωμένο πρόδρομο του **19c** με την ίδια πειραματική διαδικασία όπως περιγράφηκε για την ένωση **20a**. Με τον ίδιο τρόπο, η ένωση **20c** λήφθηκε ως κίτρινο παχύρευστο έλαιο, ύστερα από χρωματογραφία στήλης και διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη (4:1) σε απόδοση 68%. R_f = 0.25 (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 4:1).

$[\alpha]_D^{22} = +2^\circ$ ($c = 0.20$, MeOH)

ESIMS m/z : 390.38 ($M+H^+$)

Στοιχειακή Ανάλυση: ($C_{20}H_{23}NO_7$) C, H, N

Υπολ. (%) C: 61.69 H: 5.95 N: 3.60

Ευρ. (%) C: 61.33 H: 6.09 N: 3.77

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6):

δ 8.66 and 8.40 (d, $J = 9.1$ Hz, 0.82H, NH; d, $J = 9.1$ Hz, 0.18H, NH), 7.62-6.99 (m, 9H, ArH), 5.43, 4.80 (pseudo t, $J = 8.3$ Hz, 0.18H, H-1, pseudo t, $J = 8.8$ Hz, 0.82H, H-1), 5.09, 4.97 (2br s, 3H, 3OH), 4.67-4.40 (m, 3H, CH_2 , OH), 3.68-3.37 and 3.23-3.04 (2m, 6H, H-2—H-6).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6):

δ 168.1 (CO), 157.4, 139.7, 133.2, 128.9, 127.7, 126.8, 126.2, 115.2 (Ar-C), 79.4, 78.8, 77.4, 72.3, 70.0, 66.8, 60.9 (C-1—C-6, CH_2).

IR (KBr, cm^{-1}): 3399, 1655

N-(E)-3-(4-Ισοπροπυλοφαινυλο)ακρυλοϋλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλαμίνη (20d)

Το αποπροστατευμένο ανάλογο **20d** συντίθεται από την ακετυλιωμένη ένωση **19d** με την ίδια πειραματική διαδικασία όπως περιγράφηκε για το προϊόν **20a**. Όμοια, η ένωση **20c** λήφθηκε ως λευκό παχύρευστο έλαιο, ύστερα από χρωματογραφία στήλης και διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη (4:1) σε απόδοση 78%. $R_f = 0.32$ (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 4:1).

$[\alpha]_D^{22} = +1^\circ$ ($c = 0.20$, MeOH)

ESIMS m/z: 352.51 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₈H₂₅NO₆) C, H, N

Υπολ. (%) C: 61.52 H: 7.17 N: 3.99

Ευρ. (%) C: 61.69 H: 6.77 N: 4.19

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆):

δ 8.55 (d, 1H, $J = 9.1$ Hz, NH), 7.48-7.43 (m, 3H, ArH κουμενίου, CH=CH), 7.28 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, ArH κουμενίου), 6.60 (d, 1H, $J = 15.8$ Hz, CH=CH), 4.99, 4.94, 4.89 (3d, $J = 4.7, 5.5, 5.3$ Hz, 3H, 3OH), 4.83 (t, 1H, $J = 9.0$ Hz, H-1), 4.49 (t, 1H, $J = 5.8$ Hz, OH), 3.64 (dd, 1H, $J = 5.7, 10.4$ Hz, H-6a), 3.43-3.48 (m, 1H, H-6b), 3.23-3.03 (m, 4H, H-2—H-5), 2.91-2.85 (m, 1H, CH), 1.18 (d, 6H, $J = 6.9$ Hz, CH₃-CH-CH₃).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆):

δ 165.4 (CO), 150.3, 139.6, 132.5, 127.7, 127.0, 121.1 (CH=CH, Ar-C), 79.7, 78.6, 77.6, 72.7, 70.0, 61.0 (C-1—C-6), 33.3, 23.7 (CH₃-CH-CH₃).

IR (KBr, cm⁻¹): 3343, 1663

***N*-(*R*)-3-(4-Αιθυλοφαινυλο)βουτανοΐλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλαμίνη (20e)**

Το αποπροστατευμένο ανάλογο **20e** συντίθεται από το ακετυλιωμένο προϊόν **19e** με την ίδια πειραματική διαδικασία όπως περιγράφηκε για το προϊόν **20a**. Όμοια, η ένωση **20e** λήφθηκε ως κίτρινο παχύρευστο έλαιο, ύστερα από χρωματογραφία στήλης με διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη (4:1) και απόδοση 66%. R_f = 0.5 (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 4:1).

$[\alpha]_D^{22} = -2^\circ$ ($c = 0.20$, MeOH)

ESIMS m/z : 354.36 ($M+H^+$)

Στοιχειακή Ανάλυση: ($C_{18}H_{27}NO_6$) C, H, N

Υπολ. (%) C: 61.17 H: 7.70 N: 3.96

Ευρ. (%) C: 61.57 H: 7.34 N: 3.58

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6):

δ 8.34 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, NH), 7.15-7.10 (m, 4H, ArH), 4.94, 4.86 (2br s, 3H, 3OH), 4.71 (pseudo t, 1H, $J = 9.2$ Hz, H-1), 4.44-4.42 (m, 1H, OH), 3.65-3.60 (m, 1H, H-6a), 3.18-3.04 (m, 6H, H-2–H-5, H-6b, CH), 2.57-2.53 and 2.41-2.27 (2m, 4H, CH_2 , CH_2CH_3), 1.24-1.14 (m, 6H, $CHCH_3$, CH_2CH_3).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6):

δ 171.4 (CO), 144.0, 141.2, 127.7, 126.6 (Ar-C), 79.5, 78.5, 77.6, 72.5, 70.0, 61.0 (C-1–C-6), 43.9, 35.2, 27.8 (CH, $2CH_2$), 21.6, 15.7 ($CHCH_3$, CH_2CH_3).

IR (KBr, cm^{-1}): 3436, 1655

***N*-(*S*)-3-(4-Ισοπροπυλοφαινυλο)-2-μεθυλοπροπανοϋλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλαμίνη
(20f)**

Το αποπροστατευμένο ανάλογο **20f** συντίθεται από το ακετυλιωμένο ανάλογο **19f** με την ίδια πειραματική διαδικασία όπως περιγράφηκε για το προϊόν **20a**. Όμοια, η ένωση **20f** λήφθηκε ως κίτρινο παχύρευστο έλαιο, ύστερα από χρωματογραφία στήλης, διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη (4:1) και απόδοση 81%. $R_f = 0.41$ (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 4:1).

$[\alpha]_D^{22} = +2^\circ$ ($c = 0.20$, MeOH)

ESIMS m/z : 368.62 ($M+H^+$)

Στοιχειακή Ανάλυση: ($C_{19}H_{29}NO_6$) C, H, N

Υπολ. (%) C: 62.11 H: 7.96 N: 3.81

Ευρ. (%) C: 62.25 H: 7.67 N: 3.44

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6):

δ 8.34 (2d, 1H, $J = 9.1$ Hz, NH), 7.14-7.10 (m, 4H, ArH κουμενίου), 4.96-4.40 (m, 5H, H-1, 4OH), 3.66-3.40 και 3.21-3.03 (2m, 6H, H-2—H-6), 2.92-2.80 (m, 2H, CH_2), 2.54 και 2.41 (2m, 2H, CH, $CH_3-CH-CH_3$), 1.18 (d, 6H, $J = 6.9$ Hz, $CH_3-CH-CH_3$), 0.92 (2d, 3H, $J = 6.8$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6):

δ 175.6 (CO), 145.8, 137.2, 128.9, 126.0 (Ar-C), 79.6, 78.5, 77.6, 72.6, 70.0, 60.9 (C-1—C-6), 41.4, 38.7, 33.0 (2CH, CH_2), 24.0, 17.0 ($CH_3-CH-CH_3$, $CHCH_3$).

IR (KBr, cm^{-1}): 3349, 1654

Πα.6 Σύνθεση της 2,3,4,6-τετρακίς-*O*-ακετυλο- β -D-γλυκοκυρανοζυλουργίας (21) (Pinter *et al.*, 1995)

Σε 10 mL άνυδρο THF διοχετεύθηκαν ταυτόχρονα υπό ατμόσφαιρα αζώτου NH_3 και CO_2 για περίπου 30 λεπτά μέχρι τη δημιουργία καρβαμιδικού αμμωνίου ως ίζημα. Σε αυτό προστίθεται διάλυμα της ένωσης **17** (2 mmol) σε άνυδρο THF (10 mL) και κατόπιν προστίθεται στάγδην και διάλυμα τριφένυλοφωσφίνης (Ph_3P , 2.2 mmol) σε 6 mL άνυδρο THF. Το εναιώρημα αφήνεται υπό ανάδευση για 24 h. Μετά το πέρας της

αντίδρασης (TLC), το μίγμα της αντίδρασης φιλτράρεται και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό και η ένωση **21** με λευκή αφρώδη υφή, ύστερα από χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη (9.5:0.5) και απόδοση 81%. $R_f = 0.24$ (διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη 9.5:0.5).

$[\alpha]_D^{22} = +3^\circ$ ($c = 0.20$, CHCl_3)

ESIMS m/z : 391.09 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Στοιχειακή Ανάλυση: ($\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_{10}$) C, H, N

Υπολ. (%) C: 46.15 H: 5.68 N: 7.18

Ευρ. (%) C: 45.93 H: 5.80 N: 7.32

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3):

δ 5.60 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, NH), 5.30 (t, 1H, $J = 9.3$, H-3), 5.08 (m, 2H, H-1, H-4), 4.91 (t, 1H, $J = 9.4$ Hz, H-2), 4.30 (dd, 1H, $J = 4.5$, 12.4 Hz, H-6a), 4.10 (dd, 1H, $J = 1.3$, 12.4 Hz, H-6b), 3.81 (ddd, 1H, $J = 2.4$, 4.4, 9.8 Hz, H-5), 2.07, 2.06, 2.03, 2.01 (4s, 12H, 4OAc).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3):

δ 170.8, 170.6, 170.3, 170.1, 163.7, 81.5, 73.9, 72.7, 71.4, 71.1, 65.8, 20.7, 20.6, 20.4.

III.7 Σύνθεση των προστατευμένων γλυκοπυρανοζυλουριών 22a-f

N-(*E*)-3-(Διφαινυλο-4-υλο)ακρυλοϋλο-*N'*-(2,3,4,6-τετρακίς-*O*-ακετυλο)-β-*D*-γλυκοπυρανοζυλουρία (22a)

Σε διάλυμα του ακυλογλωριδίου **a** (18 mmol) σε 20 mL άνυδρο CHCl₃, προστίθενται υπό ατμόσφαιρα αζώτου 0.59 mmol ZnCl₂ και 2.56 mmol από την ουρία **21** και το προκύπτον εναιώρημα αναδεύεται με κάθετο ψυκτήρα έως το πέρας της αντίδρασης (TLC). Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου, και εκκλιίζεται με CHCl₃ (x2). Η οργανική φάση αφού συλλεχθεί, ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄ και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται κατόπιν με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας (1:1) ως τη λήψη του επιθυμητού προϊόντος με λευκή αφρώδη υφή και απόδοση 44%. R_f = 0.28 (*n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 1:1).

$$[\alpha]_D^{22} = +4^\circ (c = 0.20, \text{CHCl}_3)$$

ESIMS m/z: 597.31 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₃₀H₃₂N₂O₁₁) C, H, N

Υπολ. (%) C: 60.40 H: 5.41 N: 4.70

Ευρ. (%) C: 60.17 H: 5.59 N: 4.83

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ 9.37 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, NH), 9.1 (s, 1H, NH), 7.86 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz, CH=CH), 7.68-7.38 (m, 9H, ArH), 6.51 (d, 1H, *J* = 15.7 Hz, CH=CH), 6.39-5.29 (2pseudot, 2H, *J* = 9.6, 9.4 Hz, H-1, H-3), 5.17-5.08 (2pseudot, 2H, *J* = 9.4, 9.5 Hz, H-4, H-2), 4.25 (dd, 1H, *J* = 4.3, 12.5 Hz, H-6a), 4.10 (dd, 1H, *J* = 1.9, 12.4 Hz, H-6b), 3.83 (ddd, 1H, *J* = 2.1, 4.1, 10.0 Hz, H-5), 2.06, 2.05, 2.03, 2.01 (4s, 12H, 4OAc).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3):

δ 170.6, 170.1, 169.8, 169.4, 166.4, 154.8 (CO), 145.4, 143.7, 139.9, 132.8, 128.9, 128.8, 128.0, 127.7, 127.0, 118.3 (CH=CH, Ar-C), 79.0, 73.6, 73.0, 70.0, 68.2, 61.6 (C-1-C-6), 20.7, 20.6, 20.5 (OCOCH₃).

N-4-(5,6,7,8-Τετραϋδροναφθαλενο-2-υλο)βουτανοϋλο-*N'*-(2,3,4,6-τετρακίς-*O*-ακετυλο)- β -*D*-γλυκοπυρανοζυλουρία (**22b**)

Για τη λήψη του προϊόντος **22b**, σε διάλυμα του ακυλογλωριδίου **b**, ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική πορεία που περιγράφηκε για την ένωση **22a**. Όμοια, το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας (1:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **22b** με κίτρινη αφρώδη υφή και απόδοση 38%. $R_f = 0.38$ (*n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 1:1).

$[\alpha]_D^{22} = +2^\circ$ ($c = 0.20$, CHCl_3)

ESIMS m/z : 591.18 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Στοιχειακή Ανάλυση: ($\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_{11}$) C, H, N

Υπολ. (%) C: 58.97 H: 6.49 N: 4.74

Ευρ. (%) C: 59.31 H: 6.67 N: 4.53

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3):

δ 6.99-6.86 (m, 4H, ArH, NH), 6.13 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, NH), 5.34-5.25 (2pseudot, 2H, $J = 9.4, 8.9$ Hz, H-1, H-3), 5.06 (t, 1H, $J = 9.9$ Hz, H-4), 4.90 (t, 1H, $J = 9.6$ Hz, H-2), 4.30 (dd, 1H, $J = 3.8, 11.9$ Hz, H-6a), 4.08 (dd, 1H, $J = 1.1, 12.5$ Hz, H-6b), 3.82 (ddd, 1H, $J = 1.8, 3.8, 10.3$ Hz, H-5), 2.73 (m, 4H, τετραϋδροναφθαλένιο), 2.60 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz, CH₂), 2.38 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz, CH₂), 2.09, 2.03, 2.02, 2.01 (4s, 12H, 4OAc), 1.95-1.88 (m, 2H, CH₂), 1.79 (m, 4H, τετραϋδροναφθαλένιο).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3):

δ 173.8, 170.5, 169.9, 169.7, 169.4, 152.9 (CO), 137.7, 137.3, 135.2, 129.3, 129.1, 125.6 (Ar-C), 79.1, 73.7, 73.2, 70.4, 68.4, 61.8 (C-1–C-6), 36.4, 34.4, 29.4, 29.1, 26.0, 23.3, 23.2 (3CH_2 , τετραϋδροναφθαλένιο), 20.7, 20.5, 20.4 (OCOCH_3).

***N*-2-(Διφαινυλο-4-υλοξυ)ακετυλ-*N'*-(2,3,4,6-τετρακισ-*O*-ακετυλο)- β -*D*-γλυκοπυρανοζυλουρία (22c)**

Για τη λήψη του προϊόντος **22c**, σε διάλυμα του ακυλογλωριδίου **c**, ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική πορεία που περιγράφηκε για την ένωση **22a**. Με τον ίδιο τρόπο, το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας (1:1) ώστε να ληφθεί το επιθυμητό προϊόν **22c** με κίτρινη αφρώδη υφή και απόδοση 62%. $R_f = 0.32$ (*n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 1:1).

$[\alpha]_D^{22} = +16^\circ$ ($c = 0.20$, CHCl_3)

ESIMS m/z : 601.25 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Στοιχειακή Ανάλυση: ($\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_{12}$) C, H, N

Υπολ. (%) C: 58.00 H: 5.37 N: 4.66

Ευρ. (%) C: 57.88 H: 5.73 N: 5.06

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3):

δ 8.92 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, NH), 8.51 (s, 1H, NH), 7.58-7.30 (m, 7H, ArH), 7.00 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, ArH), 7.35-5.25 (2pseudot, 2H, $J = 9.4, 9.2$ Hz, H-1, H-3), 5.14-5.06 (2pseudot, 2H, $J = 9.7, 9.5$ Hz, H-4, H-2), 4.63, 4.58 (q, AB-system, 2H, $J = 16.3$ Hz, CH_2), 4.28 (dd, 1H, $J = 4.4, 12.5$ Hz, H-6a), 4.13 (dd, 1H, $J = 2.1, 12.4$ Hz, H-6b), 3.83 (ddd, 1H, $J = 2.2, 4.3, 10.1$ Hz, H-5), 2.09, 2.04, 2.03, 2.02 (4s, 12H, 4OAc).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3):

δ 170.7, 170.0, 169.8, 169.5, 169.4, 169.3 (CO), 157.4, 140.6, 134.8, 128.8, 128.4, 128.2, 126.8, 114.9 (Ar-C), 77.9, 75.0, 72.9, 70.1, 68.0, 67.5, 61.4 (CH_2 , C1-C6), 20.7, 20.6, 20.5 (OCOCH_3).

N-(*E*)-3-(4-Ισοπροπυλοφαινυλο)ακρυλοϋλο-*N'*-(2,3,4,6-τετρακίς-*O*-ακετυλο)- β -*D*-γλυκοπυρανοζυλουρία (**22d**)

Σε διάλυμα του ακυλογλωριδίου **d**, ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική πορεία που περιγράφηκε για την ένωση **22a**. Με τον ίδιο τρόπο, το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας (1:1) ώστε να ληφθεί η ένωση **22d** με λευκή αφρώδη υφή και απόδοση 67%. $R_f = 0.36$ (*n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 1:1).

$[\alpha]_D^{22} = -4^\circ$ ($c = 0.20$, CHCl_3)

ESIMS m/z : 563.27 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Στοιχειακή Ανάλυση: ($\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_{11}$) C, H, N

Υπολ. (%) C: 57.64 H: 6.09 N: 4.98

Ευρ. (%) C: 57.46 H: 6.34 N: 5.29

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3):

δ 9.32 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, NH), 8.59 (m, 1H, NH), 7.80 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, CH=CH), 7.47 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, ArH κουμενίου), 7.28 (d, 2H, $J = 10.1$ Hz, ArH κουμενίου), 6.39 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, CH=CH), 5.37-5.27 (2pseudot, 2H, $J = 9.4, 9.8$ Hz, H-1, H-3), 5.15-5.08 (2pseudot, 2H, $J = 9.4, 9.6$ Hz, H-4, H-2), 4.26 (dd, 1H, $J = 4.4, 12.4$ Hz, H-6a), 4.15-4.08 (dd, 1H, $J = 1.6, 12.3$ Hz, H-6b), 3.83 (ddd, 1H, $J = 2.1, 4.1, 10.0$ Hz, H-5), 2.99-2.90 (m, 1H, $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$), 2.05, 2.03 (2s, 12H, 4OAc), 1.27 (d, 6H, $J = 6.9$ Hz, $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3):

δ 170.7, 170.1, 169.9, 169.4, 166.3, 154.4 (CO), 152.5, 146.1, 131.4, 128.5, 127.2, 127.1 (CH=CH, Ar-C), 79.0, 73.6, 73.0, 70.1, 68.1, 61.6 (C-1–C-6), 34.2, 23.7 (CH_3 -CH- CH_3), 20.7, 20.6, 20.5 (OCOCH_3).

N-(*R*)-3-(4-Αιθυλοφαινυλο)βουτανοϋλο-*N'*-(2,3,4,6-τετρακίς-*O*-ακετυλο)-β-*D*-γλυκοπυρανοζυλουρία (**22e**)

Σε διάλυμα του ακυλογλωριδίου **e**, ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε για την ένωση **22a**. Όμοια, το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας (1:1) ώστε να ληφθεί το προϊόν **22e** με κίτρινη αφρώδη υφή και απόδοση 44%. $R_f = 0.28$ (*n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 1:1).

$[\alpha]_D^{22} = -10^\circ$ ($c = 0.20$, CHCl_3)

ESIMS m/z : 565.31 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Στοιχειακή Ανάλυση: ($\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_{11}$) C, H, N

Υπολ. (%) C: 57.44 H: 6.43 N: 4.96

Ευρ. (%) C: 57.34 H: 6.72 N: 4.57

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3):

δ 9.03 (t, 1H, $J = 8.4$ Hz, NH), 8.28 (s, 1H, NH), 7.19-7.11 (m, 4H, ArH), 5.31-5.16 (2pseudot, 2H, $J = 9.4, 9.2$ Hz, H-1, H-3), 5.12-5.02 (2pseudot, 2H, $J = 9.5, 10.0$ Hz, H-4, H-2), 4.25 (dd, 1H, $J = 4.3, 12.4$ Hz, H-6a), 4.11 (dd, 1H, $J = 2.0, 12.6$ Hz, H-6b), 3.80 (ddd, 1H, $J = 2.1, 4.0, 10.7$ Hz, H-5), 3.35-3.22 (m, 1H, CH), 3.69-3.54 (m, 4H, CH_2 , CH_2CH_3), 2.07, 2.02, 2.01, 1.98 (4s, 12H, 4OAc), 1.34-1.20 (m, 6H, CH_3 , CH_2CH_3).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3):

δ 175.9, 172.3, 171.5, 170.1, 169.8, 154.4 (CO), 142.5, 142.4, 128.7, 126.6 (Ar-C), 77.9, 73.3, 72.4, 70.7, 68.2, 61.6 (C-1–C-6), 45.5, 42.3, 36.0 (CH, 2 CH_2), 27.7, 21.0, 20.8, 20.7, 20.4, 15.1 (OCOCH_3 , CHCH_3 , CH_2CH_3).

***N*-(*S*)-3-(4-Ισοπροπυλοφαινυλο)-2-μεθυλοπροπανοϋλο-*N'*-(2,3,4,6-τετρακίς-*O*-ακετυλο)- β -*D*-γλυκοπυρανοζυλογουρία (22f)**

Σε διάλυμα του ακυλοχλωριδίου **f**, ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε για την ένωση **22a**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας (1:1) ώστε να ληφθεί το προϊόν **22f** με κίτρινη αφρώδη υφή και απόδοση 35%. $R_f = 0.33$ (*n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 1:1).

$[\alpha]_D^{22} = +4^\circ$ ($c = 0.20$, CHCl_3)

ESIMS m/z : 579.32 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Στοιχειακή Ανάλυση: ($\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_{11}$) C, H, N

Υπολ. (%) C: 58.12 H: 6.62 N: 4.84

Ευρ. (%) C: 58.26 H: 6.35 N: 4.72

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3):

δ 10.0 (t, 1H, $J = 10.1$ Hz, NH), 8.10 (2br s, 1 H, NH), 7.17-7.05 (m, 4 H, ArH κουμηνίου), 5.32-5.18 (2pseudot, 2H, $J = 9.4, 9.1$ Hz, H-1, H-3), 5.12-5.03 (2pseudot, 2H, $J = 9.4, 8.5$ Hz, H-4, H-2), 4.26 (dd, 1H, $J = 4.3, 12.5$ Hz, H-6a), 4.09 (dd, 1H, $J = 1.6, 12.4$ Hz, H-6b), 3.77 (ddd, 1H, $J = 2.0, 4.0, 10.1$ Hz, H-5), 3.05-2.83 (m, 2H, CH_2), 2.69-2.58 (m, 2H, CH, $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$), 2.08, 2.07, 2.02, 2.01 (4s, 12H, 4 OAc), 1.24, 1.23 (2d, 6H, $J = 6.9$ Hz, $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$), 1.19 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3):

δ 177.2, 170.5, 170.0, 169.5, 169.3, 153.8 (CO), 147.4, 135.8, 128.8, 126.7 (Ar-C), 79.1, 73.8, 73.2, 70.4, 68.4, 61.8 (C-1–C-6), 43.9, 39.1, 33.7 (2CH, CH_2), 23.9, 20.6, 20.5, 20.4, 16.8 ($\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$, OCOCH_3 , CHCH_3).

Πα.8 Σύνθεση των αποπροστατευμένων γλυκοπυρανοζυλουργίων 23a-f

N-(*E*)-3-(Διφαινυλο-4-υλ)ακρυλοϋλο-*N'*-β-D-γλυκοπυρανοζυλουργία (23a)

Σε διάλυμα της ένωσης **22a** (0.18 mmol) σε άνυδρη MeOH (1 mL) προστίθενται 1-2 σταγόνες 1M μεθανολικού μεθοδεΐδιου του νατρίου (NaOMe) και το μίγμα της αντίδρασης διατηρείται σε πάγο έως το πέρας της (20 min, TLC, οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 4:1). Στη συνέχεια το διάλυμα εξουδετερώνεται με όξινη ρητίνη Amberlyst 15 και φιλτράρεται. Ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό και το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη (4:1), οπότε παραλαμβάνεται το προϊόν **23a** υπό τη μορφή λευκού παχύρευστου ελαίου σε απόδοση 71%. $R_f = 0.22$ (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 4:1);

$[\alpha]_D^{22} = +2^\circ$ ($c = 0.20$, MeOH).

ESIMS m/z : 429.17 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Στοιχειακή Ανάλυση: ($\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_7$) C, H, N

Υπολ. (%) C: 61.67 H: 5.65 N: 6.54

Ευρ. (%) C: 61.39 H: 5.48 N: 6.65

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD):

δ 7.83 (d, 1H, $J = 15.7$ Hz, CH=CH), 7.71-7.65 (m, 6H, ArH), 7.51-7.36 (m, 3H, ArH), 6.76 (d, 1H, $J = 15.7$ Hz, CH=CH), 4.98 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz, H-1), 3.88 (m, 1H, H-6a), 3.71 (dd, 1H, $J = 4.4, 11.8$ Hz, H-6b), 3.50-3.37 (m, 4H, H-2-H-5).

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD):

δ 168.8, 156.3 (CO), 145.6, 144.9, 141.4, 134.7, 130.0, 129.9, 128.6, 128.0, 120.2 (CH=CH, Ar-C), 82.2, 79.8, 79.1, 74.6, 71.6, 65.1, 62.9 (C-1-C-6).

N-4-(5,6,7,8-Τετραϋδρωναφθαλενο-2-υλο)βουτανοϋλο-N'-β-D-γλυκοπυρανοζυλουρία (23b)

Σε διάλυμα της ένωσης **22b**, ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε για την ένωση **23a**. Το προκύπτον μίγμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης και διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη (4:1), οπότε λαμβάνεται το επιθυμητό παράγωγο **23b** ως κίτρινο παχύρευστο έλαιο και απόδοση 80%. $R_f = 0.25$ (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 4:1)

$[\alpha]_D^{22} = +22^\circ$ ($c = 0.20$, MeOH)

ESIMS m/z : 423.16 ($M+H^+$)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₁H₃₀N₂O₇) C, H, N

Υπολ. (%) C: 59.70 H: 7.16 N: 6.63

Ευρ. (%) C: 59.85 H: 7.01 N: 6.49

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD):

δ 6.94-6.85 (m, 3H, ArH), 4.90 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, H-1), 3.85-3.80 (m, 1H, H-6a), 3.66 (dd, 1H, $J = 4.4, 11.9$ Hz, H-6b), 3.44-3.35 and 3.28-3.22 (2m, 4H, H-2-H-5),

2.71 (m, 4H, τετραϋδروναφθαλένιο), 2.56, 2.33, 1.90 (3t, 6H, $J = 7.5, 7.3, 7.5$ Hz, 3CH₂), 1.78 (m, 4H, τετραϋδροναφθαλένιο).

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD):

δ 177.2, 156.0 (CO), 139.7, 138.1, 135.8, 130.1, 126.7 (Ar-C), 82.1, 79.8, 79.1, 74.5, 71.6, 62.9 (C-1–C-6), 36.8, 35.6, 30.4, 30.1, 27.7, 24.6, 24.5 (3CH₂, 4CH₂ τετραϋδροναφθαλενίου).

***N*-2-(Διφαινυλο-4-υλοξυ)ακετυλ-*N'*-β-D-γλυκοπυρανοζυλουρία (23c)**

Σε διάλυμα του προστατευμένου αναλόγου **23c** (1 mmol) σε άνυδρη MeOH (4 mL) προστίθενται 0.5 mmol Bu₂SnO και το προκύπτον εναιώρημα αναδεύεται με κάθετο ψυκτήρα για 2 h. Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC) ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό και το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη (4:1), οπότε λαμβάνεται η ένωση **23c** με τη μορφή κίτρινου παχύρευστου ελαίου και απόδοση 83%. R_f = 0.18 (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 4:1).

$[\alpha]_D^{22} = -8^\circ$ ($c = 0.20$, MeOH)

ESIMS m/z: 433.18 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₁H₂₄N₂O₈) C, H, N

Υπολ. (%) C: 58.33 H: 5.59 N: 6.48

Ευρ. (%) C: 58.67 H: 5.32 N: 6.23

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD):

δ 7.59-7.56 (m, 4H, ArH), 7.40, 7.28 (2t, 3H, $J = 7.6$ Hz, ArH), 7.10-7.07 (m, 2H, ArH), 5.04 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz, H-1), 4.61 (q, AB-system, 2H, $J = 15.0$ Hz, CH_2), 3.84 (m, 1H, H-6a'), 3.68 (dd, 1H, $J = 4.4, 11.8$ Hz, H-6b'), 3.46-3.36 (m, 4H, H-2'-H-5').

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD):

δ 172.1, 158.7 (CO), 141.9, 136.2, 129.8, 129.2, 127.7, 127.6, 116.3 (Ar-C), 80.9, 79.5, 79.0, 73.9, 71.3, 68.4, 62.6 (C1-C6, CH_2).

N-(E)-3-(4-Ισοπροπυλοφαινυλο)ακρυλοϋλο-N'-β-D-γλυκοπυρανοζυλουρία (23d)

Σε διάλυμα της ένωσης **22d**, ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε για την ένωση **23a**. Το προκύπτον μίγμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης και διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη (4:1) ώστε να ληφθεί η ένωση **23d** με τη μορφή λευκού παχύρευστο ελαίου σε απόδοση 76%.

$R_f = 0.29$ (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 4:1).

$[\alpha]_D^{22} = +20^\circ$ ($c = 0.20$, MeOH)

ESIMS m/z : 395.20 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Στοιχειακή Ανάλυση: ($\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_7$) C, H, N

Υπολ. (%) C: 57.86 H: 6.64 N: 7.10

Ευρ. (%) C: 57.69 H: 6.29 N: 7.23

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD):

δ 7.74 (d, 1H, $J = 15.7$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}$), 7.53, 7.29 (2d, 4H, $J = 8.2$ Hz ArH κουμενίου), 6.64 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}$), 4.94 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, H-1), 3.85 (m, 1H, H-6a),

3.67 (dd, 1H, $J = 4.4, 11.6$ Hz, H-6b), 3.46-3.34 (m, 4H, H-2–H-5), 2.97-2.88 (m, 1H, CH), 1.25 (d, 6H, CH_3 -CH- CH_3).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD):

δ 168.9, 156.4 (CO), 153.5, 146.2, 133.4, 129.6, 128.2, 119.3 (CH=CH, Ar-C), 82.2, 79.8, 79.1, 74.6, 71.6, 62.9 (C-1–C-6), 35.4, 24.1 (CH_3 -CH- CH_3).

N-(*R*)-3-(4-Αιθυλοφαινυλο)βουτανοϋλο-*N'*-β-*D*-γλυκοπυρανοζυλουρία (**23e**)

Σε διάλυμα της ένωσης **22e**, ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε για την ένωση **23a**. Το προκύπτον μίγμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης και διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη (4:1) οπότε λαμβάνεται η ένωση **23e** ως κίτρινο παχύρευστο έλαιο σε απόδοση 68%. $R_f = 0.46$ (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 4:1).

$[\alpha]_D^{22} = +20^\circ$ ($c = 0.20$, MeOH)

ESIMS m/z : 397.16 ($M+H^+$)

Στοιχειακή Ανάλυση: ($C_{19}H_{28}N_2O_7$) C, H, N

Υπολ. (%) C: 57.56 H: 7.12 N: 7.07

Ευρ. (%) C: 57.73 H: 6.86 N: 6.70

1H NMR (300 MHz, CD_3OD):

δ 7.13-7.09 (m, 4H, ArH), 4.88 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, H-1), 3.83 (m, 1H, H-6a), 3.70-3.62 (m, 1H, H-6b), 3.42-3.34 and 3.26-3.19 (2m, 4H, H-2–H-5), 2.64-2.53 (m, 5H, CH, CH_2 , CH_2CH_3), 1.29-1.24 (m, 6H, $CHCH_3$, CH_2CH_3).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD):

δ 176.0, 155.9 (CO), 145.7, 143.7, 129.0, 127.8 (Ar-C), 82.1, 79.8, 79.0, 74.5, 71.5, 62.8 (C-1-C-6), 45.9, 37.2, 29.4 (CH, 2CH_2), 22.3, 16.1 (CHCH_3 , CH_2CH_3).

N-(*S*)-3-(4-Ισοπροπυλοφαινυλο)-2-μεθυλοπροπανοΐλο-*N'*- β -*D*-
γλυκοπυρανοζυλουρία (**23f**)

Σε διάλυμα της ένωσης **22f**, ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε για την ένωση **23a**. Το προκύπτον μίγμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης και διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη (4:1) οπότε λαμβάνεται η ένωση **23f** ως κίτρινο παχύρευστο έλαιο και απόδοση 70%. $R_f = 0.37$ (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 4:1).

$[\alpha]_D^{22} = +36^\circ$ ($c = 0.20$, MeOH)

ESIMS m/z : 411.26 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Στοιχειακή Ανάλυση: ($\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_7$) C, H, N

Υπολ. (%) C: 58.52 H: 7.37 N: 6.82

Ευρ. (%) C: 58.33 H: 7.63 N: 6.42

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD):

δ 7.15-7.08 (m, 4H, ArH κουμινίου), 4.90 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, H-1), 4.36 (m, 2H, CH_2), 3.84 (m, 1H, H-6a), 3.68 (dd, 1H, $J = 4.3, 12.0$ Hz, H-6b), 3.46-3.35 (m, 4H, H-2-H-5), 3.00-2.83 and 2.81-2.57 (2m, 4H, CH_2 , CH, $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$), 1.22 (d, 6H, $J = 6.9$ Hz, $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$), 1.14 (2d, 3H, $J = 6.8$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD):

δ 180.3, 156.1 (CO), 148.2, 137.8, 130.0, 127.5 (Ar-C), 82.0, 79.8, 79.0, 74.4, 71.3, 62.7 (C-1–C-6), 44.4, 40.0, 35.1 (2CH, CH_2), 24.5, 17.8 ($\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$, CHCH_3).

Ιβ. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

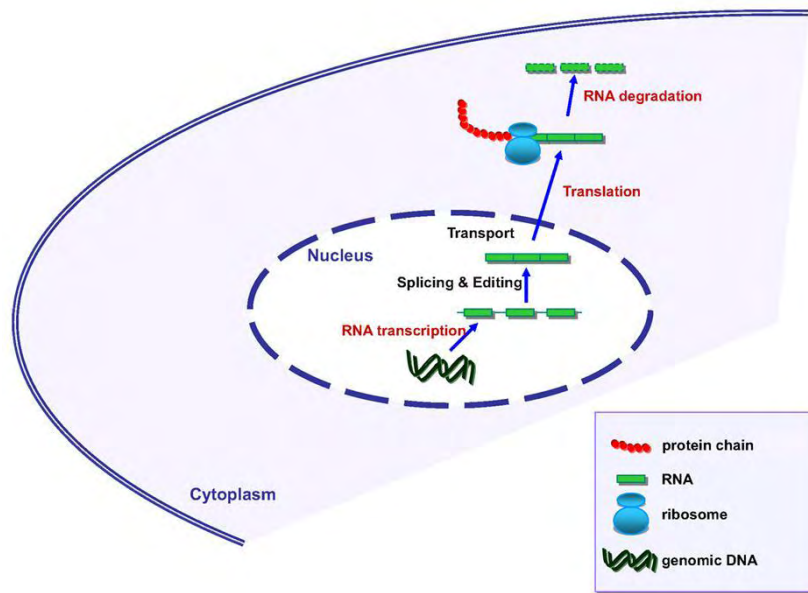
Ιβ.1 Μεταβολισμός του RNA

Ο μεταβολισμός του RNA, το σύνολο δηλαδή των διαδικασιών που αφορούν το συγκεκριμένο μόριο και περιλαμβάνουν τη μεταγραφή, το μάτισμα, τη μετάφραση αλλά και την αποικοδόμησή του, είναι διαδικασίες εξελικτικά συντηρημένες και υπόκεινται σε αυστηρό έλεγχο.

Με τον τρόπο αυτό, όλοι οι πληθυσμοί κυττάρων συνθέτουν RNA με βάση πρότυπα DNA και RNA και τη βοήθεια ειδικών ενζύμων, των RNA πολυμερασών. Από τα διάφορα είδη RNA που προκύπτουν τα μεταφορικά RNAs (mRNAs) χρησιμοποιούνται ως πρότυπα για τη μετάφραση, τα ριβοσωμικά RNAs επιτελούν κεντρικές διαδικασίες των ριβοσωμάτων όπως η αναγνώριση του mRNA και η δημιουργία του πεπτιδικού δεσμού, ενώ τα tRNAs εναποθέτουν τα αμινοξέα στο σημείο της πρωτεϊνοσύνθεσης, διαβάζοντας το γενετικό κώδικα μέσω του κανόνα της συμπληρωματικότητας των βάσεων. (Anantharaman *et al.*, 2002)

Δεδομένου ότι οι ανωτέρω διαδικασίες συμβαίνουν συνεχώς για να καλύψουν τις ανάγκες και συνεπώς τη βιωσιμότητα του κυττάρου, είναι εμφανές ότι τα κύτταρα παράγουν μεγαλύτερους πληθυσμούς RNA από ότι πραγματικά χρειάζονται να χρησιμοποιήσουν. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητο να υπάρχουν εκτός από τα κατάλληλα συστήματα σύνθεσης κι εκείνα της αποικοδόμησης, τα οποία θα καταστρέφουν τους πληθυσμούς σε συγκεκριμένο χρόνο. (Houseley *et al.*, 2009)

Υπάρχουν 3 είδη ενδοκυτταρικών ενζύμων αποικοδόμησης του RNA (ριβονουκλεασών, RNases): ριβονουκλεάσες που αποικοδομούν εσωτερικά το RNA, 5'-3' εξωνουκλεάσες, οι οποίες υδρολύουν το RNA από το 5' προς το 3' άκρο και οι 3'-5' εξωνουκλεάσες που αποικοδομούν από το 3' προς το 5' άκρο. Η πλειοψηφία των γενωμάτων κωδικοποιεί πληθώρα ριβονουκλεασών, συχνά με αλληλεπικαλύπτουσες δράσεις ενώ γενικά μετάλλαξη σε ένα και μόνο ένζυμο του συστήματος αποικοδόμησης δε σταματά τη διαδικασία υπονοώντας ότι πολλαπλά ένζυμα είναι σε θέση να αναγνωρίζουν τον ίδιο πληθυσμό RNA για αποικοδόμηση. (Houseley *et al.*, 2009)



Εικόνα 9. Σχηματική απεικόνιση του μεταβολισμού του RNA στα κύτταρα των θηλαστικών.

Ιβ.2 Ριβονουκλεάσες

Οι ριβονουκλεάσες (RNases), όπως αναφέρθηκε, είναι ένζυμα που καταλύουν την αποικοδόμηση των RNAs ελέγχοντας μεταμεταγραφικά τον πληθυσμό τους στα κύτταρα. Οι RNases και πιο συγκεκριμένα η παγκρεατική ριβονουκλεάση Α των θηλαστικών (RNase A), η πιο καλά μελετημένη ριβονουκλεάση της υπεροικογένειας των ριβονουκλεασών, έχει αποδειχθεί εξαιρετικό μοντέλο για τη μελέτη της δομής, της σταθερότητας και του μηχανισμού κατάλυσης των πρωτεϊνών. (Tsirkone *et al.*, 2009)

Έχει βρεθεί ότι η ριβονουκλεολυτική δραστηριότητα των ριβονουκλεασών σχετίζεται με ποικίλες φλεγμονώδεις αντιδράσεις και τον καρκίνο. Συγκεκριμένα, η ανθρώπινη αγγειογενίνη (Ang, RNase 5) επάγει την αγγειογένεση ενεργοποιώντας τα ενδοθηλιακά και τα λεία μυϊκά κύτταρα προκαλώντας βιολογικές διαδικασίες όπως η κυτταρική μετανάστευση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η εισβολή (μετάσταση) και η εμπλοκή κατά το σχηματισμό δομών του κινητοχώρου. Η σπερματική ριβονουκλεάση των βοοειδών (BS-RNase), από την άλλη, εμφανίζει ανοσοκατασταλτικές και εμβρυοτοξικές ιδιότητες ενώ η ογκογονάση, μια ριβονουκλεάση των οωκυττάρων του βατράχου του γένους *Rana pipiens* αποτελεί μια ιδιαίτερα ισχυρή τοξίνη για πολλές μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές. Δύο

RNAases των ηωσινόφιλων, η νευροτοξίνη προερχόμενη από τα ηωσινόφιλα (eosinophil derived neurotoxin, EDN; RNase 2) και η κατιονική πρωτεΐνη των ηωσινόφιλων (eosinophil cationic protein, ECP; RNase 3) έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται τόσο στη φλεγμονή όσο και τον πολλαπλασιασμό των ιών. (Russo *et al.*, 2001)

Για τους παραπάνω λόγους, οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν φαρμακευτικούς στόχους για το σχεδιασμό μορίων-αναστολέων, ώστε να κατασταλεί η παθολογική τους δράση. Οι προσπάθειες για το σχεδιασμό τέτοιων μορίων στοχεύουν την πατρική RNase A καθώς είναι πιο εύκολη στο χειρισμό κατά τις μελέτες συγγένειας με τα μόρια των αναστολέων και το ενεργό της κέντρο είναι συντηρημένο σε όλα τα υπόλοιπα μέλη της υπεροικογένειας.

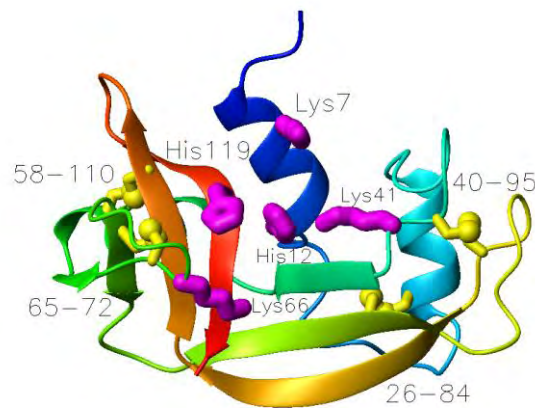
Στην κεντρική καταλυτική αύλακα των ριβονουκλεασών ενυπάρχουν πολλά υποκέντρα όπου προσδένεται το υπόστρωμα RNA. Αυτά ορίζονται ως P₀...P_n, R₀...R_n και B₀...B_n ανάλογα πιο τμήμα του RNA (φωσφορικό, ριβόζη, βάση) προσδένεται αντίστοιχα ενώ ο δείκτης n συμβολίζει τη θέση της ομάδας σύμφωνα με τον αποικοδομημένο φωσφοδιεστερικό δεσμό όταν n=1. Παρά το ότι το ενεργό κέντρο είναι συντηρημένο σε όλες τις ριβονουκλεάσες υπάρχουν αρκετές δομικές διαφορές όσον αφορά τα περιφερικά κέντρα πρόσδεσης του RNA διαφοροποιώντας την ειδικότητά τους για διαφορετικά υποστρώματα. Αυτό θα μπορούσε να είναι ένα δεδομένο για το σχεδιασμό συγκεκριμένων αναστολέων για κάθε RNase. (Raines, 1998)

Ιβ.3 Παγκρεατική ριβονουκλεάση A (RNase A)

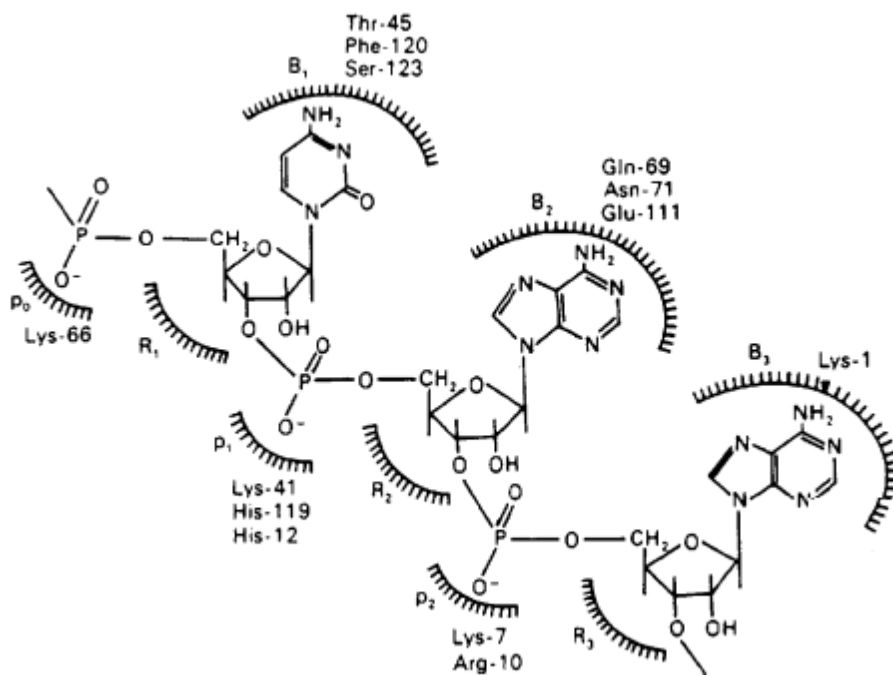
Η RNase A (EC 3.1.27.5) ήταν από τα πρώτα ένζυμα που απομονώθηκαν σε μεγάλες ποσότητες σε καθαρή, κρυσταλλική μορφή. Αυτή η διαθεσιμότητα σε συνδυασμό με την αυξημένη σταθερότητά της, την έλλειψη συμπαραγόντα και το μικρό μοριακό της βάρος (13686 Da, 124 αμινοξέα) έκανε την πρωτεΐνη, ένζυμο επιλογής για πληθώρα μελετών που κάλυπταν όλα τα πεδία της επιστημονικής έρευνας.

Η αντίδραση που καταλύεται από την RNase A παρουσιάστηκε για πρώτη φορά το 1961 από τις ερευνητικές ομάδες των Rabin και Mathias λίγο νωρίτερα από την αποκρυπτογράφηση της πλήρους δομής της πρωτεΐνης και της τριτοταγούς της δομής (Εικόνα 10). Σύμφωνα με αυτή καταλύει τη διάσπαση ενός δεσμού P-O^{5'} σε έναν κλώνο RNA και την υδρόλυση ενός P-O^{2'} δεσμού ενός νουκλεοζίτη στην 3'-θέση

ενός πυριμιδινικού καταλοίπου. (Cuchillo *et al.*, 2011) Στην Εικόνα 11 απεικονίζεται το ενεργό κέντρο του ενζύμου σε σύμπλοκο με το υπόστρωμα, RNA.



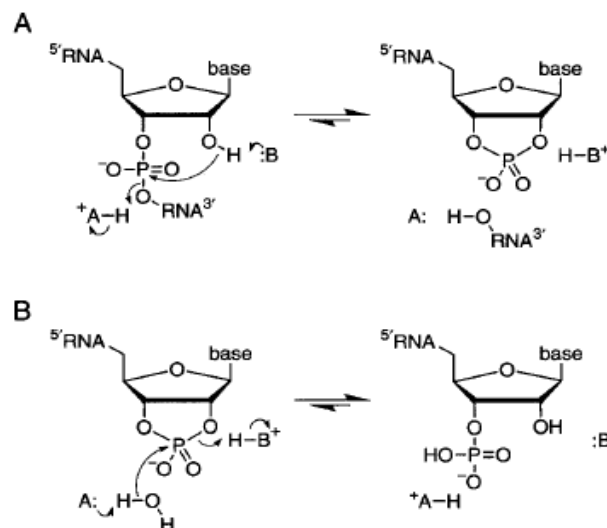
Εικόνα 10. Σχηματικό διάγραμμα της δομής της RNase A. Απεικονίζονται με το μπλε χρώμα το αμινο-τελικό και με το κόκκινο το καρβοξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης ενώ ως κίτρινες σφαίρες φαίνονται τα άτομα θείου των κυστεϊνών που σταθεροποιούν τη δομή με δισουλφιδικούς δεσμούς. (PDB 7RSA)



Εικόνα 11. Σχηματικό διάγραμμα του ενεργού κέντρου της RNase A σε σύμπλοκο με το υπόστρωμά της. B, R και p είναι τα υπόκεντρα για σύνδεση της βάσης, της ριβόζης και της φωσφορικής ομάδας αντίστοιχα. Το υπόκεντρο B₁ είναι ειδικό για πυριμιδίνες ενώ το B₂ για πουρίνες. Ένα 3'-πυριμιδινικό μονονουκλεοτίδιο προσδένεται στη θέση B₁R₁p₁ ενώ ο φωσφοδιεστερικός δεσμός που πρόκειται να διασπαστεί είναι εκείνος της θέσης p₁. (Cuchillo *et al.*, 2011)

Ιβ.4 Μηχανισμός Κατάλυσης της RNase A

Η RNase A καταλύει τη διάσπαση του P-O^{5'} του RNA. Έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί για τον τρόπο δράσης της, ο παρακάτω μηχανισμός όμως συνοψίζει όλη τη μέχρι σήμερα γνωστή εργασία όσον αφορά το ένζυμο. Σύμφωνα με αυτόν, η πλευρική αλυσίδα του καταλοίπου της His12 δρα ως βάση αποσπώντας ένα πρωτόνιο από το οξυγόνο που βρίσκεται στη 2'-θέση του υποστρώματος μορίου RNA κι επομένως διευκολύνει την προσβολή του ατόμου φωσφόρου. Η προσβολή αυτή πραγματοποιείται ούτως ώστε να εκτοπιστεί το νουκλεοτίδιο από τη θέση του. Η πλευρική αλυσίδα της His119 δρα ως οξύ πρωτονιώνοντας το οξυγόνο στην 5'-θέση ώστε να διευκολυνθεί η μετατόπιση αυτή. Τα προϊόντα των αντιδράσεων αυτών απελευθερώνονται στο διαλύτη. Η υδρόλυση του 2',3'κυκλικού φωσφοδιεστέρα πραγματοποιείται σε διαφορετικό στάδιο ομοιάζοντας με μια αντίστροφη τρανσφωσφορυλίωση. Προφανώς και οι δύο αντιδράσεις συμβαίνουν μέσω μεταβατικών σταδίων που περιλαμβάνουν ένα άτομο πεντασθενούς φωσφόρου. Η πλευρική αλυσίδα της Lys41 και η κύρια αλυσίδα της Phe120 ενισχύουν την κατάλυση με το να σταθεροποιούν αυτά τα μεταβατικά στάδια. Πολλά στοιχεία σχετικά με το μηχανισμό που αφορούν τον ακριβή ρόλο των ατόμων κάθε καταλοίπου στο ενεργό κέντρο μένουν να διευκρινιστούν. (Raines, 1998)



Εικόνα 12. (A) Ο μηχανισμός της αντίδρασης τρανσφωσφορυλίωσης που καταλύεται από την RNase A. (B) Ο μηχανισμός της αντίδρασης υδρόλυσης που καταλύει το ένζυμο. Όπου «A» πρόκειται για το κατάλοιπο της His119 και όπου «B» για το κατάλοιπο της His12. (Raines, 1998)

Ιβ.5 Κρυσταλλική δομή της RNase A

Κάθε μόριο του ενζύμου αποτελείται από 3 ελικοειδείς περιοχές οι οποίες απαρτίζονται αντίστοιχα από τα κατάλοιπα 3-13 (έλικα H1), 24-34 (έλικα H2) και 50-60 (έλικα H3). Οι έλικες H2 και H3 εμφανίζονται αρκετά διαστρεβλωμένες και σχηματίζουν δομικά στοιχεία χαρακτηριστικά των ελίκων 3_{10} . Μεγάλο μέρος της επιφάνειας του ενζύμου καλύπτουν επίσης β δευτεροταγείς δομές με το σκελετό να αποτελείται από ένα ζεύγος β αντιπαράλληλων φύλλων (κατάλοιπα 71-92 και 94-110). Όμοια τα φύλλα αυτά εμφανίζονται σε πολλά σημεία διαστρεβλωμένα και αποκλίνουν από το γενικό κανόνα. (Wlodawer *et al.*, 1981)

Η πλειοψηφία των μορίων του διαλύτη καλύπτει την επιφάνεια του ενζύμου, και ειδικότερα το ενεργό κέντρο του. Τα μόρια νερού βρίσκονται ομαδοποιημένα σε ομάδες των τριών σχηματίζοντας ένα τετράεδρο, ενώ η τέταρτη θέση συμπληρώνεται από ένα άτομο οξυγόνου ή αζώτου της πλευρικής αλυσίδας ενός αμινοξέος της πρωτεΐνης. (Wlodawer *et al.*, 1981; Esposito *et al.*, 2000)

Κατά την κρυσταλλογραφική ανάλυση του ενζύμου παρατηρήθηκαν επίσης, τρεις δεσμοί υδρογόνου μεταξύ του αζώτου και του οξυγόνου των αμινοξέων Lys1-Lys37, Ser23-Ser15 και Thr70-Asp38 αντίστοιχα ενώ αλληλεπιδράσεις Van der Waals εντοπίστηκαν στις περιοχές των καταλοίπων 87-88 ως 114-116, 68 ως 92 και 38 ως 70. (Wlodawer *et al.*, 1981)

Όσον αφορά το ενεργό κέντρο του ενζύμου, όπου προσδένεται το υπόστρωμα RNA, αποτελείται από διάφορες περιοχές οι οποίες χαρακτηρίζονται ως $P_o...P_n$, $R_o...R_n$ και $B_o...B_n$ ανάλογα με το αν προσδένουν τη φωσφορική ομάδα, τη ριβόζη ή τη βάση του μορίου. (Raines, 1998) Περαιτέρω κρυσταλλογραφικές μελέτες του ενζύμου με ένα μόριο αναστολέα μπορούν κάθε φορά να αποκαλύψουν τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της πρόσδεσης, κι εφόσον το ενεργό κέντρο των νουκλεασών είναι υψηλά συντηρημένο να σχεδιαστούν ενώσεις με καλύτερες σταθερές αναστολείς.

Ιβ.6 Ενεργό κέντρο

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα κρυσταλλογραφικών μελετών της πρωτεΐνης με ή χωρίς αναστολέα φάνηκε ότι οι πλευρικές αλυσίδες των παρακάτω αμινοξέων His12, His119, Lys41, Phe 120, Asp121, Gln11 συνδέονται άμεσα με την καταλυτική του δραστηριότητα. (Deakynne *et al.*, 1979; Borkakoti, 1983; Raines, 1998)

- *His12* και *His119*

Τα κατάλοιπα ιστιδίνης στο μόριο της RNase A φάνηκε από νωρίς ότι παίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό κατάλυσης του ενζύμου. Πιο συγκεκριμένα, διάφορα οξέα αλογόνου βρέθηκαν να καρβοξυμεθυλιώνουν το ένζυμο στα συγκεκριμένα κατάλοιπα καθιστώντας το ανενεργό. (Barnard *et al.*, 1959a; Gundlach *et al.*, 1959; Crestfield *et al.*, 1962; Barnard *et al.*, 1959β) Παρόλα αυτά, υπάρχουν περιπτώσεις όπου μόνο το ένα από τα δύο κατάλοιπα αλκυλιώνεται σε κάθε μόριο της RNase A.

Τεχνικές ανασυνδυασμού πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν για να παράγουν παραλλαγές του ενζύμου στις οποίες είτε η *His12* είτε η *His119* είχαν αντικατασταθεί από ένα κατάλοιπο Ala. (Thompson *et al.*, 1994) Ωστόσο, οι αλλαγές αυτές δεν είχαν κάποια επίδραση στην τρισδιάστατη δομή της κρυσταλλικής μορφής του ενζύμου. (Park *et al.*, 2001) Αφαίρεση του ιμιδαζολίου της *His12* οδήγησε σε μείωση της ικανότητας αποικοδόμησης μιας πολυ(C) αλυσίδας, του δινουκλεοτιδίου UrA (uridylyl(3',5')adenosine) και UrOC₆H₄-p-NO₂ κατά 104 φορές. Ομοίως αφαίρεση της ομάδας ιμιδαζολίου της *His119* οδήγησε σε μείωση της ικανότητας αποικοδόμησης κατά 104 φορές για την πολυ(C) αλυσίδα, το UrA δινουκλεοτίδιο, δεν επηρέασε όμως καθόλου την ικανότητα να αποικοδομεί UrOC₆H₄-p-NO₂. Γεγονός που υποδηλώνει ότι η αξία του ιμιδαζολίου της *His119* στο μηχανισμό της κατάλυσης εξαρτάται από το pKa του συζυγούς οξέος της αποχωρούσας ομάδας και μειώνεται όσο μειώνεται το pKa του συζυγούς οξέος της αποχωρούσας ομάδας. Αυτή είναι μια ισχυρή ένδειξη ότι ο ρόλος του συγκεκριμένου καταλοίπου είναι η πρωτονίωση της αποχωρούσας ομάδας κατά την αποικοδόμηση του RNA. Γενικά μπορούμε να πούμε ότι εφόσον η *His119* έχει ταυτοποιηθεί με δράση οξέος, η *His12* έχει το ρόλο της βάσης κι αντιστρόφως.

- *Lys41*

Χημικές τροποποιήσεις του ενζύμου στο κατάλοιπο της *Lys41* έδειξαν το ρόλο της συγκεκριμένης θέσης στο μηχανισμό της κατάλυσης. (Murdock *et al.*, 1966) Η υπόθεση αυτή υποστηρίχθηκε κι από το γεγονός ότι αλλαγή του καταλοίπου της *Lys* στη συγκεκριμένη θέση από ένα κατάλοιπο Arg χάνει την ικανότητα να αποικοδομεί την κυτιδίνη που είναι τρανσφωσφορυλιωμένη στις θέσεις 2' και 3' του σακχάρου κατά 98%. (Trautwein *et al.*, 1991) Ο ρόλος του συγκεκριμένου καταλοίπου είναι ο σχηματισμός ενός μόνο δεσμού υδρογόνου κατά τη μεταβατική κατάσταση της αντίδρασης κατάλυσης.

- *Phe120*

Διαδραματίζει έμμεσο ρόλο στο μηχανισμό της κατάλυσης βοηθώντας την πρόσδεση της πυριμιδινικής βάσης του υποστρώματος στο ένζυμο και τον προσανατολισμό της His12. Επιπλέον η πλευρική αλυσίδα του συγκεκριμένου καταλοίπου είναι κρίσιμη για τη δομική σταθερότητα. (Raines, 2004)

- *Asp121*

Μπορεί να αλληλεπιδρά με την His119 κατά την αποικοδόμηση, αποτελώντας μια καταλυτική δυάδα μαζί της εφόσον η ιστιδίνη που καταλύει αντιδράσεις οξέος/βάσης σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το κατάλοιπο ασπαρτικού. Η δυάδα αυτή παίζει σημαντικό ρόλο μα όχι καθοριστικό για το μηχανισμό κατάλυσης πιθανότατα τοποθετώντας στο χώρο το κατάλληλο ταυτομερές της ιστιδίνης σταθεροποιώντας δομικά το ένζυμο. εφόσον. Επιπλέον, το κατάλοιπο ασπαρτικού οξέος είναι αρκετά προσβάσιμο στο διαλύτη και μπορεί να σχηματίσει και με αυτόν δεσμούς υδρογόνου. (Schwoen, 1988; Neurath, 1989; Raines, 2004)

- *Gln11*

Εξυπηρετεί την αύξηση της ελεύθερης ενέργειας του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος εφόσον η διάσταση του ενζύμου από το υπόστρωμά του αποτελεί απαραίτητο γεγονός για την αποτελεσματικότητά του. Απουσία της πλευρικής αλυσίδας του συγκεκριμένου καταλοίπου, το RNA είναι πιο πιθανό να προσδεθεί στο ενεργό κέντρο με ακατάλληλο προσανατολισμό. Φαίνεται πως ο σχηματισμός ενός δεσμού υδρογόνου ανάμεσα στη γλουταμίνη και ένα φωσφορικό οξυγόνο αποτρέπει μια τέτοιου είδους πρόσδεση. (delCardayre *et al.*, 1995)

Ιβ.7 Ριβονουκλεάσες ως στόχοι για θεραπεία του καρκίνου

Οι ριβονουκλεάσες με αντικαρκινικές ιδιότητες είναι μικρές βασικές πρωτεΐνες (10-28 kDa) και εντοπίζονται στην υπεροικογονεία τόσο της ριβονουκλεάσης A όσο και της ριβονουκλεάσης T1. Οι κυτταροτοξικές τους ιδιότητες οφείλονται στην ενζυμική ικανότητα διάσπασης φωσφοδιεστερικών δεσμών του RNA. Προσδένονται στην αρνητικά φορτισμένη κυτταρική μεμβράνη και εισάγονται στα κύτταρα μέσω ενδοκυττάρωσης μετατοπίζονται στο κυτταρόπλασμα όπου αποφεύγοντας τον ενδοκυττάριο αναστολέα τους (Ribonuclease inhibitor, RI) αποικοδομούν το RNA. (Ardelt *et al.*, 2009)

Η RNase A ήταν το πρώτο ένζυμο της ομάδας αυτής που εξετάστηκε για την πιθανή του αντικαρκινική δράση *in vitro* (Ledoux, 1956; Ledoux *et al.*, 1955; Ledoux *et al.*, 1954) και *in vivo* (Ledoux, 1955α και β; Aleksandrowicz, 1958; Aleksandrowicz *et al.*, 1958; Telford *et al.*, 1958). Τα αποτελέσματα υπήρξαν αντιφατικά καθώς σε ορισμένες περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκε αντικαρκινική δράση παρά μόνο όταν χρησιμοποιήθηκαν μεγάλες ποσότητες του ενζύμου στην κρυσταλλική του μορφή και ύστερα από εισαγωγή του σε συμπαγείς όγκους.

Η πρώτη κλινική μελέτη που αφορούσε την RNase A η οποία αφορούσε 23 καρκινοπαθείς δεν εμφάνισε θεραπευτικό αποτέλεσμα αν και όταν το ένζυμο χορηγήθηκε απευθείας στον όγκο και σε μεγάλες ποσότητες (3mg/kg/ημέρα) εμφανίστηκε καταστολή ή ακόμα και εξαφάνισή του. (Yun *et al.*, 1972)

Ιβ.8 Αγγειογενίνη

Η αγγειογενίνη (Angiogenin, Ang) είναι μια μικρή πρωτεΐνη (14400 Da) αποτελούμενη από μια μονή αλυσίδα 123 αμινοξέων. Συμμετέχει σε όλες τις φυσιολογικές διαδικασίες του οργανισμού όπως η ανάπτυξη και η αναπαραγωγή καθώς διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά τη διαδικασία ανάπτυξης νέων κυττάρων του αίματος. Ωστόσο, σε παθολογικές καταστάσεις εμπλέκεται στη δημιουργία όγκων ενώ εμπλέκεται και σε πλήθος άλλων μη νεοπλασματικών ασθενειών. (Gao *et al.*, 2008; Folkman, 2007)

Φυσιολογικά το ένζυμο έχει τις εξής λειτουργίες:

- *Ριβονουκλεολυτική δραστηριότητα*

Η αγγειογενίνη είναι ομόλογη της RNase A κατά 33%. Παρόλο που οι κρυσταλλικές δομές των δύο ενζύμων έχουν πολλές ομοιότητες διαφέρουν ως προς το ενεργό κέντρο. Η ύπαρξη του αμινοξέος Gln117 κάνει τη ριβονουκλεολυτική δραστηριότητα της Ang 10^5 - 10^6 φορές χαμηλότερη από εκείνη της RNase A. Η μειωμένη ωστόσο αυτή δραστηριότητα του ενζύμου είναι απαραίτητη για τη λειτουργία του. (Strydom *et al.*, 1985; Acharya *et al.*, 1994; Russo *et al.*, 1994; Shapiro *et al.*, 1989α και β)

- *Επαγωγή κυτταρικής σηματοδότησης*

Παρόλο που οι υποδοχείς της Ang στα ενδοθηλιακά κύτταρα δεν είναι ακόμα επαρκώς καθορισμένοι έχουν προταθεί πολλά μονοπάτια τα οποία επάγονται ύστερα από ενεργοποίησή της. Έχει παρατηρηθεί ταυτόχρονη ενεργοποίηση των κινασών 1/2 και B/Akt σε κύτταρα HUVE (Liu *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2007) ως απόκριση της

ενεργοποίησης του ενζύμου ενώ πραγματοποιήθηκε και φωσφορυλίωση των κινασών SAPK/JNK σε κυτταρική σειρά HuASM. (Xu *et al.*, 2001) Πρόσδεση της Ang στην ακτίνη της επιφάνειας των κυττάρων προωθεί την ενεργοποίηση των συστήματος που συνδέεται με τη διείσδυση των κυττάρων στους ιστούς. (Hu *et al.*, 1994)

- *Επαγωγή της μεταγραφής του rRNA*

Όταν η Ang μετατοπίζεται στον πυρήνα των ενδοθηλιακών έχει παρατηρηθεί ότι επάγει τη μεταγραφή του ριβοσωμικού RNA ύστερα από πρόσδεσή της σε ένα στοιχείο γνωστό ως ABE (Angiogenin Binding Element) ενώ εξαρτάται κι από αυξητικούς παράγοντες όπως ο VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). (Xu *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2003; Kishimoto *et al.*, 2005)

- *Αποδόμηση της κυτταρικής μεμβράνης*

Η περιοχή μεταξύ των αμινοξέων 60-68 είναι κρίσιμη για την πρόσδεσή της Ang στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω ενός μορίου τύπου α-ακτίνης βοηθώντας τα ενδοθηλιακά κύτταρα να διεισδύουν και να μεταναστεύουν στους περιφερειακούς ιστούς. (Hallahan *et al.*, 1991; Soncin, 1992)

Σε παθολογικές καταστάσεις έχει βρεθεί ότι η Ang συνδέεται με την ανάπτυξη όγκων ενώ η έκφρασή της αυξάνεται σε διάφορους τύπους καρκίνου (καρκίνος μαστού, ήπατος, νεφρών, προστάτη, παγκρέατος, λευχαιμίες και λεμφώματα). (Yoshioka *et al.*, 2006) Εκτός από τον καρκίνο έχει επίσης παρατηρηθεί ο ρόλος της σε άλλες νόσους όπως η ενδομητρίωση, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, η ρευματοειδής αρθρίτιδα αλλά και ο διαβήτης. (Suzumori *et al.*, 2004; Burgmann *et al.*, 1996; Hosaka *et al.*, 1995; Chiarelli *et al.*, 2002)

Ιβ.9 Ηωσινοφιλική Νευροτοξίνη

Η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη (Eosinophil Derived Neurotoxin, EDN) είναι μια μικρή πρωτεΐνη (18400 Da) η οποία ανήκει στην υπερικογένεια της ριβονουκλεάσης A. Υπάρχει σε αφθονία στον ανθρώπινο οργανισμό καθώς βρίσκεται αποθηκευμένη εντός μικρών κοκκίων στο κυτταρόπλασμα των ηωσινόφιλων κυττάρων και εκκρίνεται ύστερα από την ενεργοποίησή τους από κάποιο ερέθισμα προκαλώντας βλάβη του ιστού στον οποίο βρίσκονται. (Acharya *et al.*, 2014; Rosenberg, 2008)

Κατηγοριοποιήθηκε ως νευροτοξίνη εξαιτίας της ικανότητάς της να θανατώνει επιλεκτικά τα κύτταρα Purkinje στην παρεγκεφαλίδα κουνελιών ύστερα από ένεση, τα οποία είχαν εκφυλιστεί εξαιτίας του συνδρόμου Gordon. (Fredens *et al.*, 1982; Gleich

et al., 1986) Εμφανίζει δε μειωμένη κυτταροτοξικότητα έναντι των παρασιτικών ελμίνθων του εντέρου καθώς και των επιθηλιακών κυττάρων του αναπνευστικού (Hamann *et al.*, 1987; Hamann *et al.*, 1990) ενώ συμμετέχει και στην ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων (Yang *et al.*, 2004).

Ως ριβονουκλεάση που είναι, εμφανίζει έντονη βιολογική δραστικότητα έναντι του μονόκλωνου RNA των ιών όπως ο RSV (Respiratory Syncytial Virus) και ο HIV (Human Immunodeficiency Virus) διαδραματίζοντας με τον τρόπο αυτό ενεργό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού έναντι των λοιμώξεων από τους εν λόγω ιούς. (Domachowske *et al.*, 1998)

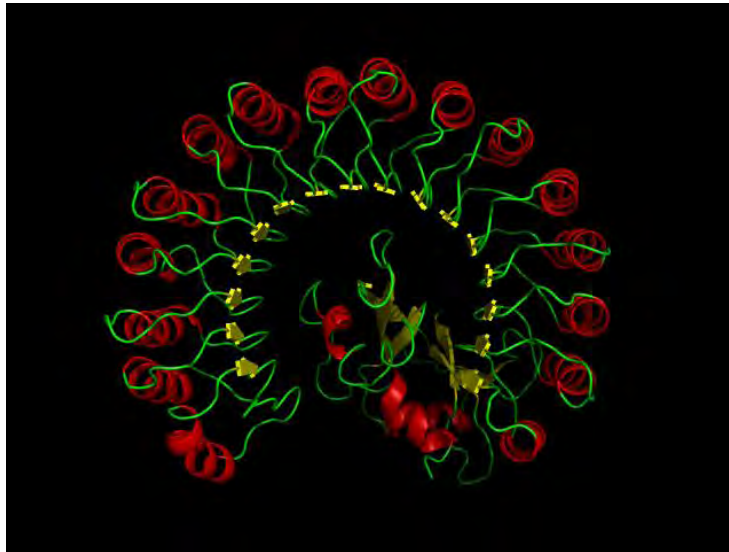
Ως μέλος της υπεροικογένειας της RNase A, η EDN έχει μόλις 36% ομοιότητα όσον αφορά την αλληλουχία των αμινοξέων της με την RNase A ενώ η ριβονουκλεολυτική της δραστικότητα είναι ~ 3-30 φορές μικρότερη. (Sorrentino *et al.*, 1992)

Πειράματα ανασυνδυασμού που πραγματοποιήθηκαν, με το ένζυμο έδειξαν ότι η κυτταροτοξικές ιδιότητές του, οι ιδιότητες νευροτοξίνης καθώς και οι αντικές του ιδιότητες είναι άμεσα συνδεδεμένες και εξαρτώνται από τη ριβονουκλεολυτική του ικανότητα (Domachowske *et al.*, 1998; Newton *et al.*, 1994) αν και οι φυσιολογικοί μηχανισμοί που διέπουν την ενζυμική του δράση χρειάζεται ακόμα να διερευνηθούν και να καθοριστούν επαρκώς. (Rosenberg *et al.*, 2008) Το βέβαιο είναι η δραστικότητα ριβονουκλεάσης του ενζύμου το καθιστά έναν ενδιαφέροντα στόχο για το σχεδιασμό μορίων-αναστολέων ώστε να περιοριστούν οι παθολογικοί μηχανισμοί στους οποίους εμπλέκεται.

Ιβ.10 Αναστολείς της RNase A

Οι μελέτες για την εύρεση πιθανών αναστολέων της οικογένειας αυτής στόχευσαν την πατρική ριβονουκλεάση A μιας και είναι πιο εύκολη στο χειρισμό και το ενεργό κέντρο είναι συντηρημένο σε μεγάλο βαθμό και στα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας. Ο φυσιολογικός αναστολέας της RNase A είναι μια κυτοσολική πρωτεΐνη μεγέθους 50 kDa (ribonuclease inhibitor, RI) με πιθανό ρόλο την προστασία των κυττάρων των θηλαστικών από την είσοδο παγκρεατικών ριβονουκλεασών στο εσωτερικό τους. Συνεπώς, ο RI διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη βιολογική δράση της RNase A και των ομολόγων της. Τα σύμπλοκα RI-ριβονουκλεασών ανήκουν μεταξύ των ισχυρότερων αλληλεπιδράσεων που είναι γνωστές. Η RNase A και τα

ομόλογά της προσδένονται στον RI με σταθερές πρόσδεσης της τάξης του fM και απενεργοποιούνται γρήγορα κατά την είσοδό τους στο κύτταρο. Ο βιολογικός ρόλος του RI δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, παρόλα αυτά είναι γνωστό ότι οι ριβονουκλεάσες που αναγνωρίζονται από αυτόν είναι εκκρινόμενες πρωτεΐνες με συγγένεια που είναι καθοριστική για την κυτταροτοξικότητά τους. (Blackburn *et al.*, 1982; Roth, 1967; Lee *et al.*, 1989)



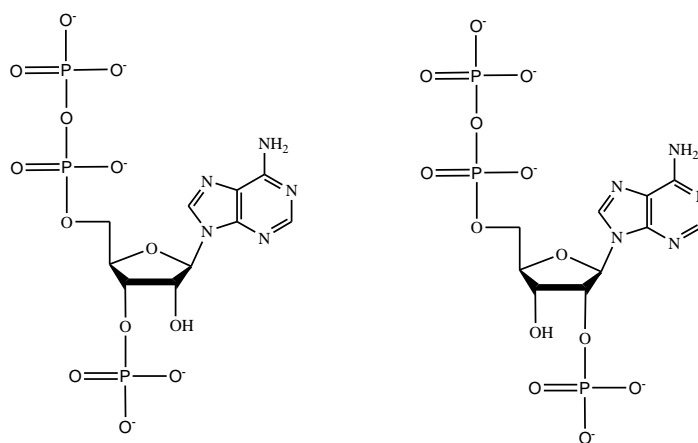
Εικόνα 13. Σχηματικό διάγραμμα του RI με τη ριβονουκλεάση. (PDB 1DFJ)

Άλλοι γνωστοί αναστολείς της RNase A είναι μόρια μικρού μοριακού βάρους, νουκλεοζίτες που σχηματίζουν σύμπλοκα με ιόντα βαναδίου (V) και οξοβαναδίου (IV). Τα σύμπλοκα ουριδίνης-βαναδικού (U>v) έχουν βρεθεί ότι αναστέλλουν την RNase A με σταθερά αναστολής K_i κοντά στα 10 μ M. (Lindquist *et al.*, 1973) Τα σύμπλοκα αυτά διαθέτουν μια σχεδόν τριγωνική γεωμετρία διπυραμίδας (Wlodawer *et al.*, 1983; Ladner *et al.*, 1997) όταν προσδένονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου κι έτσι θεωρήθηκε ότι ομοιάζουν με τη μεταβατική κατάσταση του ενζύμου, συλλογισμός ο οποίος δεν αποδείχθηκε πειραματικά. (Messmore *et al.*, 2000)

Ύστερα από την ανάλυση των πρώτων κρυσταλλογραφικών δεδομένων, οι έρευνες για την εξεύρεση πιθανών αναστολέων εστίαστηκαν σε πουρινικά ανάλογα τα οποία συνδέονται στην περιοχή B₂ του ενζύμου ενώ μετέπειτα αξιολογήθηκαν ως προς την ανασταλτική τους δράση και πυριμιδινικά ανάλογα τα οποία τείνουν να προσδένονται στην περιοχή B₁ του ενζύμου. (Tsirkone *et al.*, 2009) Στη βάση αυτή

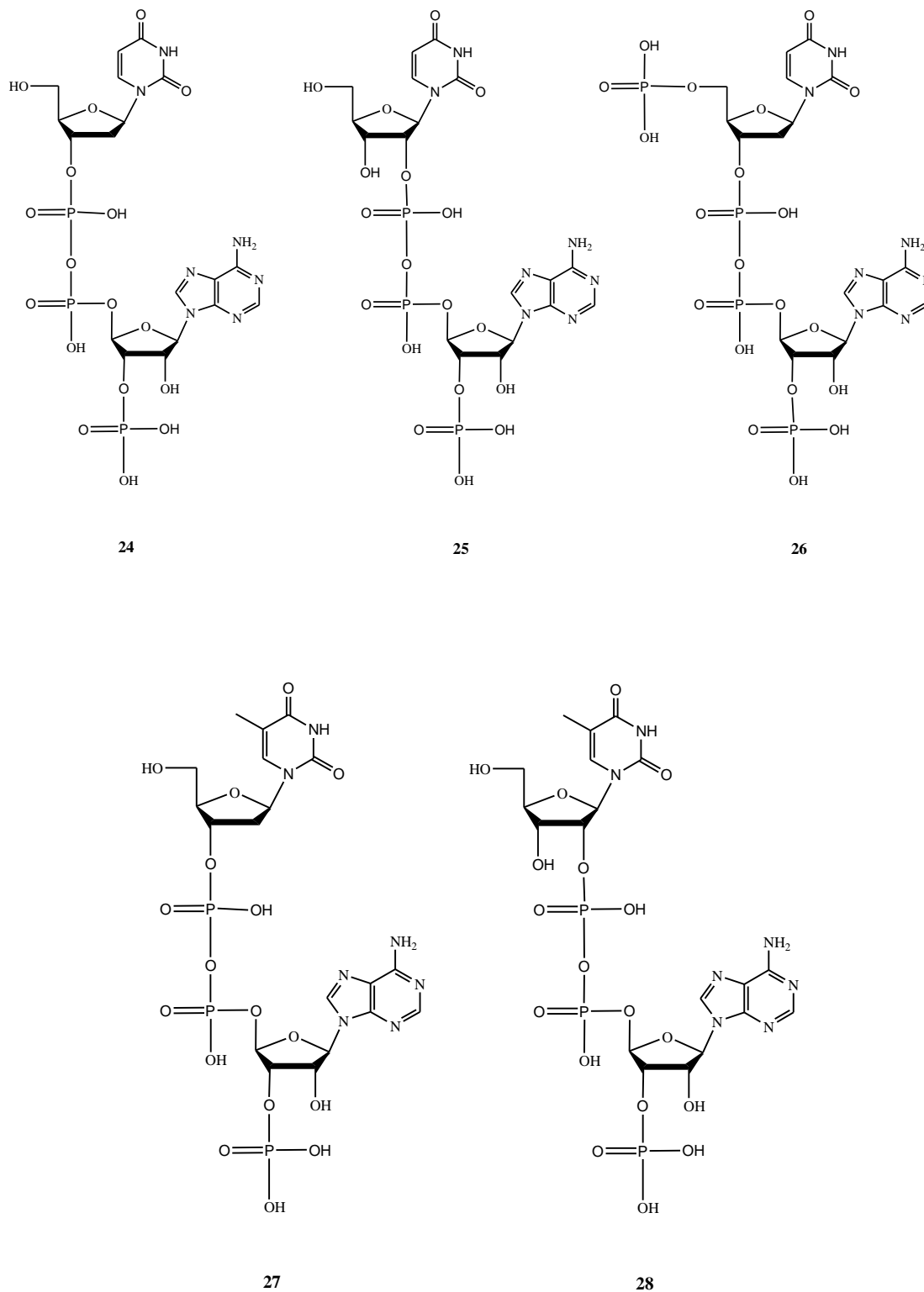
σχεδιάστηκαν και αξιολογήθηκαν τα μόρια που περιγράφονται στη συνέχεια (Εικόνα 14-15).

Ο πιο ισχυρός αναστολέας μικρού μοριακού βάρους ο οποίος προσδένεται στο ένζυμο είναι μέχρι στιγμής η 5'-διφωσφοαδενοσίνη με μια επιπλέον φωσφορική ομάδα στις θέσεις 3' ή 2' (Εικόνα 14) με σταθερές αναστολής K_i 0.24 και 0.52 μM αντίστοιχα. Τα δεδομένα που προέκυψαν από την κρυσταλλική μελέτη δείχνουν ότι τα μόρια αυτά προσδένονται στις θέσεις P_1 και B_2 . (Leonidas *et al.*, 1997)



Εικόνα 14. 5'-διφωσφοαδενοσίνη ως αναστολέας της RNase A. Στις θέσεις 3' και 2' αντίστοιχα φαίνονται οι επιπλέον φωσφορικές ομάδες.

Με στόχο να συνδυαστούν τα δεδομένα από την πρόσδεση πυριμιδινικών και πουρινικών αναλόγων ταυτόχρονα συντέθηκαν και αξιολογήθηκαν τα κάτωθι δινουκλεοτίδια (μόρια **24-28**, Εικόνα 15) όπου έφεραν μια ουρακίλη ή θυμίνη στη θέση της πυριμιδίνης και μια αδερίνη στη θέση της πουρίνης. Τα μόρια αυτά εμφάνισαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Russo *et al.*, 1999) για το σχεδιασμό αναστολέων αυτού του είδους, τα οποία παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.



Εικόνα 15. Δινουκλεοτίδια πουρίνης-πυριμιδίνης ως αναστολείς της RNase A

Πίνακας 10. Οι σταθερές αναστολής των δινουκλεοτιδίων πουρίνης-πυριμιδίνης (**24-28**) σε pH 5.9 και 7.0, αντίστοιχα.

Ένωση	Ki (μM, pH)	
	5.9	7.0
24	0.12±0.01	0.70±0.07
25	0.13±0.02	9.2±1.8
26	0.027±0.002	0.22±0.04
27	0.041±0.006	0.18±0.03
28	4±0.4	-

Ιβ.11 Τροποποιημένοι νουκλεοζίτες ως κυτταροστατικοί παράγοντες

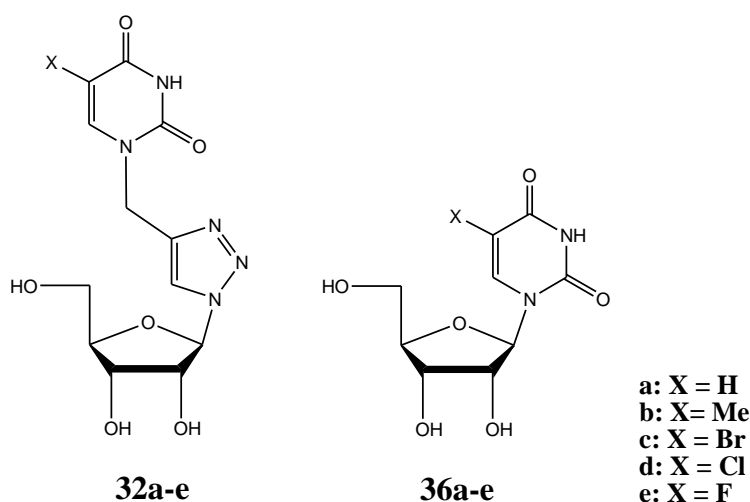
Οι τροποποιημένοι νουκλεοζίτες έχουν προσελκύσει τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για τη δημιουργία νέων θεραπευτικών παραγόντων με αντική και αντικαρκινική δράση. (Galmarini *et al.*, 2002; Meadows *et al.*, 2006; Mathé *et al.*, 2006) Η συνεχής ανάγκη για την ανακάλυψη νέων παραγόντων με βελτιωμένες ιδιότητες και θεραπευτικό προφίλ έχει οδηγήσει στη δημιουργία νουκλεοζιτών που φέρουν τροποποιήσεις στη δομή τους τόσο στο τμήμα του σακχάρου όσο και στο τμήμα της βάσης. (Manta *et al.*, 2014; Komiotis *et al.*, 2008; Tsoukala *et al.*, 2012)

Μεταξύ των τροποποιημένων νουκλεοζιτών που έχουν συντεθεί και αξιολογηθεί, ενώσεις που φέρουν το φαρμακοφόρο τριαζολικό-δακτύλιο έχουν γίνει στόχοι της έρευνας και ανάπτυξης φαρμάκων. (Moorhouse *et al.*, 2008; Hou *et al.*, 2012) Μεγάλος αριθμός από τις 1,2,3-τριάζολο ενώσεις που έχουν συντεθεί και αξιολογηθεί έχει επιδείξει αξιοσημείωτη αντική (Moorhouse *et al.*, 2008), αντιβακτηριακή (Hou *et al.*, 2012), αντιμυκητοκτόνο (Agalave *et al.*, 2011) και αντικαρκινική (Jordão *et al.*, 2009) δράση ενώ ο τριαζολικός δακτύλιος έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για τη χημική τροποποίηση γνωστών φαρμάκων. (Cho *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006)

Παρόλα αυτά, από τους τροποποιημένους νουκλεοζίτες που έχουν συντεθεί ως σήμερα, λίγη προσπάθεια έχει αφιερωθεί όσον αφορά τη σύνθεση των λεγόμενων «δικέφαλων» νουκλεοζιτών, οι οποίοι φέρουν ενωμένες στο τμήμα του σακχάρου τους δύο ετεροκυκλικές βάσεις. (Kašnar *et al.*, 1993; Kiritsis *et al.*, 2012; Trakossas *et al.*, 2011) Η τάξη αυτή των ενώσεων δύναται να αναγνωρίσει ταυτόχρονα δύο ετεροκυκλικές βάσεις, ενώ μπορεί να αλληλεπιδρά με τα νουκλεϊκά οξέα χρησιμοποιώντας τη μια ετεροκυκλική βάση για τη δημιουργία Watson-Crick ζευγαρώματος μεταξύ των βάσεων ενώ η άλλη βάση χρησιμοποιείται ως ενδιάμεσο για τη σταθεροποίηση της αναγνώρισης αυτής. (Zhang *et al.*, 2007) Φαίνεται ότι η κατάλληλη επιλογή συνδέσμου και απόσταση των δύο βάσεων είναι σημαντικός παράγοντας για την επιλεκτική πρόσδεση του νουκλεοζίτη πάνω στο μόριο-στόχος.

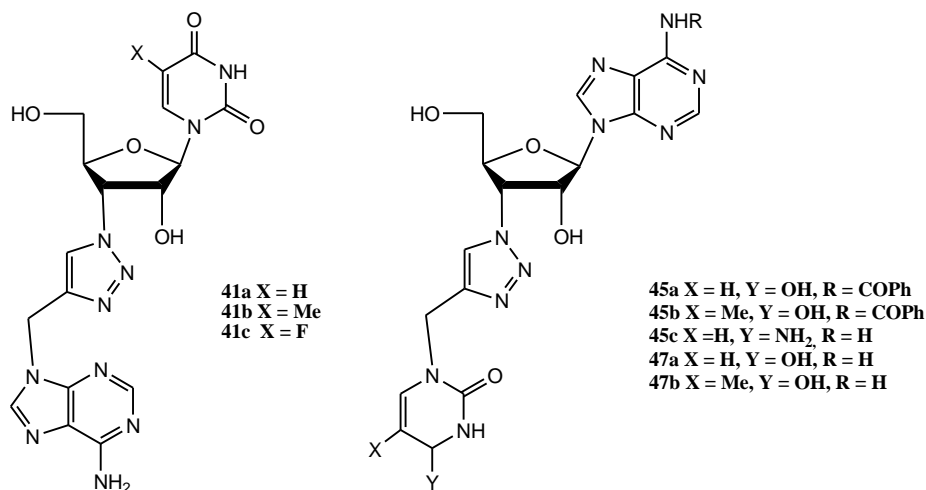
Ιβ.12 Στόχοι

Ο αρχικός στόχος ήταν η σύνθεση φουρανονουκλεοζιτών, οι οποίοι θα έφεραν μια πυριμιδίνη στη θέση 1' του σακχάρου ενωμένη με έναν τριαζολικό δακτύλιο (**32a-e**). Πραγματοποιήθηκε επίσης, η σύνθεση των φουρανουκλεοζιτών που έφεραν τις ίδιες βάσεις στην ίδια θέση (**36a-e**) ώστε να διευκρινιστούν τα δεδομένα πρόσδεσης στο ένζυμο. Τα μόρια που προέκυψαν είχαν τη γενική δομή που φαίνεται παρακάτω:



Στα μόρια αυτά πραγματοποιήθηκαν κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες.

Στη συνέχεια και έχοντας υπόψιν τα δινουκλεοτίδια που εμφάνισαν ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι της RNase A, και τα αποτελέσματα που προέκυψαν ύστερα από την εισαγωγή του τριαζολικού δακτυλίου, αποφασίστηκε η σύνθεση ενός νουκλεοζίτη με δύο βάσεις στη δομή του, δικέφαλος νουκλεοζίτης ώστε να προκύψουν αναστολείς οι οποίοι θα διέφεραν στο μήκος. Τα μόρια που προέκυψαν ήταν τα εξής:

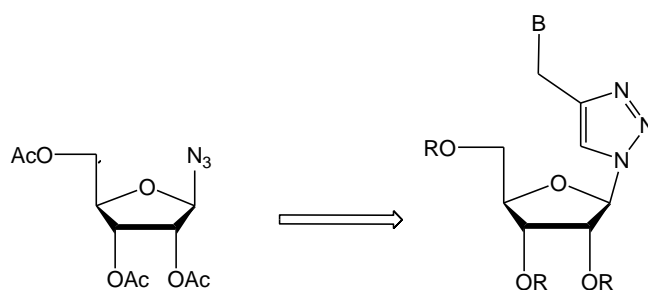


Τα νέα μόρια εξετάστηκαν και για την ανασταλτική τους δράση έναντι της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης, ένζυμο το οποίο όπως αναφέρθηκε ανήκει στην υπεροικογένεια της RNase A. Σε όλα τα νέα μόρια πραγματοποιήθηκαν κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες ώστε να διαπιστωθεί η αρχική υπόθεση, ενώ κρίθηκε σκόπιμο να αξιολογηθούν επίσης και για την αντικαρκινική και αντικική τους δράση.

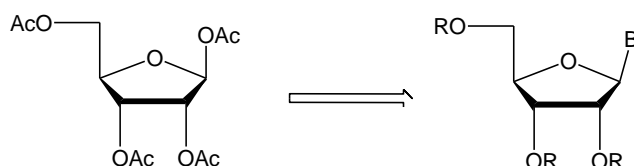
Πβ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πβ.1. Σύνθεση τριάζολο νουκλεοζιτών πυριμιδίνης καθώς και των αντίστοιχων ουριδινών

Έχοντας ως στόχο τη συσχέτιση της απόστασης του σακχάρου από τη βάση των εν δυνάμει νουκλεοζιτικών αναστολέων της RNase A πραγματοποιήθηκε η σύνθεση των τριάζολο νουκλεοζιτών **32a-e** καθώς και των νουκλεοζιτών που δεν έφεραν τον τριαζολικό δακτύλιο στη δομή τους **36a-e**. Από τη ρετροσυνθετική προσέγγιση, για την παρασκευή των νουκλεοζιτών **32a-e** και **36a-e** αντίστοιχα, προέκυψε ως πρόδρομη ένωση το κατάλληλο ακετυλιωμένο ριβοφουρανοζυλοσάκχαρο όπως συνοψίζεται στο ακόλουθο σχήμα:



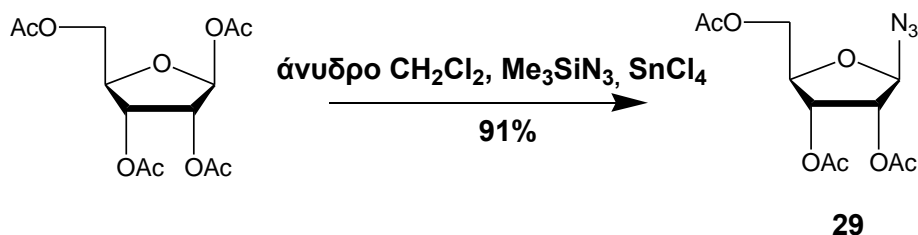
B = Βάση
R = Προστατευτική ομάδα ή υδρογόνο



Ως εκ τούτου, επιλέχθηκε η σύνθεση του κατάλληλου ακετυλιωμένου αζιδοσακχάρου, το οποίο εν συνεχεία συμπυκνώθηκε με την κατάλληλη προπάργυλο νουκλεοβάση ώστε να σχηματιστούν τα προστατευμένα και εν συνεχεία τα τελικά επιθυμητά ανάλογα. Ομοίως, η ακετυλιωμένη β-D-ριβόζη συμπυκνώθηκε με τις κατάλληλες νουκλεοβάσεις ως σχηματισμό των προστατευμένων αναλόγων και κατόπιν ύστερα από αποπροστασία των επιθυμητών τελικών νουκλεοζιτών.

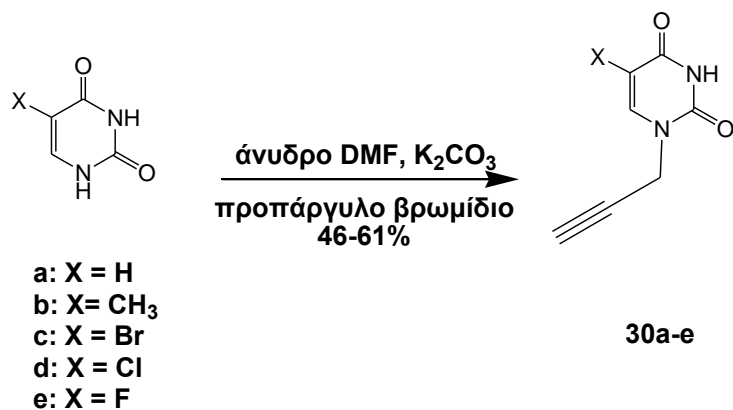
Αρχικά πραγματοποιήθηκε σύνθεση του αζιδο-σακχάρου **29** με τη μέθοδο των Stimac (Stimac *et al.*, 1992) σύμφωνα με την οποία, σε διάλυμα της εμπορικά διαθέσιμης 1,2,3,4-τετρακίς-*O*-ακετυλο-β-D-ριβοφουρανοζης σε άνυδρο CH₂Cl₂ και υπό ατμόσφαιρα αζώτου, προστίθεται τριμεθυλοσυλιλαζίδιο (Me₃SiN₃) και καταλύτης Tin(IV) chloride (SnCl₄) (Σχήμα 33), και το μίγμα της αντίδρασης

αφήνεται υπό ανάδευση έως το πέρας της (TLC, *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 7:3). Στη συνέχεια, αφού το μίγμα εξουδετερωθεί με όξινο ανθρακικό νάτριο (NaHCO₃) εκχυλίζεται και η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται υπεράνω Na₂SO₄ και ο διαλύτης απομακρύνεται με κενό. Το προϊόν **29** παραλαμβάνεται ύστερα από χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας (7:3) σε πολύ καλή απόδοση (91%).



Σχήμα 33. Σύνθεση 2,3,5-τρις-*O*-ακετυλο-β-D-ριβοφουρανοζυλαζιδίου.

Για τη λήψη των προστατευμένων νουκλεοζιτών **31a-e**, απαραίτητη κρίθηκε κι η διαθεσιμότητα των κατάλληλων προπάργυλο βάσεων **30a-e** (Lazrek *et al.*, 1949; Σχήμα 34) ώστε να επακολουθήσει η σύζευξή τους με το σάκχαρο **29**. (Σχήμα 34)



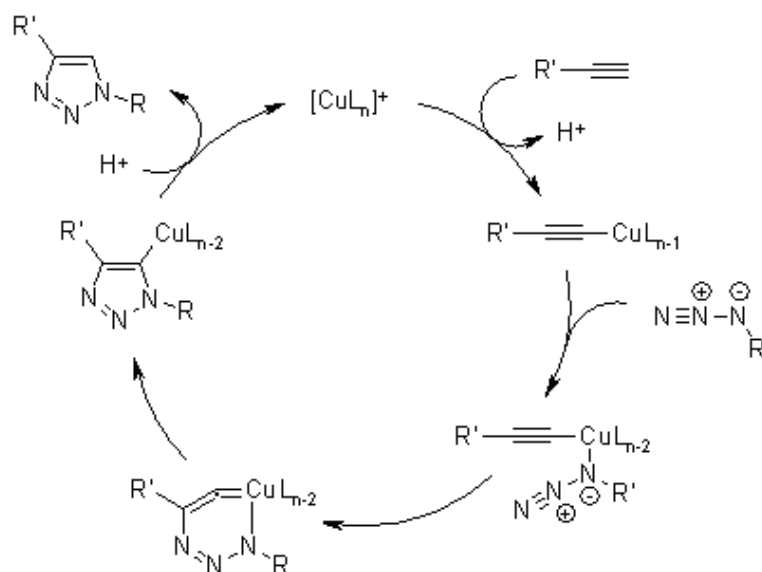
Σχήμα 34. Σύνθεση προπάργυλο ουρακίλης (**a**), θυμίνης (**b**), 5-βρωμοουρακίλης (**c**), 5-χλωροουρακίλης (**d**) και 5-φθοροουρακίλης (**e**).

Οι προπάργυλο βάσεις **30a-e** συντέθηκαν ύστερα από αντίδραση των εμπορικά διαθέσιμων βάσεων ουρακίλη (**a**), θυμίνη (**b**), 5-βρωμοουρακίλη (**c**), 5-χλωροουρακίλη (**d**) και 5-φθοροουρακίλη (**e**), αντίστοιχα με τη βοήθεια του προπάργυλο βρωμιδίου, παρουσία ανθρακικού καλίου (K₂CO₃) και διαλύτη άνυδρο *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) υπό ατμόσφαιρα αζώτου. (Lazrek *et al.*, 2001)

Αφού το μίγμα αναδεύεται έως το πέρας της αντίδρασης (TLC οξικός αιθυλεστέρας) και απομακρυνθεί ο διαλύτης υπό κενό, παραλαμβάνονται τα επιθυμητά προϊόντα ύστερα από χρωματογραφία στήλης, σε απόδοση 46-61%.

Στη συνέχεια, για να επιτευχθεί η σύνθεση των αναλόγων-στόχων **32a-e**, χρησιμοποιήθηκε “click” χημεία για τη σύζευξη των προπάργυλο βάσεων **30a-e** με το αζιδοσάκχαρο **29** οπότε προέκυψαν οι προστατευμένοι νουκλεοζίτες **31a-e**. Ο όρος “click” χημεία εισήχθη από τον Barry K. Sharpless και τους συνεργάτες του το 2001 και περιγράφει χημικές αντιδράσεις οι οποίες χαρακτηρίζονται από στερεοεξειδίκευση (stereospecificity), υψηλές αποδόσεις, ελλιπή ή ελάχιστη δημιουργία παραπροϊόντων, χωρίς επιπλέον να επηρεάζονται από το είδος των λειτουργικών ομάδων των μορίων με τα οποία συνδέονται. Από τις διάφορες αντιδράσεις της click χημείας, η αντίδραση κυκλοπροσθήκης αζιδίων-αλκινίων που καταλύεται από χαλκό (I) [Cu-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC)] κατέχει δεσπόζουσα θέση στη διεθνή βιβλιογραφία. Ο σχηματιζόμενος τριαζολικός δακτύλιος στα νέα ανάλογα που σχεδιάστηκαν θεωρείται ένα επιθυμητό δομικό χαρακτηριστικό, καθώς οι 1,2,3-τριαζολικές ενώσεις έχουν τη δυνατότητα να συμμετέχουν ενεργά σε δεσμούς υδρογόνου και σε αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου, ενώ τα παράγωγά τους παρουσιάζουν έντονο φαρμακολογικό ενδιαφέρον (Ferreira *et al.*, 2010, Li *et al.*, 2006).

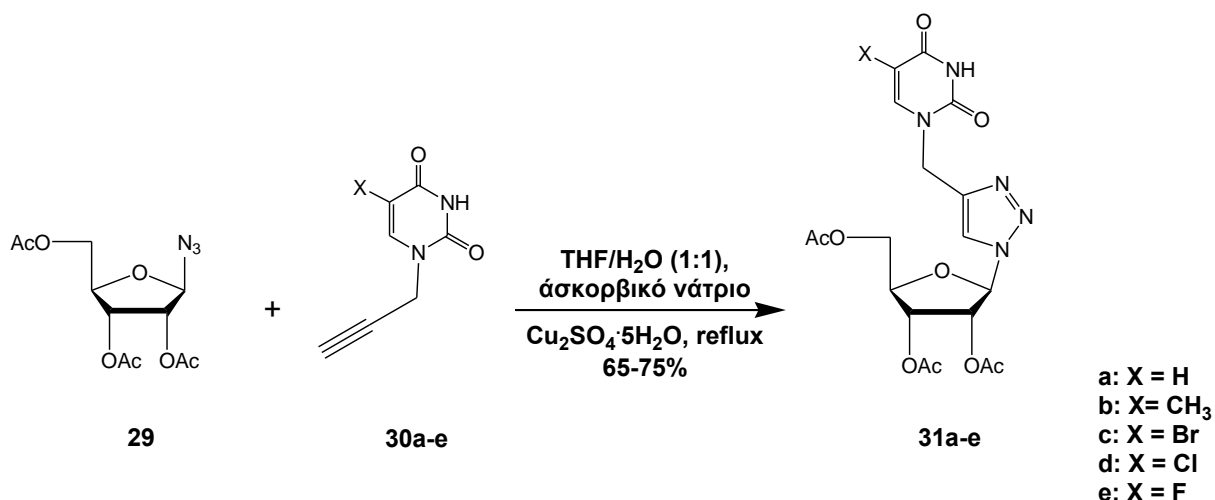
Η μετατροπή των οργανικών αζιδίων και ακραίων αλκινίων αποκλειστικά στα επιθυμητά 1,4-υποκατεστημένα 1,2,3-τριαζόλια μέσω αντιδράσεων CuAAC, απαιτεί την καταλυτική συμμετοχή του χαλκού ενώ ο προτεινόμενος αρχικά καταλυτικός κύκλος για την αντίδραση με βάση θεωρητικούς υπολογισμούς, περιγράφεται στο σχήμα 35 που ακολουθεί. (Himo *et al.*, 2005)



Σχήμα 35. Μηχανισμός αντίδρασης click για τη δημιουργία 1,2,3-τριαζολικού δακτυλίου.

Αρχικά, πραγματοποιείται συναρμογή του Cu(I) με το αλκίνιο, η οποία είναι ελαφρώς ενδόθερμη σε CH₃CN αλλά εξώθερμη στο νερό, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με πειραματικές παρατηρήσεις ότι η αντίδραση προχωράει γρηγορότερα σε υδατικά συστήματα. Στη συνέχεια, το αζίδιο διώχνει άλλον έναν υποκαταστάτη (ligand) και ενώνεται με το χαλκό. Ακολουθεί ο σχηματισμός του πρώτου C–N δεσμού μέσω ενός ασυνήθιστου εξαμελούς κυκλικού ενδιάμεσου με τη συμμετοχή του χαλκού. Κατόπιν, ευνοείται ενεργειακά ο σχηματισμός του τριαζολικού παραγώγου του χαλκού και εν συνεχεία λαμβάνεται το τελικό προϊόν μέσω μιας αποπρωτονίωσης, κλείνοντας παράλληλα τον καταλυτικό κύκλο.

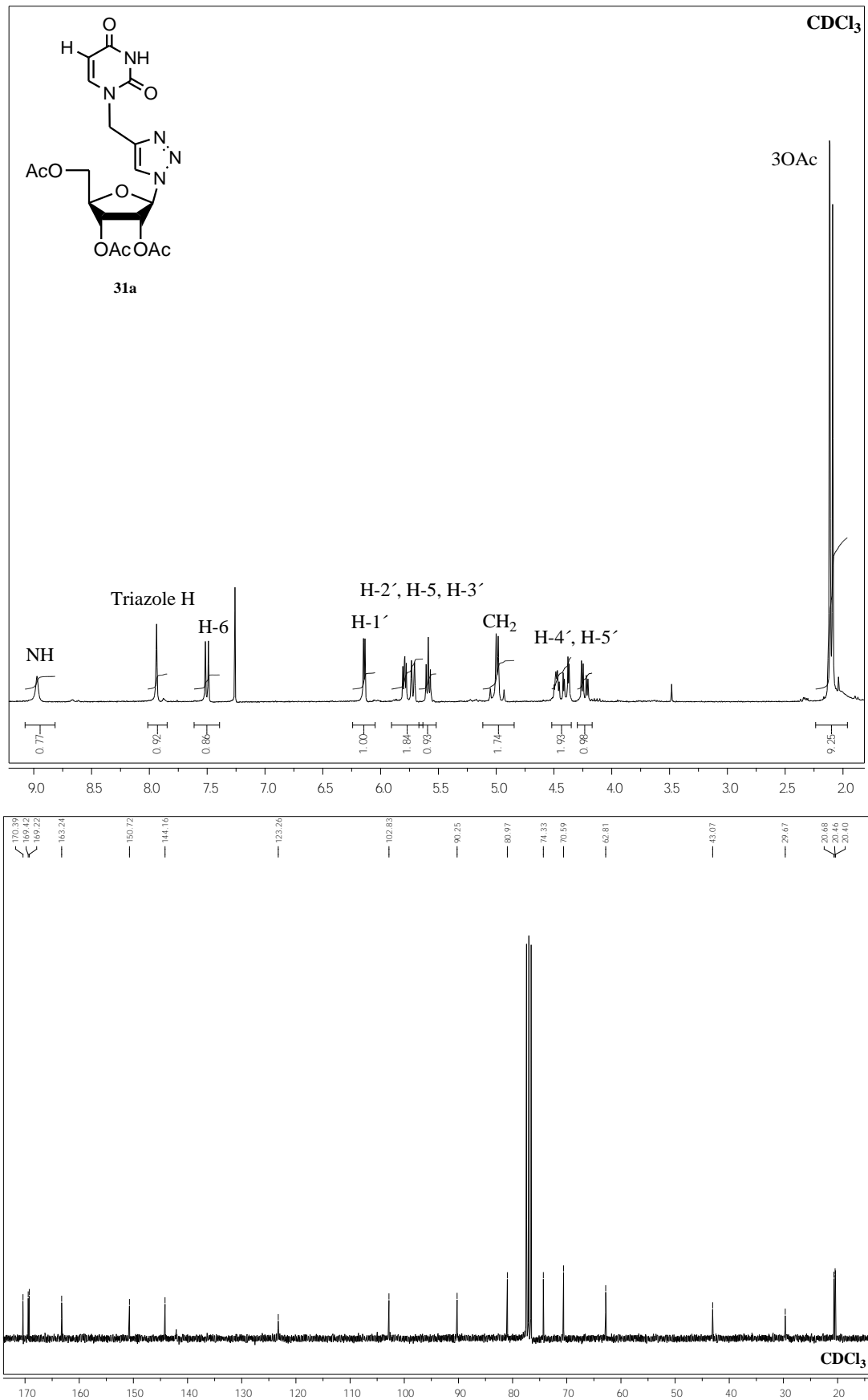
Αναλυτικότερα, αντίδραση CuAAC μεταξύ του αζιδιοσακχάρου **29** και των προπάργυλο βάσεων **30a-e**, παρουσία καταλυτικών ποσοτήτων CuSO₄·5H₂O και ασκορβικού νατρίου σε διαλύτη THF/H₂O (1:1), οδήγησε στο σχηματισμό των προστατευμένων τριαζολο νουκλεοζιτικών αναλόγων **31a-e**, αντίστοιχα. (Σχήμα 36) Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC οξικός αιθυλεστέρας), το διάλυμα αφήνεται να ψυχθεί και μετά την προσθήκη μεθανόλης ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Τα νέα ανάλογα **31a-e** ελήφθησαν σε απόδοση 65-75% ύστερα από χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη τον οξικό αιθυλεστέρα.



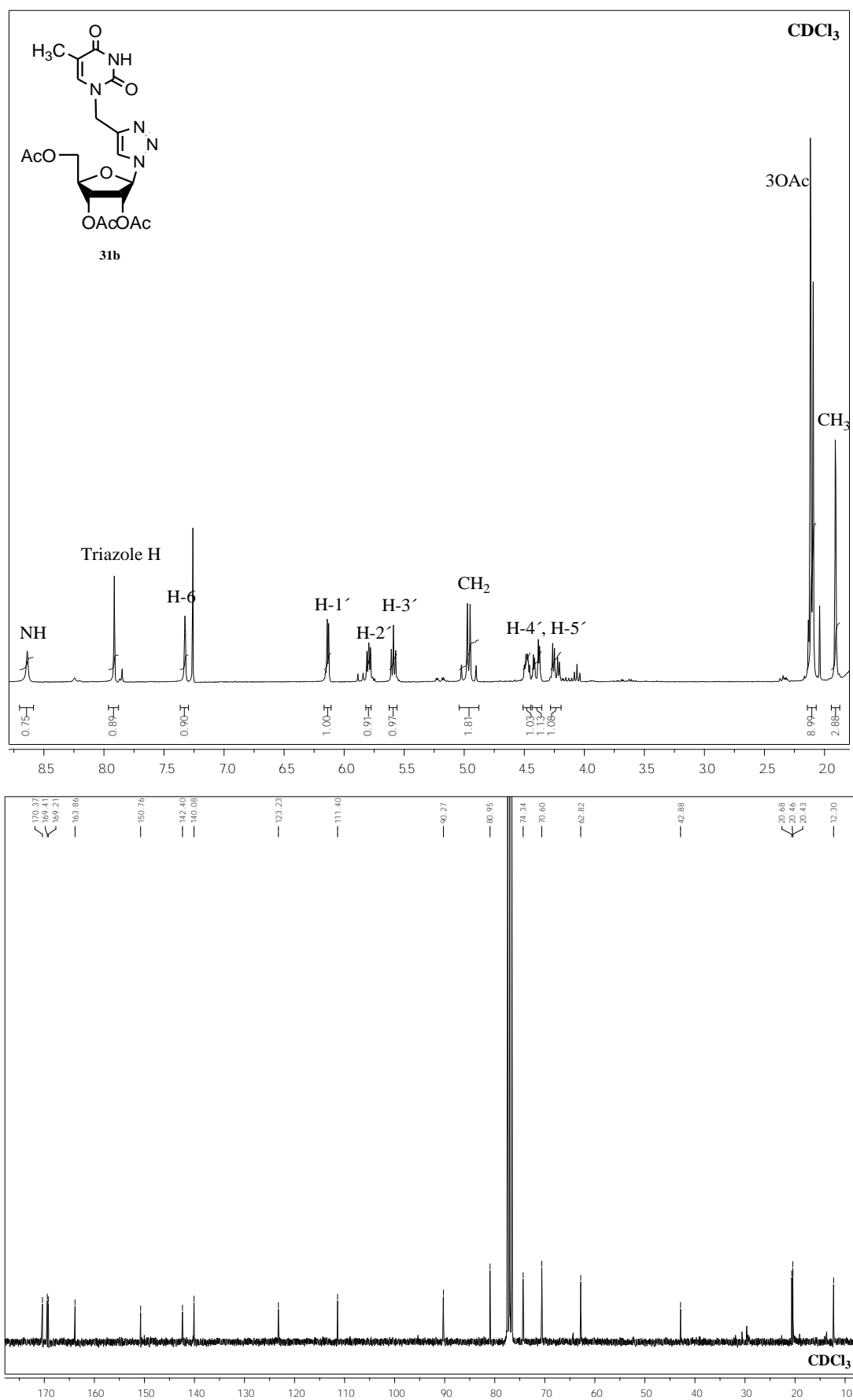
Σχήμα 36. Σύνθεση προστατευμένων τριαζολο νουκλεοζιτών ουρακίλης (**31a**), θυμίνης (**31b**), 5-βρωμοουρακίλης (**31c**), 5-χλωροουρακίλης (**31d**) και 5-φθοροουρακίλης (**31e**).

Για να επιβεβαιωθεί η δημιουργία του τριαζολικού δακτυλίου στα νέα ανάλογα και να καθοριστούν τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά των ενώσεων **31a-e** ελήφθησαν τα αντίστοιχα φάσματα πρωτονίου και άνθρακα. (Σχήματα 37-41) Κατά την ανάλυση των φασμάτων πρωτονίου (¹H NMR) των ενώσεων, ήταν εμφανής η χαρακτηριστική κορυφή του πρωτονίου του νέο-σχηματιζόμενου τριαζολικού δακτυλίου στην περιοχή μεταξύ 7.91-7.94 ppm. Οι κορυφές που αντιστοιχίστηκαν στην περιοχή του σακχάρου των ενώσεων **31a-e** απεικόνιζαν το πρωτόνιο H-1' να εμφανίζει μια διπλή κορυφή ($J_{1',2'} = 3.5\text{-}3.7$ Hz), το πρωτόνιο H-2' μια διπλή διπλών κορυφή ($J_{2',3'} = 4.9\text{-}5.2$ Hz), το πρωτόνιο H-3' μια τριπλή κορυφή, ενώ τα πρωτόνια H-4' και H-5' απεικονίζονται ως μια πολλαπλή και δύο διπλές-διπλών κορυφές, αντίστοιχα. Χαρακτηριστική ήταν και η τετραπλή κορυφή (AB σύστημα) για τις ενώσεις **31a-c,e** και τριπλή για την ένωση **31d** που αντιστοιχίζεται στην CH₂ ομάδα των ενώσεων και εντοπίζεται στην περιοχή μεταξύ 5.04-4.94 ppm. Στα αντίστοιχα φάσματα άνθρακα (¹³C NMR) οι άνθρακες του τριαζολικού δακτυλίου εμφανίστηκαν στις περιοχές 141.6-144.2 και 123.2-123.5, αντίστοιχα ενώ ήταν εμφανή και τόσο τα σήματα του σακχάρου όσο και των ακετυλομάδων των ενώσεων. (Σχήματα 37-41)

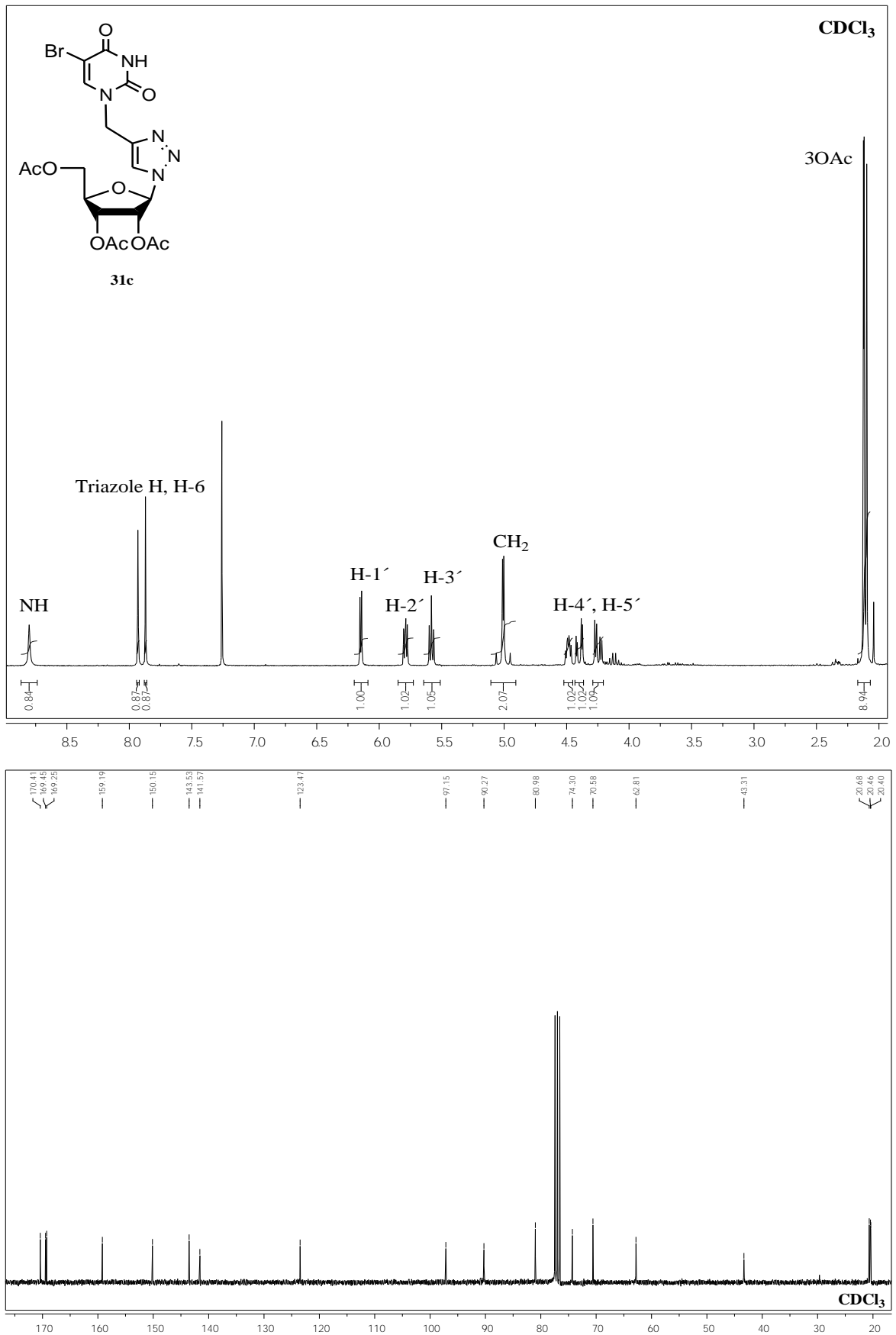
Σχήμα 37. Φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR ένωσης **31a**.



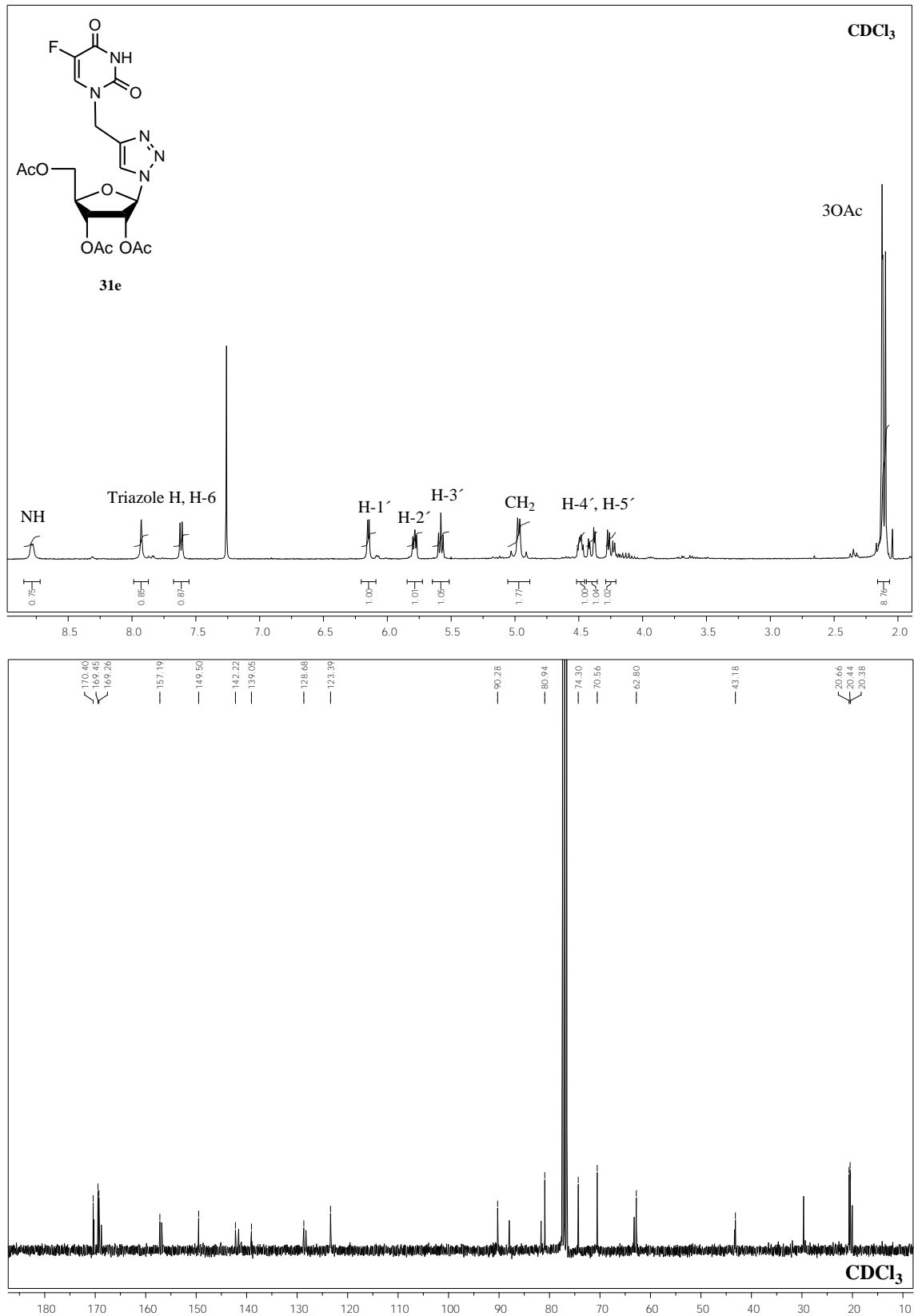
Σχήμα 38. Φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR ένωσης **31b**.



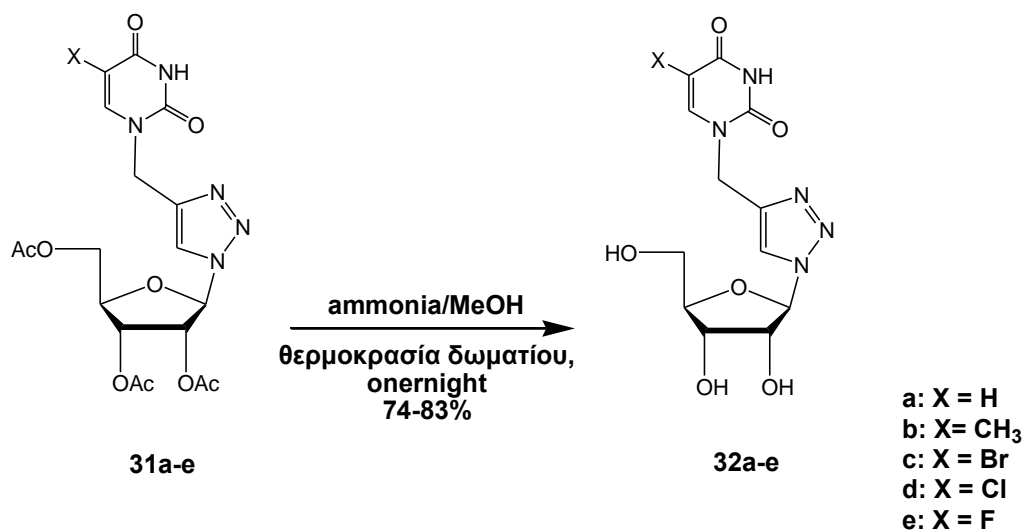
Σχήμα 39. Φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR ένωσης **31c**.



Σχήμα 41. Φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR ένωσης **31e**.



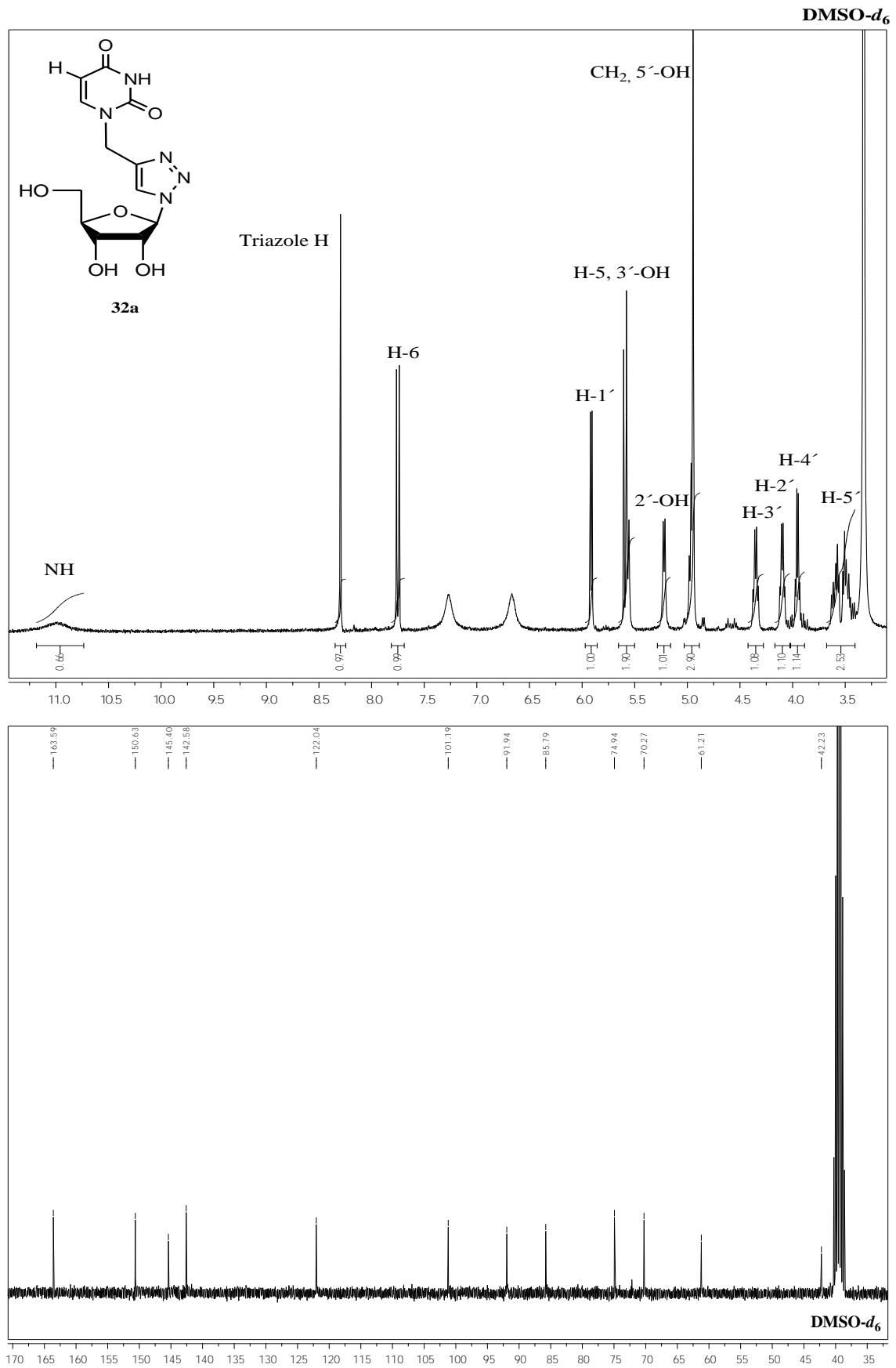
Για την αποπροστασία των νουκλεοζιτικών αναλόγων που έφεραν τριαζολικό δακτύλιο **31a-e** χρησιμοποιήθηκε κορεσμένο διάλυμα μεθανολικής αμμωνίας οπότε και ελήφθησαν τα τελικά ανάλογα **32a-e**, σε καλή απόδοση (74-83%). (Σχήμα 42)



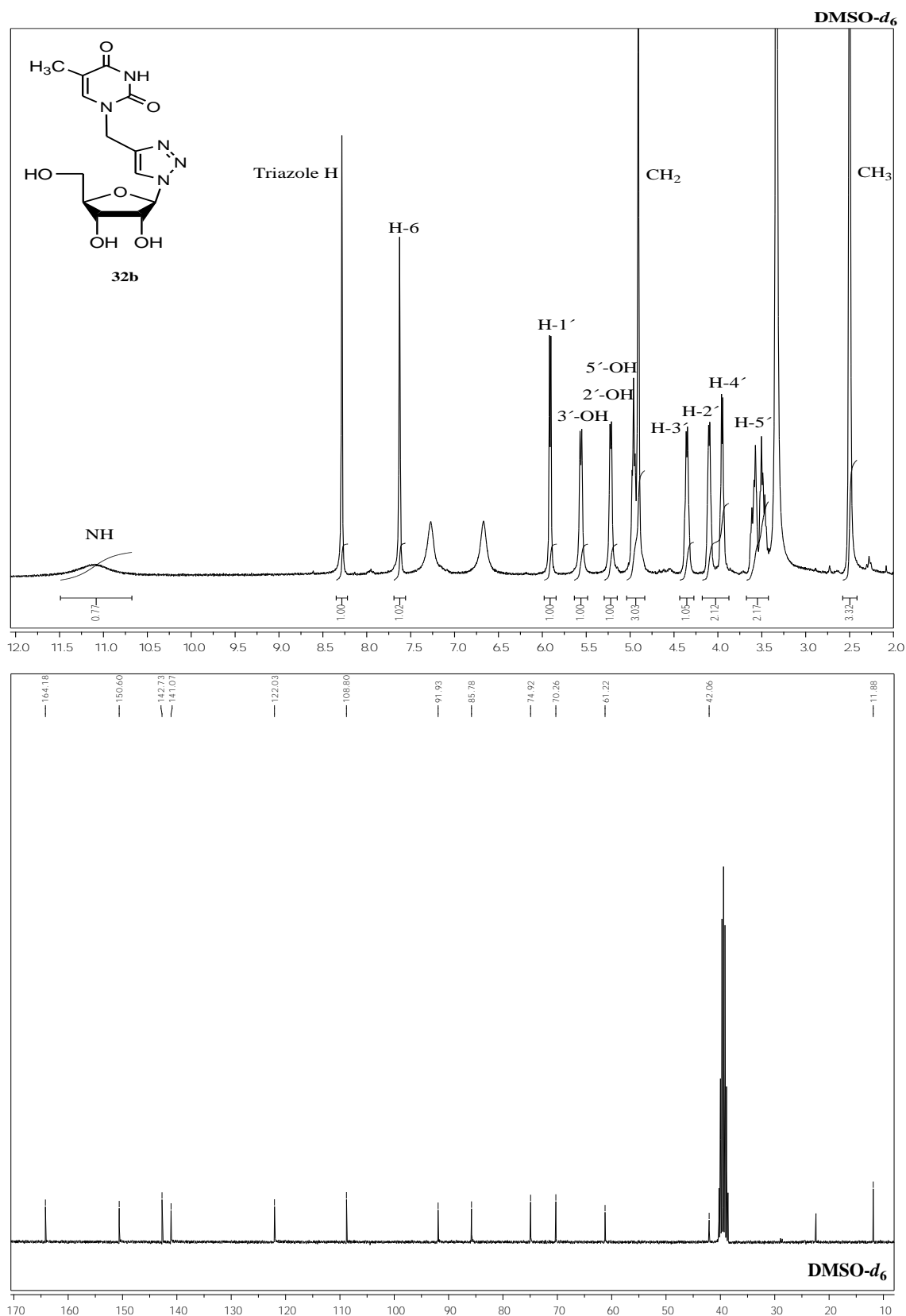
Σχήμα 42. Αποπροστασία των ενώσεων **31a-e** με κορεσμένο διάλυμα μεθανολικής αμμωνίας.

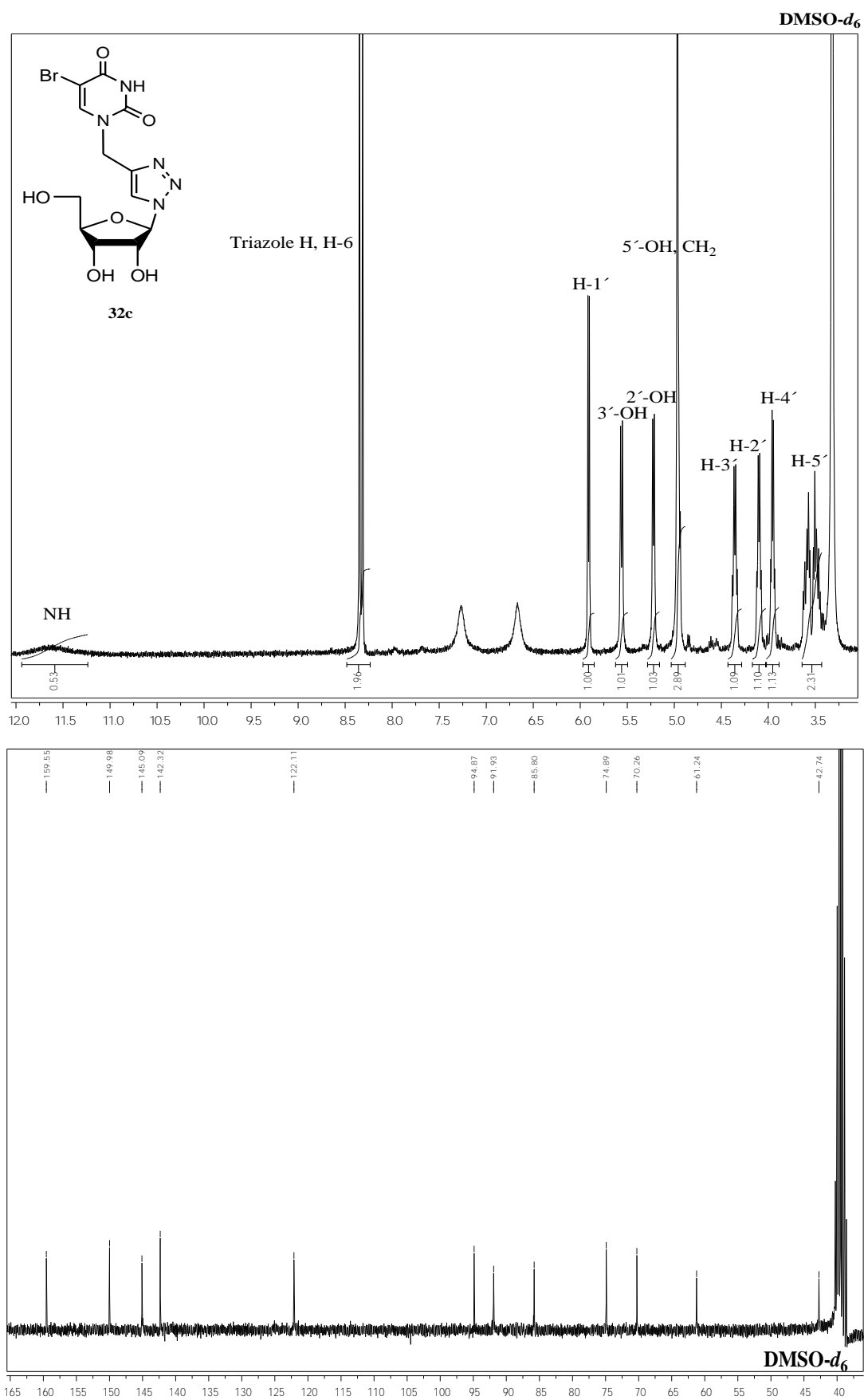
Κατά τη φασματοσκοπική ανάλυση των φασμάτων ¹H NMR των ενώσεων **32a-e** σε διαλύτη DMSO-*d*₆ ήταν εμφανής η χαρακτηριστική κορυφή του πρωτονίου του τριαζολικού δακτυλίου στη στενή περιοχή μεταξύ των 8.27 έως 8.35 ppm, καθώς και τα πρωτόνια που αντιστοιχούν στο τμήμα του σακχάρου των ενώσεων. (Σχήματα 43-47) Τα φάσματα ¹³C NMR των αναλόγων **32a-e** ακολουθούν το ίδιο μοτίβο με τα αντίστοιχα των προστατευμένων αναλόγων **31a-e** τόσο για την περιοχή του σακχάρου όσο και για το τμήμα της βάσης. (Σχήματα 43-47) Οι άνθρακες του τριαζολικού δακτυλίου και της CH₂ ομάδας εμφανίζονται στα 145.1-122.0 και 45.8-42.1 ppm, αντίστοιχα.

Σχήμα 43. Φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR ένωσης **32a**.

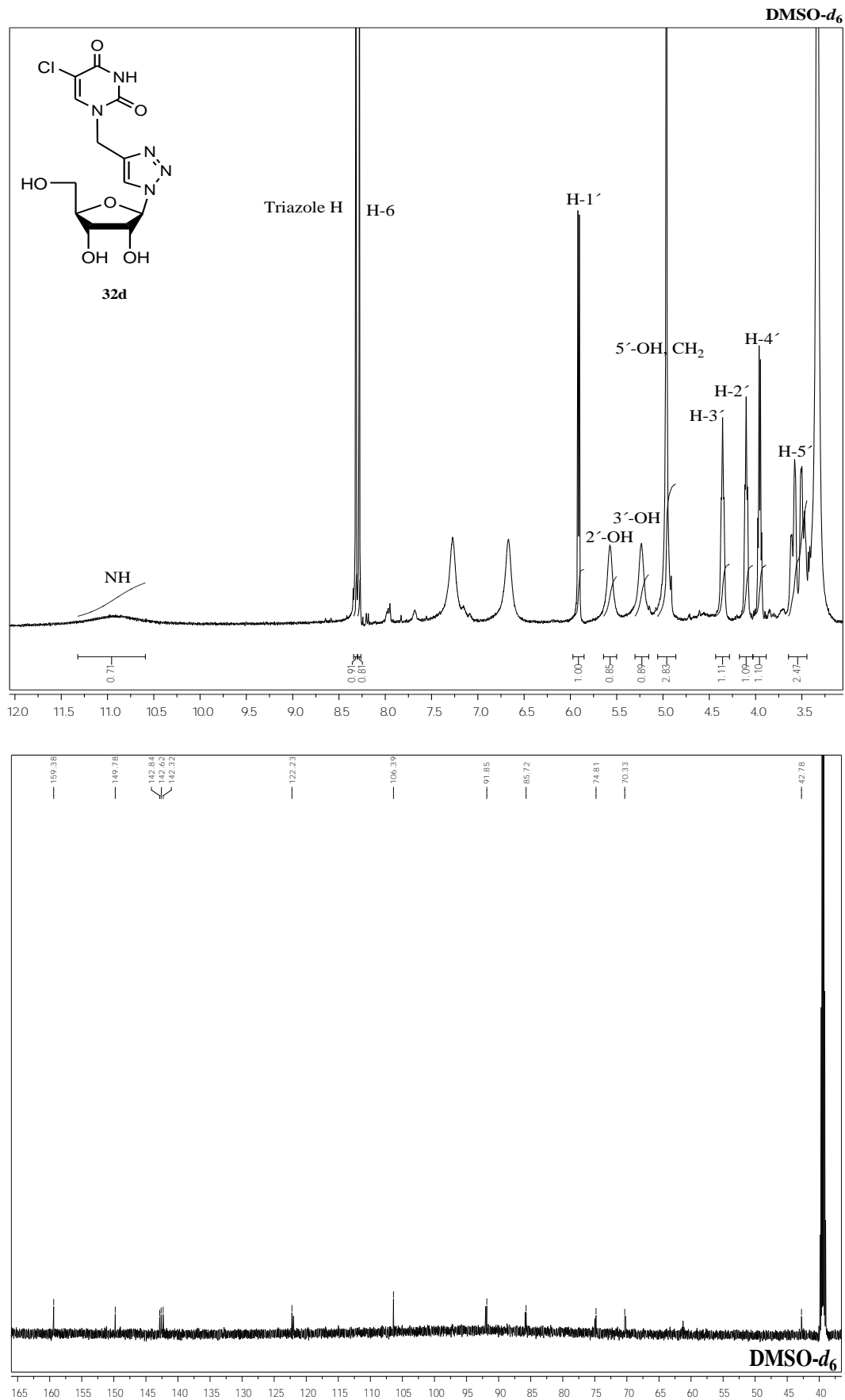


Σχήμα 44. Φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR ένωσης **32b**.

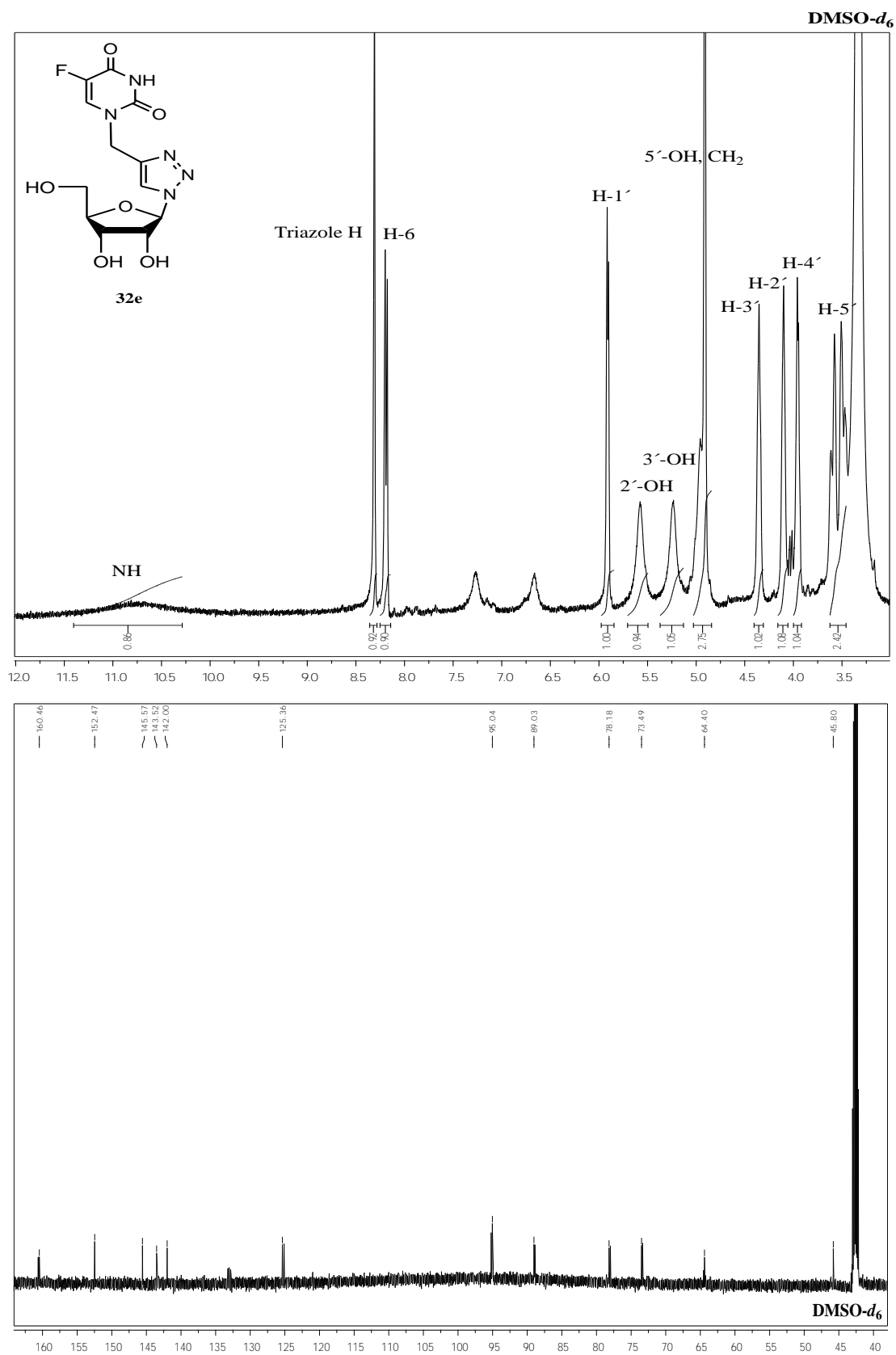


Σχήμα 45. Φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR ένωσης **32c**.

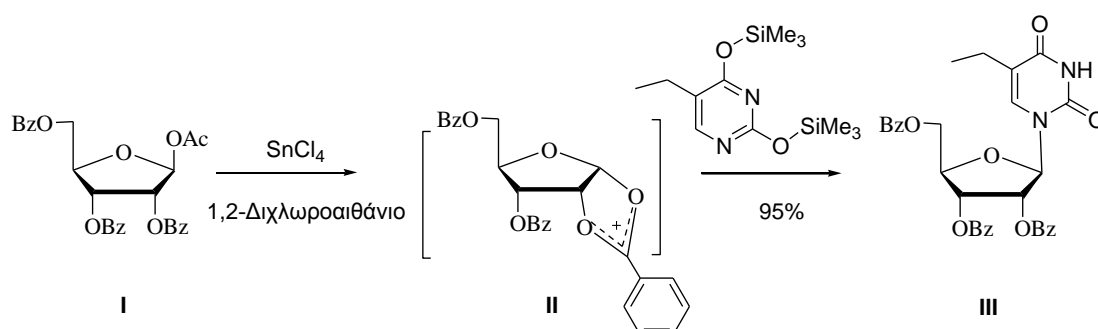
Σχήμα 46. Φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR ένωσης **32d**.



Σχήμα 47. Φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR ένωσης **32e**.

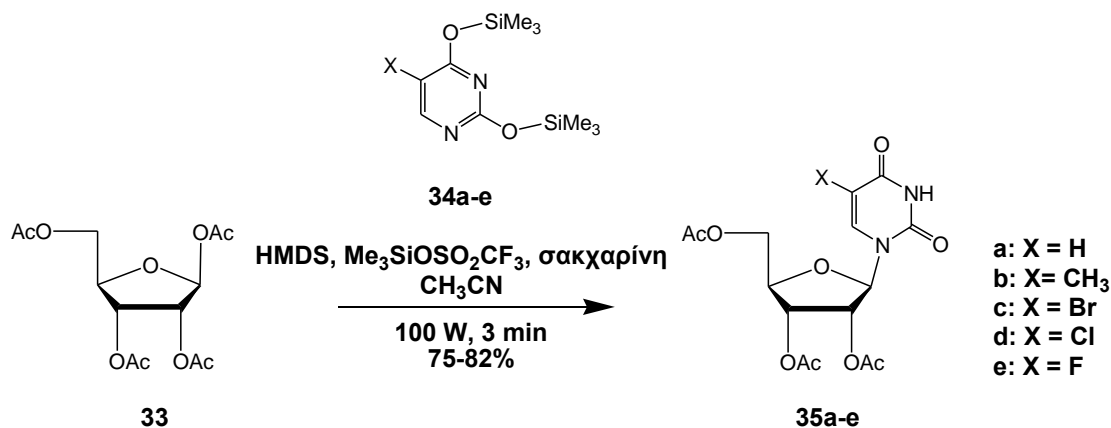


Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση των προστατευμένων ουριδινών **35a-e** μέσω της πλέον καθιερωμένης μεθοδολογίας που εφαρμόζεται στη νουκλεοζιτική σύνθεση, τη μέθοδο Vorbrüggen, η οποία βασίζεται στη σύζευξη μιας πυρηνόφιλης πυριμιδινικής, πουρινικής ή άλλης ετεροκυκλικής βάσης με ένα ηλεκτρονιόφιλο σάκχαρο μέσω του σχηματισμού ενός *N*-γλυκοζιτικού δεσμού. (Vorbrüggen *et al.*, 2000) Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται κατά κανόνα με προβλεπόμενη στεreoχημεία και σε ήπιες συνθήκες, ενώ η επιλογή των ακετυλιωμένων σακχάρων προσφέρει εύκολα προβάσιμα υποστρώματα, με αυξημένη σταθερότητα. Ένα από τα πρώτα παραδείγματα αντίδρασης Vorbrüggen φαίνεται στο παρακάτω σχηματισμό του νουκλεοζίτη της 5-αιθυλο-ουρακίλης (**III**, Σχήμα 48) (Niedballa *et al.*, 1970). Η διαμεσολάβηση του καρβοκατιόντος **II** που σχηματίζεται ‘in situ’ κατά την ενεργοποίηση του σακχάρου **I** από τον καταλύτη SnCl₄, υποχρεώνει την πυρηνόφιλη βάση να προσβάλλει το κατιόν από την αντίθετη πλευρά του δακτυλίου.



Σχήμα 48. Μηχανισμός σύνθεσης νουκλεοζιτών με τη μέθοδο Vorbrüggen.

Η σύζευξη της ακετυλιωμένης β-D-ριβόζης (**33**) με τις σιλιλιωμένες βάσεις ουρακίλη, θυμίνη, 5-βρωμοουρακίλη, 5-χλωροουρακίλη και 5-φθοροουρακίλη (**34a-e**) έλαβε χώρα με τη βοήθεια μικροκυμάτων, τάσης 100 W για 3 λεπτά. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με την προβλεπόμενη στεreoχημεία (β-στεreoχημεία) (Σχήμα 49) Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC, *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 7:3), το προκύπτον εναιώρημα, αφού εξουδετερώθηκε με διττανθρακικό νάτριο, εκχυλίστηκε με διχλωρομεθάνιο, η οργανική φάση συλλέχθηκε και ξηράθηκε υπεράνω Na₂SO₄. Κατόπιν ο διαλύτης απομακρύνθηκε με κενό και οι ενώσεις **35a-e** ελήφθησαν ύστερα από χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διαλυτών *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας σε αναλογία 7:3 σε πολύ καλές αποδόσεις (75-82%).



Σχήμα 49. Σύνθεση των ουριδινών **35a-f** με την τροποποιημένη μέθοδο σύνθεσης νουκλεοζιτών Vorbrüggen σε φούρνο μικροκυμάτων.

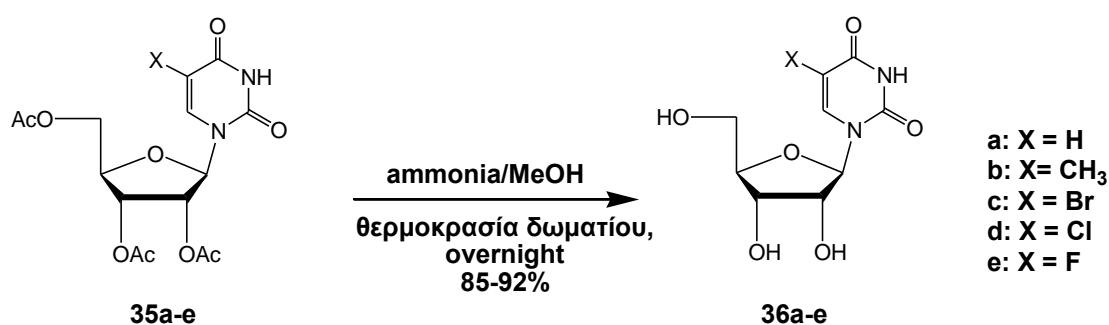
Είναι γεγονός ότι η χρήση μικροκυμάτων έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως τα τελευταία χρόνια αντί των κλασικών μεθόδων για τη σύνθεση ενώσεων και τη διεξαγωγή χημικών αντιδράσεων εξαιτίας της εξαιρετικής μείωσης του χρόνου που απαιτείται για την πραγματοποίηση χρονοβόρων αντιδράσεων έχοντας παράλληλα ως αποτέλεσμα τη μείωση των απαιτήσεων σε ενέργεια και οργανικούς διαλύτες. (Pradhan *et al.*, 2012) Δεδομένου ότι η μικροκυματική ακτινοβολία βρίσκεται στην περιοχή μεταξύ της υπέρυθρης ακτινοβολίας και των ραδιοκυμάτων στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα, οι οικιακοί φούρνοι μικροκυμάτων λειτουργούν στη σταθερή συχνότητα των 2,45 GHz. (Galema *et al.*, 1998; Horikoshi *et al.*, 2008; Varma, 1999; Gedye *et al.*, 1988)

Στις συμβατικές μεθόδους θέρμανσης που χρησιμοποιούνται κατά τη σύνθεση οργανικών ενώσεων, μια εξωτερική πηγή εκπέμπει θερμότητα, η οποία πρέπει να διαπεράσει τα τοιχώματα της φιάλης μέσα στην οποία πραγματοποιείται η αντίδραση ώστε να προσεγγίσει το διαλύτη και τα αντιδρώντα, με αποτέλεσμα τα αντιδρώντα να ενεργοποιούνται αργά και ο χρόνος που απαιτείται για το πέρας της αντίδρασης να αυξάνεται. Σε αντίθεση με τις συμβατικές μεθόδους θέρμανσης, κατά τη χρήση φούρνου μικροκυμάτων, τα μικροκύματα προσεγγίζουν απευθείας τα μόρια σε όλο το μίγμα της αντίδρασης με αποτέλεσμα ραγδαία αύξηση της θερμοκρασίας. Εφόσον θερμαίνεται μόνο το περιεχόμενο της φιάλης κι όχι η ίδια η φιάλη μες στην οποία τοποθετείται η αντίδραση μπορεί να επιτευχθεί καλύτερη ομοιογένεια και επιλεκτική θέρμανση του διαλύτη. Οι διαλύτες που είναι κατάλληλοι για τους οικιακούς φούρνους μικροκυμάτων είναι οι πολικοί διαλύτες με μεγάλες διηλεκτρικές σταθερές

όπως το νερό, η αιθανόλη, το ακετονιτρίλιο, το *N,N*-διμέθυλοφορμαμίδιο (DMF), το οξικό οξύ, το χλωροφόρμιο, η ακετόνη κ.λ.π. (Surati *et al.*, 2012)

Γενικά μπορεί να αναφερθεί ότι καμιά χημική αντίδραση δεν πραγματοποιείται αποκλειστικά με τη χρήση μικροκυμάτων ενώ η πλειονότητα των αντιδράσεων έχει διερευνηθεί με τον έναν ή τον άλλο τρόπο. (Nüchter *et al.*, 2004) Για τον καλύτερο έλεγχο των αντιδράσεων με τη χρήση της μικροκυματικής ακτινοβολίας έχουν κατασκευαστεί πλέον εξελιγμένα και σύγχρονα εργαλεία που χρησιμοποιούνται αποκλειστικά για τη σύνθεση οργανικών ενώσεων.

Εν συνεχεία, επίδραση διαλύματος μεθανολικής αμμωνίας, κορεσμένης στους 0 °C, στα προστατευμένα ανάλογα **35a-e**, για μια νύχτα οδήγησαν στις επιθυμητές τελικές ενώσεις **36a-e**. (Σχήμα 50) Τα φασματοσκοπικά δεδομένα των ενώσεων αυτών υπήρξαν σε απόλυτη συμφωνία με την υπάρχουσα βιβλιογραφία. (Beranek *et al.*, 1976; Currid *et al.*, 1997; Bavaro *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2009; Yamamoto *et al.*, 1989).



Σχήμα 50. Αποπροστασία ουριδινών **35a-f** με κορεσμένο διάλυμα μεθανολικής αμμωνίας.

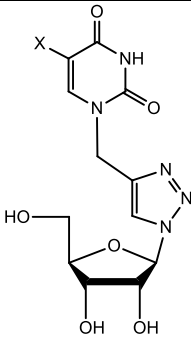
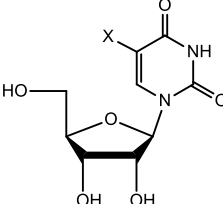
Πβ.2. Κινητική μελέτη τριαζολο νουκλεοζιτών πυριμιδίνης και των ουριδινών τους

Για την περαιτέρω βιολογική αποτίμηση των νέων αναστολέων πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες με την εμπορικά διαθέσιμη παγκρεατική ριβονουκλεάση A βοοειδών.

Οι κινητικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν ότι η ένωση ο τριαζολο νουκλεοζίτης της ουρακίλης (**32a**) ήταν ο καλύτερος αναστολέας της RNase A ($K_i = 1.6 \mu\text{M}$). Ο αντίστοιχος νουκλεοζίτης της ουρακίλης (**36a**) από τον οποίο απουσίαζε ο τριαζολικός δακτύλιος εμφάνισε σταθερά αναστολής ίση με $28.5 \mu\text{M}$, γεγονός που δείχνει ότι η απόσταση μεταξύ του σακχάρου και της βάσης είναι καθοριστικής σημασίας για την αναστολή (Πίνακας 11).

Η αντικατάσταση του υδρογόνου στην 5'-θέση της ουρακίλης από αλογόνα (Br, Cl, F) οδήγησε σε ενώσεις με χαμηλότερες σταθερές αναστολής σε άμεση συσχέτιση με το μοριακό βάρος του αλογόνου. Όταν οι σταθερές αυτές συγκρίθηκαν με εκείνες των νουκλεοζιτών δίχως τον τριαζολικό δακτύλιο (**36c-e**) διαπιστώθηκε ξανά η σημασία του προσδέτη όσων αφορά την ικανότητα αναστολής. Το ίδιο συμπέρασμα εξαγάγαμε τέλος, και για την ικανότητα αναστολής των νουκλεοζιτών της θυμίνης με (**32b**) και χωρίς (**36b**) το δακτύλιο.

Πίνακας 11. Οι σταθερές αναστολής των τριαζολο-νουκλεοζιτών **32a-e** και των αντίστοιχων ουριδινών **36a-e**.

Υποκαταστάτης (-X)				
	Ένωση	K_i (μM)	Ένωση	K_i (μM)
H	32a	1.6 ± 0.2	36a	28.5 ± 4.5
CH ₃	32b	25.8 ± 2.4	36b	44.1 ± 6.4

Br	32c	20% αναστολή στα 50 μ M	36c	69.1 \pm 2.1
Cl	32d	94.8 \pm 8.7	36d	44.5 \pm 4.6
F	32e	30.8 \pm 4.4	36e	33.6 \pm 2.6

Πβ.3. Σύνθεση Δικέφαλων Νουκλεοζιτών της αδενίνης

Έχοντας υπόψη τα αποτελέσματα των νουκλεοζιτών που έφεραν τριαζολικό δακτύλιο καθώς και τα αποτελέσματα της μελέτης δινουκλεοτιδίων πουρίνης-πυριμιδίνης αποφασίστηκε η μετέπειτα σύνθεση δικέφαλων νουκλεοζιτών, οι οποίοι θα έφεραν στη δομή τους ταυτόχρονα μια βάση πουρίνης και πυριμιδίνης. Από τη ρετροσυνθετική προσέγγιση προέκυψαν ως πρόδρομες ενώσεις οι κατάλληλοι αζιδο-ριβοφουρανόζυλο νουκλεοζίτες οι οποίοι στη συνέχεια συμπυκνώθηκαν με τις αντίστοιχες προπάργυλο νουκλεοβάσεις ως σχηματισμό των προστατευμένων νουκλεοζιτικών αναλόγων τους. Η μετέπειτα αποπροστασία τους οδήγησε τέλος στα ανάλογα-στόχος, όπως φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα:



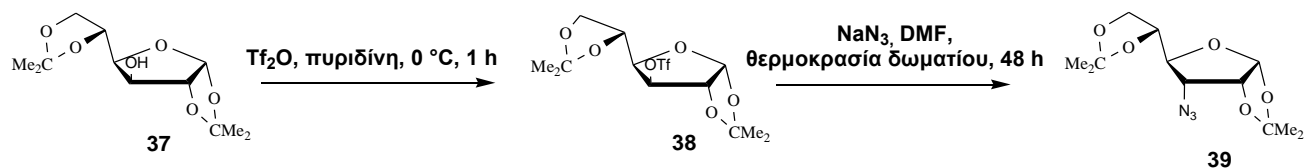
B = Βάση

R = Προστατευτική ομάδα ή υδρογόνο

Πρωταρχικό στόχο αποτέλεσε η σύνθεση του αζιδοσακχάρου **37** από την εμπορικά διαθέσιμη DAG (diacetone-D-glucose), ύστερα από μια συνθετική πορεία 5 σταδίων. (Gao *et al.*, 2012)

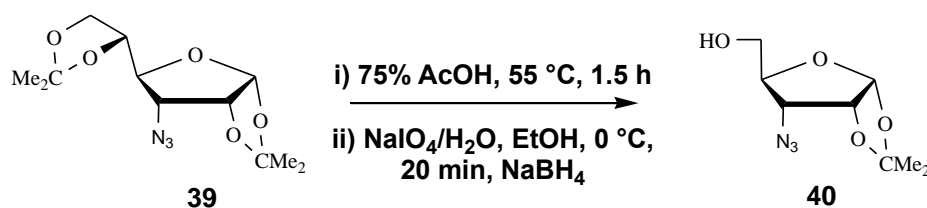
Σε διάλυμα της DAG σε διχλωροαιθάνιο προστίθεται, στους 0 °C, πυριδίνη και τριφθορομεθανικούσουλφονικός ανυδρίτης (Tf₂O) και ύστερα από μια ώρα παραλαμβάνεται το ενδιάμεσο **38**. (Σχήμα 51) Στη συνέχεια διάλυμα του ενδιάμεσου **38**, σε άνυδρο *N,N*-διμέθυλοφορμαμίδιο (DMF) και αζίδιο του νατρίου, αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 48 h. Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC, *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 4:1) το μίγμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα και νερό, η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με θειικό μαγνήσιο (MgSO₄), φιλτράρεται

και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό οπότε παραλαμβάνεται η ένωση **39** με ικανοποιητική απόδοση 47%.



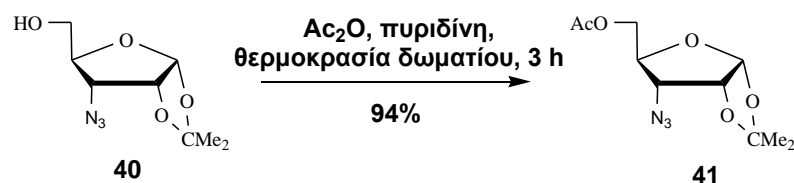
Σχήμα 51. Σύνθεση 3-αζιδο-3-δεοξυ-1,2:5,6-δισ-*O*-ισοπροπυλιδενο- α -D-ριβοφουρανόζης (**39**).

Στη συνέχεια για τη σύνθεση της ένωσης **40** χρησιμοποιήθηκε οξικό οξύ 75%, για τη διάνοιξη του ισοπροπυλιδενίου στις θέσεις 5,6, στους 55 °C για 1,5 ώρα. (Σχήμα 52) Μετά το πέρας της 1,5 ώρας, το υπόλειμμα που περιείχε το οξύ αραιώθηκε με τολουόλιο και στη συνέχεια με απόσταξη εξατμίστηκε μέχρις ξηρού. Κατόπιν, το υπόλειμμα επαναδιαλύεται σε αιθανόλη και σε αυτό προστίθεται στάγδην διάλυμα NaIO_4 σε 15 mL νερό, στους 0 °C κι αφού αναδευθεί για 20 λεπτά, προστίθεται βοροϋδρίδιο του νατρίου (NaBH_4) οπότε το διάλυμα αναδεύεται για άλλη μια ώρα στους 0 °C. Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC, *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστερας 1:1), το προϊόν **40** παραλαμβάνεται ύστερα από χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διαλυτών *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστερας (1:1) σε πολύ καλή απόδοση (84%).



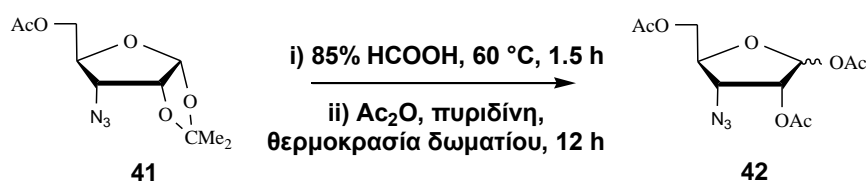
Σχήμα 52. Σύνθεση της 3-αζιδο-3-δεοξυ-1,2-*O*-ισοπροπυλιδενο- α -D-ριβοφουρανόζης (**40**).

Αφού ακετυλιωθεί η 5'-θέση στη θέση του σακχάρου **40** παρουσία πυριδίνης και οξικού ανυδρίτη και ληφθεί η ένωση **41** (Σχήμα 53) στόχος ήταν η διάνοιξη του ισοπροπυλιδενίου στις θέσεις 1,2 με μυρμηγκικό οξύ 85%. (Σχήμα 54)



Σχήμα 53. Σύνθεση 5-*O*-ακετυλο-3-αζιδο-3-δέοξυ-1,2-*O*-ισοπροπιλιδενο- α -D-ριβοφουρανόζης (**41**).

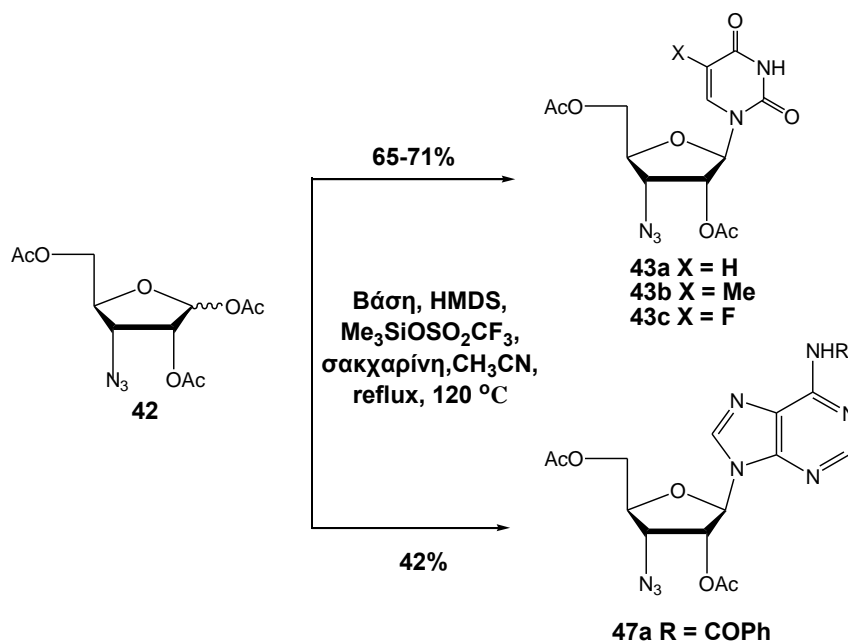
Δίχως να πραγματοποιηθεί χρωματογραφία το μίγμα ακετυλιώνεται στις θέσεις 1' και 2' με πυριδίνη και οξικό ανυδρίτη. (Σχήμα 54)



Σχήμα 54. Σύνθεση 1,2,5-τρις-*O*-ακετυλο-3-αζιδο-3-δέοξυ-D-ριβοφουρανόζης (**42**).

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα των ενώσεων **39-42** υπήρξαν σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία ενώ εμφανής υπήρξε και η αζιδομάδα στη δομή των εν λόγω ενώσεων, όπως φάνηκε από τα φάσματα IR στα 2108-2114 cm^{-1} . (Gao *et al.*, 2012)

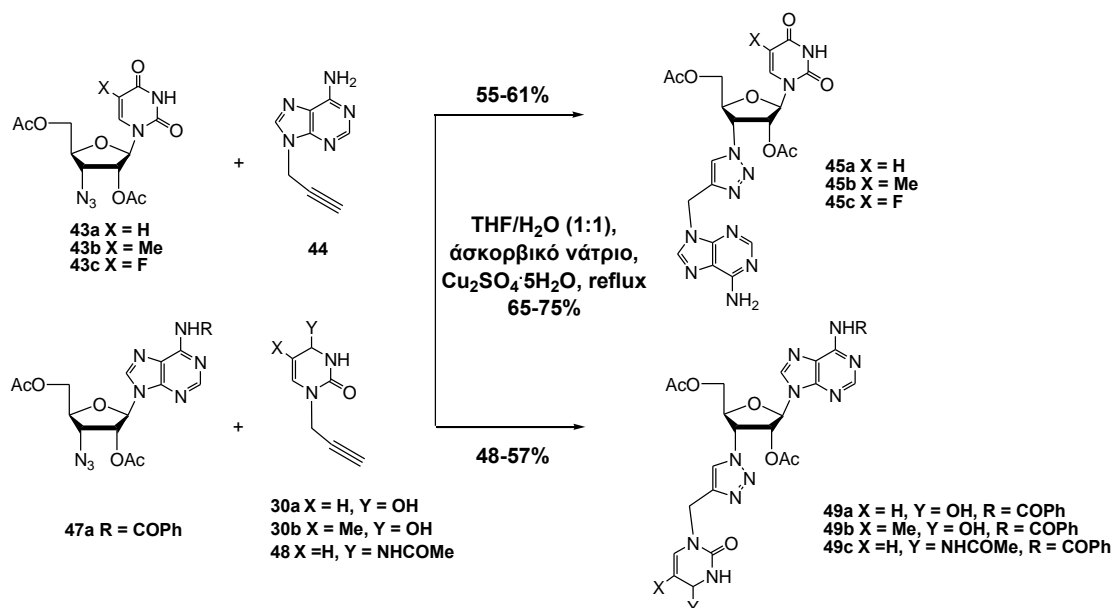
Εφόσον διαπιστώθηκε η διαθεσιμότητα του αζιδοσακχάρου **42** πραγματοποιήθηκε η σύνθεση των νουκλεοζιτών **43a-c** και **47a** με την κλασική μέθοδο Vorbrüggen, που περιγράφηκε προηγουμένα, για τη σύνθεση νουκλεοζιτών. (Σχήμα 56) Οι προστατευμένοι νουκλεοζίτες **43a-c** και **47a** λήφθησαν ύστερα από αντίδραση της εμπορικά διαθέσιμης βάσης (ουρακίλη, θυμίνη, φθοροουρακίλη, βενζοϋλοαδενίνη) με το αζιδοσάκχαρο **42** σε διαλύτη ακετονιτρίλιο (CH_3CN), παρουσία HMDS, σακχαρίνης και καταλύτη $\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$ (0.32 mmol, 0.046 eq) και το προκύπτον εναιώρημα αναδεύεται στους 120 °C με κάθετο ψυκτήρα για 30 min. Αφότου το μίγμα γίνει διαυγές, προστίθενται το αζιδοσάκχαρο **37** (5.36 mmol) και καταλύτης $\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$ με κάθετο ψυκτήρα υπό ατμόσφαιρα αζώτου. (Σχήμα 55) Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC, *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 5:5) το μίγμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου, εξουδετερώνεται με κορεσμένο διάλυμα NaHCO_3 και εκχυλίζεται με CH_2Cl_2 . Η οργανική φάση αφού συλλεχθεί και ξηρανθεί καθαρίζεται στη συνέχεια με χρωματογραφία στήλης οπότε και παραλαμβάνονται οι νουκλεοζίτες **43a-c** και **47a** σε απόδοση 65-71% και 42%, αντίστοιχα.



Σχήμα 55. Σύνθεση νουκλεοζιτών **43a-c** και **47a** με την κλασική μέθοδο Vorbrüggen.

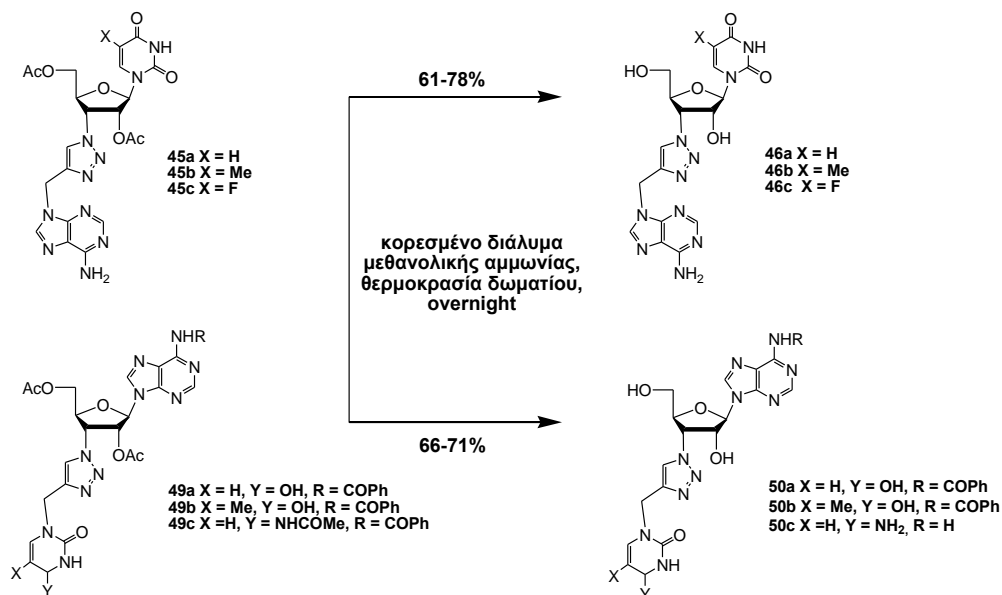
Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της προπάργυλο αδενίνης (**44**) από την εμπορικά διαθέσιμη αδενίνη με τη μεθοδολογία που περιγράφηκε για τις βάσεις **30a-e** (Lazrek *et al.*, 2001) καθώς και της προπάργυλο *N*⁴-ακέτυλοκυτοσίνης (**48**), αντίστοιχα. (Lindsell *et al.*, 2000)

Για τη σύνθεση των προστατευμένων δικέφαλων νουκλεοζιτών **45a-c** και **49a-c** πραγματοποιήθηκε σύζευξη με τη βοήθεια click χημείας των αντίστοιχων νουκλεοζιτών **43a-c** και **47a** με τις κατάλληλες βάσεις (**44**, **30a,b** και **48**) σε THF/H₂O (1:1) παρουσία ασκορβικού νατρίου και CuSO₄·5H₂O. (Σχήμα 56) Τα προστατευμένα ανάλογα **45a-c** και **49a-c** λήφθησαν ύστερα από χρωματογραφία στήλης (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 7:3), σε αποδόσεις 55-61% και 48-57%, αντίστοιχα.



Σχήμα 56. Σύνθεση δικέφαλων νουκλεοζιτών **45a-c** και **49a-c**.

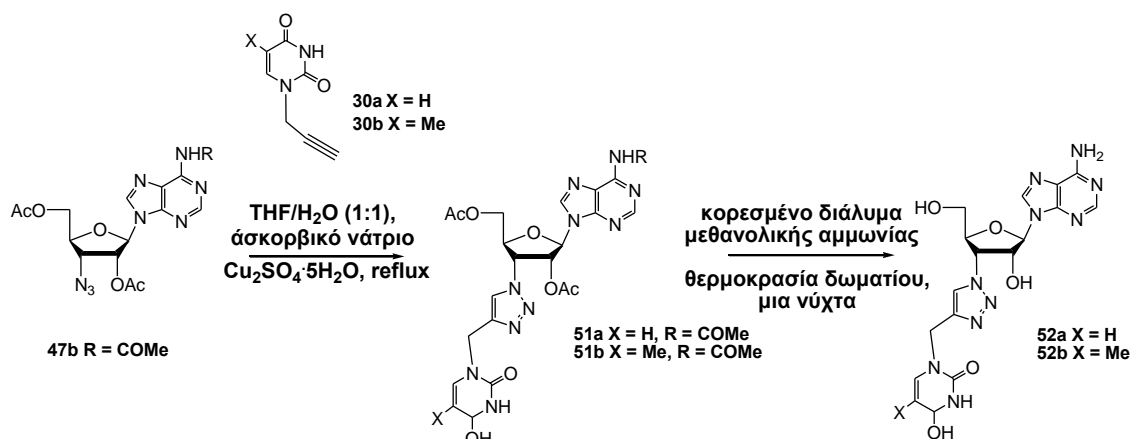
Μετάπειτα κατεργασία των αναλόγων **45a-c** με διάλυμα μεθανολικής αμμωνίας, κορεσμένης στους 0 °C, για μια νύχτα οδήγησε στα πλήρως αποπροστατευμένα επιθυμητά προϊόντα **46a-c** σε απόδοση 61-78%. Κατά την προσπάθεια αποπροστασίας των αναλόγων **49a-c** με την ίδια διαδικασία, οδήγησε στο πλήρως αποπροστατευμένο ανάλογο **50c** καθώς και στα βενζοϋλιωμένα ανάλογα **50a,b**. (Σχήμα 57)



Σχήμα 57. Αποπροστασία δικέφαλων νουκλεοζιτών **45a-c** και **49a-c**.

Οι απόπειρες απομάκρυνσης της βενζοϋλομάδας της αδερίνης των αναλόγων **50a,b** είτε με μεθοξείδιο του νατρίου είτε με γουανιδίνη οδήγησε σε μίγμα μη

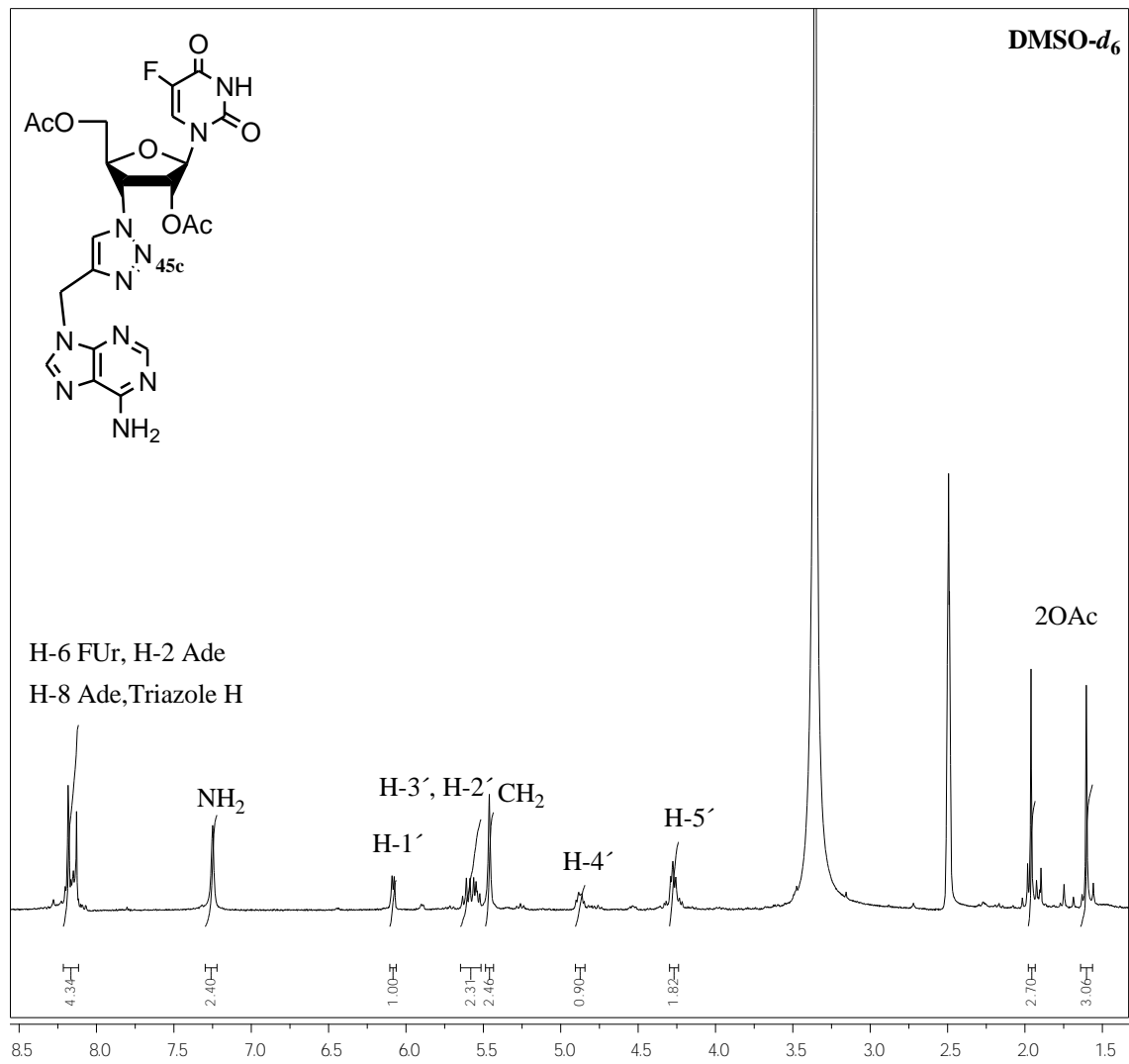
διαχωρίσιμων προϊόντων. Για να λάβουμε τους πλήρως αποπροστατευμένους νουκλεοζίτες **52a,b**, ο νουκλεοζίτης της *N*⁶-βενζουλοαδενίνης (**47a**) αντικαταστάθηκε από τον αντίστοιχο που έφερε την *N*⁶-ακετυλοαδενίνη (Brahme *et al.*, 1985) ως βάση (**47b**). (Σχήμα 58)



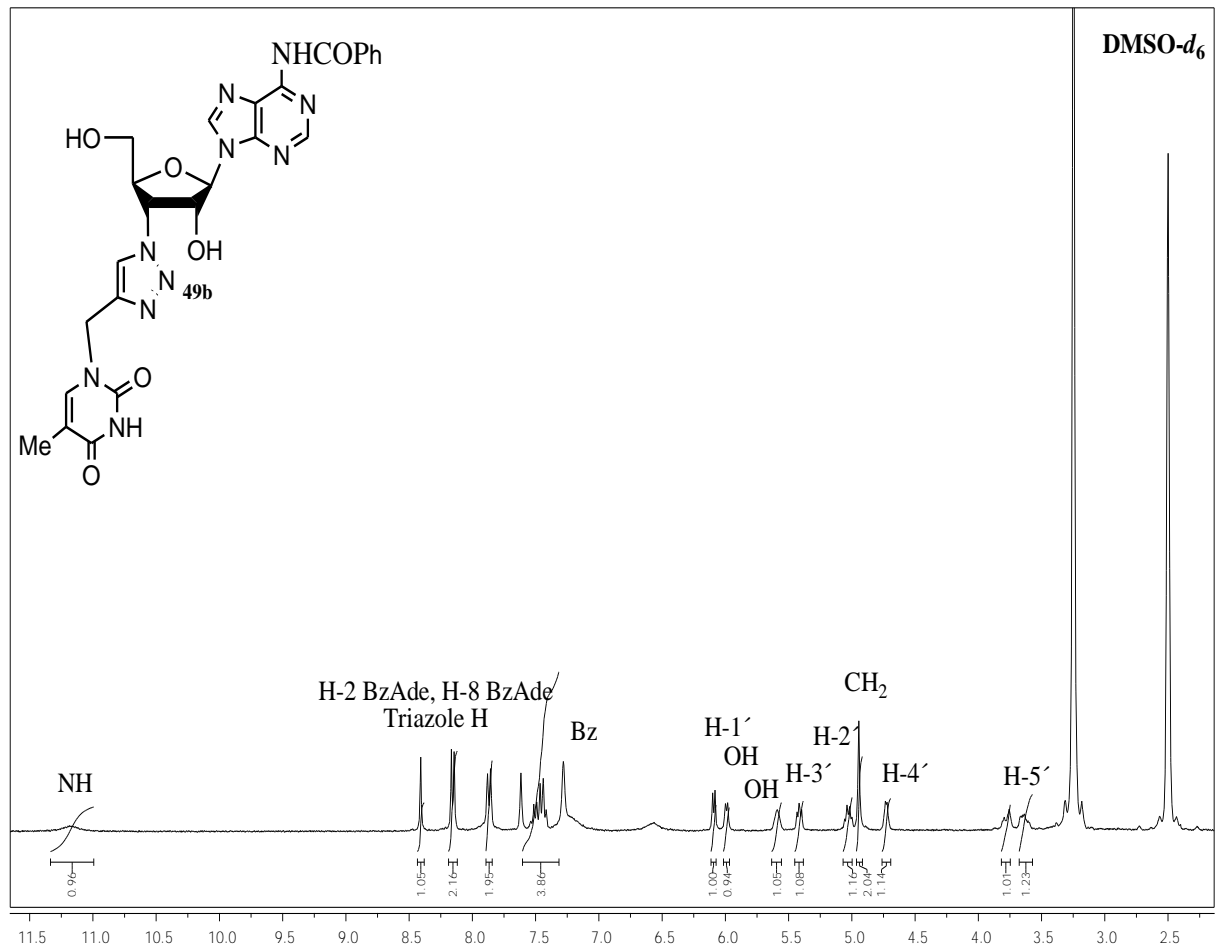
Σχήμα 58. Σύνθεση και αποπροστασία δικέφαλων νουκλεοζιτών **51a,b**.

Κατά το φασματοσκοπικό χαρακτηρισμό των ακετυλιωμένων **45a-c**, **49a-c** και **51a,b** καθώς και απακετυλιωμένων δικέφαλων νουκλεοζιτών **46a-c**, **50a-c** και **52a,b** ο νεοσχηματιζόμενος τριαζολικός δακτύλιος παρατηρήθηκε μεταξύ των 8.08-8.25 ppm. Στα φάσματα ¹H NMR ήταν εμφανή τα σήματα τόσο του σακχάρου όσο και της βάσης όπως στο παράδειγμα του ακετυλιωμένου νουκλεοζίτη **46c** και των απακετυλιωμένων **50b,c** απεικονίζεται στα Σχήματα 59-61.

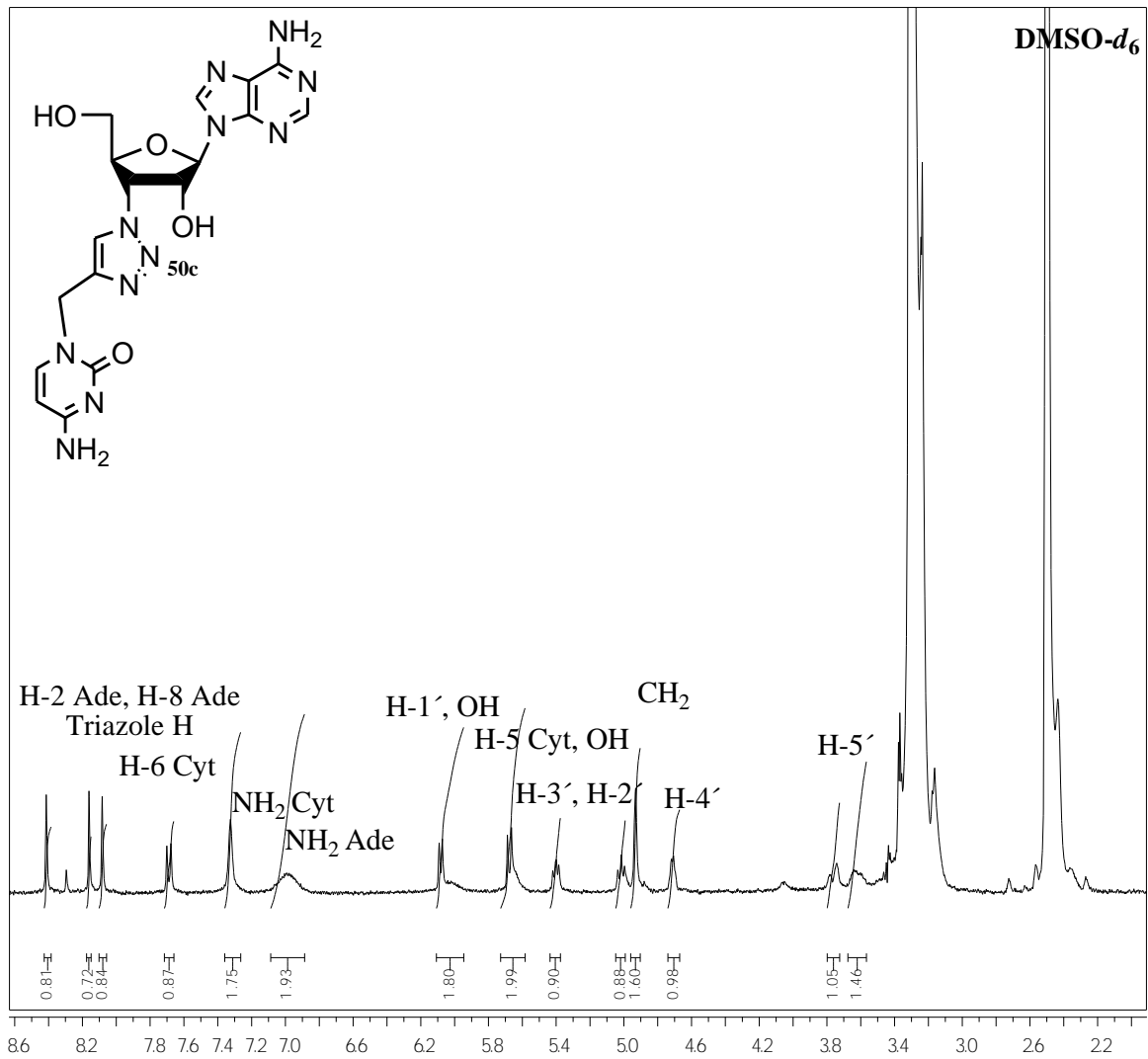
Σχήμα 59. Φάσμα ^1H NMR ένωσης **45c**.



Σχήμα 60. Φάσμα ^1H NMR ένωσης **49b**.



Σχήμα 61. Φάσμα ^1H NMR ένωσης **50c**.



Πα.4. Κινητική μελέτη δικέφαλων τριαζολο νουκλεοζιτών.

Για την περαιτέρω βιολογική αποτίμηση των νέων αναστολέων πραγματοποιήθηκαν επίσης κινητικές μελέτες με την εμπορικά διαθέσιμη παγκρεατική ριβονουκλεάση A βοοειδών και την ανθρώπινη ηωσινοφιλική νευροτοξίνη εκφρασμένη σε βακτήρια *E. coli* (στέλεχος B834). Οι νέες ενώσεις βρέθηκε ότι αναστέλλουν επίσης το ένζυμο συναγωνιστικά. Όσον αφορά την ηωσινοφιλική νευροτοξίνη υπολογίστηκαν οι τιμές IC_{50} εξαιτίας της μειωμένης διαθεσιμότητας των αναστολέων ενώ οι τιμές K_i προέκυψαν από τα αντίστοιχα γραφήματα Dixon ($1/v$ vs $[I]$) για την RNase A.

Παρόλο που οι νέοι δικέφαλοι νουκλεοζίτες αναμενόταν να έχουν καλύτερη ανασταλτική ικανότητα έναντι του ενζύμου σε σχέση με τους νουκλεοζίτες, που έφεραν μια μόνο βάση στο μόριό τους, με ή χωρίς τον τριαζολικό δακτύλιο, η ανασταλτική τους ικανότητα δεν ξεπέρασε εκείνη του νουκλεοζίτη **32a** που είναι ο καλύτερος αναστολέας αυτής της σειράς ενώσεων. (Πίνακας 12)

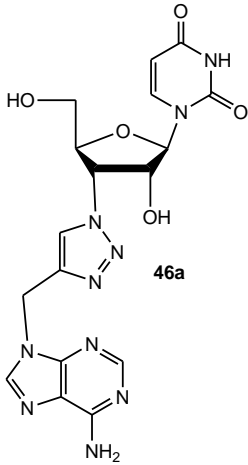
Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 12, από τους δικέφαλους νουκλεοζίτες που συντέθηκαν και μελετήθηκαν κινητικά, τα ανάλογα **50a-c** και **52a,b** που έφεραν την πυριμιδίνη σε απευθείας σύνδεση με τον τριαζολικό δακτύλιο εμφάνισαν καλύτερη ανασταλτική ικανότητα έναντι του ενζύμου σε σχέση με τα ανάλογα **46a-c** τα οποία έφεραν την πουρίνη σε σύνθεση με τον τριαζολικό δακτύλιο στην 3'-θέση. Οι ενώσεις **46a-c** δεν υπήρξαν καλοί αναστολείς της RNase A και δεν αξιολογήθηκαν περαιτέρω στη δραστηριότητα έναντι της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης. Το γεγονός αυτό έρχεται σε αντιδιαστολή με προηγούμενες μελέτες με φωσφονουκλεοτίδια όπου τα ανάλογα πουρινών εμφανίστηκαν καλύτεροι αναστολείς σε σύγκριση με τα αντίστοιχα των πυριμιδινών. (Leonidas *et al.*, 1997; Leonidas *et al.*, 2003; Hatzopoulos *et al.*, 2005; Tsirkone *et al.*, 2009; Samanta *et al.*, 2009) Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν πως η ύπαρξη του τριαζολικού δακτυλίου στη δομή των αναστολέων αυτών αυξάνει τη εκλεκτικότητά τους ως προς το ένζυμο. Επιπλέον όμοια με τους απλούς νουκλεοζίτες έτσι και με τους δικέφαλους κάθε υποκατάσταση στην 5'-θέση της πυριμιδίνης αλλάζει την ανασταλτική ικανότητα του αναστολέα.

Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι οι αναστολείς αυτοί, δεν εμφάνισαν παρόμοια ανασταλτική ικανότητα για την ηωσινοφιλική νευροτοξίνη και την RNase A, όπως αναμέναμε. Έτσι φαίνεται πως η απόσταση μεταξύ του σακχάρου και της

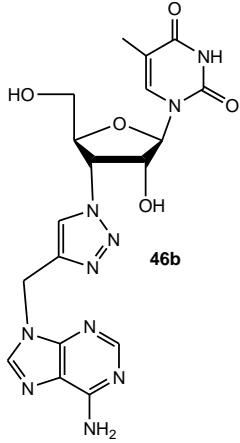
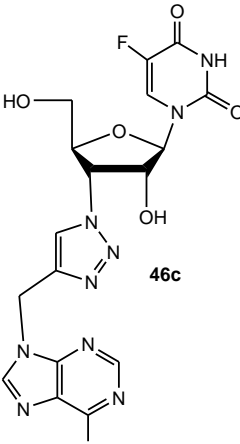
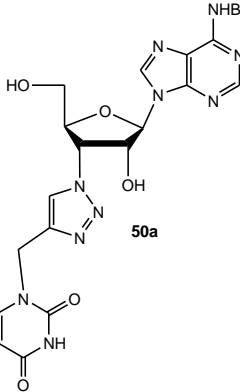
βάσης δεν έχει καθοριστικό ρόλο στην ανασταλτική ικανότητα των ενώσεων όπως στην περίπτωση της RNase A ενώ η εισαγωγή του τριαζολικού δακτυλίου βελτίωσε αλλά και μείωσε τη βιοδραστικότητά τους (ενώσεις **32d**, **36b** και **32e**, **36e**, Πίνακας 2) Οι δικέφαλοι νουκλεοζίτες εμφάνισαν παρόμοια ανασταλτική ικανότητα έναντι της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης ενώ όταν στη δομή υπήρχε η N^6 -βενζουλοαδενίνη αντί της αδενίνης η σταθερά αναστολής αυξήθηκε ελαφρά.

Όλοι οι αναστολείς επέδειξαν καλύτερη ανασταλτική ικανότητα για την RNase A από ότι για την ηωσινοφιλική νευροτοξίνη με εξαίρεση την ένωση **50c** η οποία εμφανίζει δραστικότητα ~2 φορές καλύτερη για την ηωσινοφιλική νευροτοξίνη σε σχέση με την RNase A. Αυτή είναι η πρώτη περίπτωση αναστολέα που εμφανίζει καλύτερη ανασταλτική ικανότητα για τη νευροτοξίνη από ότι για την RNase A.

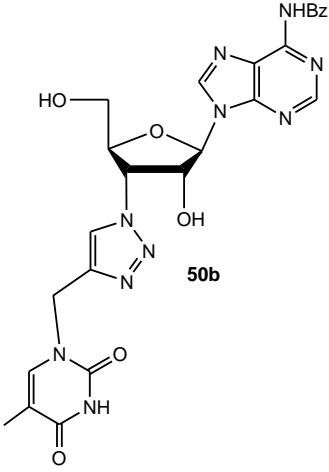
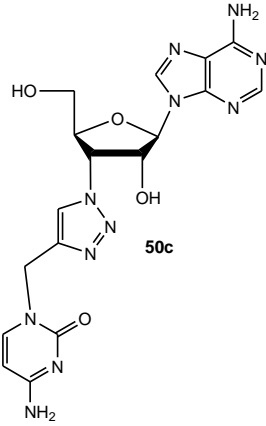
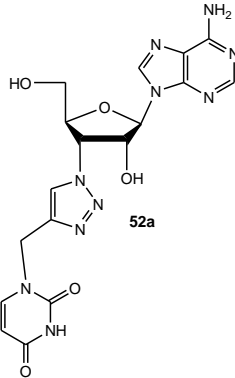
Πίνακας 12: Οι σταθερές αναστολής των δικέφαλων νουκλεοζιτών της αδενίνης **46a-c**, **50a-c** και **52a,b** αλλά και των νουκλεοζιτών **32a,d,e** και **36a,d,e** με και χωρίς τριαζολικό δακτύλιο έναντι της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης και της RNase A, αντίστοιχα.

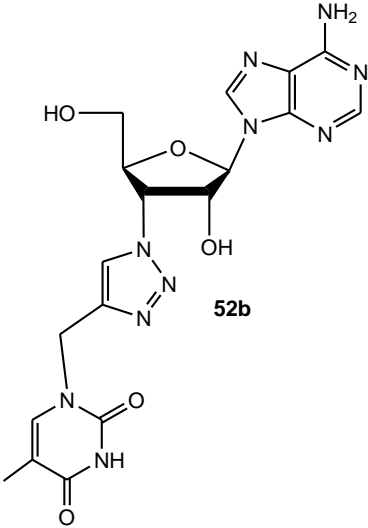
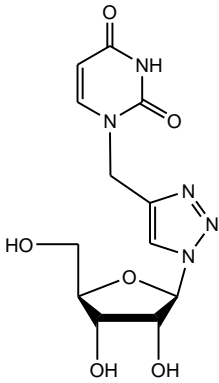
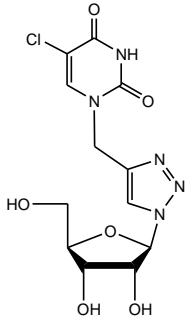
Ένωση	IC_{50} (μ M)		K_i (μ M)	
	EDN		EDN	RNase A
 46a	-		-	159.1 ± 26.9

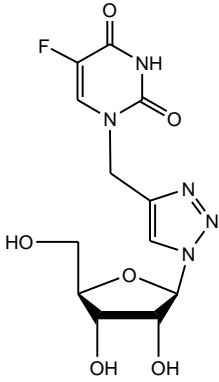
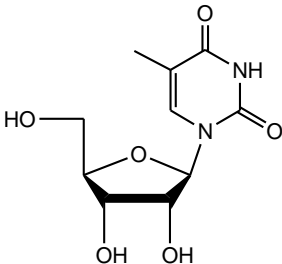
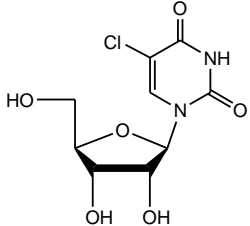
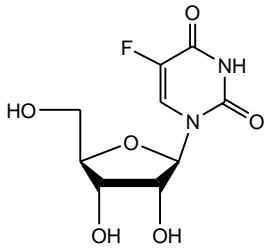
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

 <p>46b</p>	-	-	30% inhibition at 80μM
 <p>46c</p>	-	-	265.0 ± 49.7
 <p>50a</p>	409.3 ± 11.4	267.3 ± 33.4	55.5 ± 7.4

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

 <p>50b</p>	379.1 ± 2.5	247.5 ± 30.1	150.4 ± 22.7
 <p>50c</p>	88.6 ± 0.6	57.8 ± 7.1	98.5 ± 5.3
 <p>52a</p>	651.9 ± 3.4	425.7 ± 51.8	106.1 ± 6.9

 <p>52b</p>	559.1 ± 13.4	365.1 ± 45.3	68.8 ± 6.8
 <p>32a</p>	178.5 ± 4.9	116.4 ± 14.6	1.6 ± 0.2
 <p>32d</p>	534.7 ± 16.4	454.3 ± 62.8	94.8 ± 8.7

 <p style="text-align: center;">32e</p>	63.7 ± 5.9	44.2 ± 6.9	30.8 ± 4.4
 <p style="text-align: center;">36b</p>	282.1 ± 4.7	208.3 ± 26.8	44.1 ± 6.4
 <p style="text-align: center;">36d</p>	$1462.8 \pm$ 109.8	1080.1 ± 160.0	44.5 ± 4.6
 <p style="text-align: center;">36e</p>	33.1 ± 0.5	26.1 ± 3.4	33.6 ± 2.6

Πβ.5. Αντικαρκινική και Αντιική δράση τριάζολο νουκλεοζιτών και δικέφαλων αναλόγων.

Γνωρίζοντας τις φαρμακολογικές ιδιότητες του τριαζολικού δακτυλίου (Efthymiou *et al.*, 2012) και πως η σύνθεση των λεγόμενων δικέφαλων νουκλεοζιτών δεν έχει επαρκώς μελετηθεί μέχρι σήμερα και λιγοστά μόρια αυτής της τάξης έχουν αξιολογηθεί βιολογικά (Kašnar *et al.*, 1993; Kiritsis *et al.*, 2012; Trakossas *et al.*, 2011), θεωρήθηκε σκόπιμο να μελετηθεί και η αντιική και αντικαρκινική δράση των εν λόγω ενώσεων με πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Ιολογίας και Χημειοθεραπείας του Ινστιτούτο Ιατρικής Έρευνας Rega στο Βέλγιο. Η αντικαρκινική δράση των νέο-συντιθέμενων ενώσεων συνοψίζεται στον Πίνακα 10 και όπως παρατηρείται δε φάνηκε αξιοσημείωτη.

Οι ενώσεις εξετάστηκαν και για την αντιική τους δράση έναντι των ιών herpes simplex virus type 1 [HSV-1(KOS)], HSV-2 (G), vaccinia virus, ιός της στοματίτιδας (VSV) σε καλλιέργειες κυττάρων HEL cultures; VSV, Coxsackie virus B4 and respiratory syncytial virus (RSV) σε κύτταρα HeLa; parainfluenza-3 virus, reovirus-1, Sindbis virus, Coxsackie virus B4 και Punta Toro virus σε καλλιέργειες κυττάρων Vero; influenza virus A (H1N1, H3N2) και influenza virus B σε κύτταρα της σειράς MDCK, feline corona virus (FIPV) and feline herpes virus στην κυτταρική σειρά CRFK καθώς και έναντι του ιού της επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (HIV-1III_B and HIV-2ROD) σε κύτταρα CEM χωρίς τα νέα τριάζολο ανάλογα να εμφανίσουν αξιοσημείωτη δράση.

Πίνακας 13. Αντικαρκινική δράση των τριάζολο νουκλεοζιτών **32a-e** και των δικέφαλων νουκλεοζιτών της αδενίνης **46a-c**, **50a-c** και **52a,b**.

Ένωση	IC ₅₀ * (μM)			MCC** (μM)
	L1210	CEM	HeLa	HEL
32a	> 250	> 250	> 250	> 100
32b	> 250	> 250	> 250	> 100
32c	> 250	> 250	> 250	> 100
32d	> 250	> 250	> 250	> 100
32e	> 250	> 250	> 250	> 100
46a	> 250	> 250	> 250	> 100
46b	> 250	> 250	> 250	> 100
46c	146 ± 27	> 250	182 ± 18	> 100
50a	> 250	> 250	> 250	> 100
50b	> 250	> 250	> 250	> 100
50c	> 250	> 250	> 250	> 100
52a	> 250	> 250	> 250	> 100
52b	> 250	> 250	> 250	> 100

* Συγκέντρωση της ένωσης που απαιτείται για αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού κατά 50%.

** Συγκέντρωση της ένωσης που απαιτείται για αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού καλλιέργειας φυσιολογικών κυττάρων ινοβλαστών του πνεύμονα ανθρώπου.

III. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

III.1 ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ξήρανση Διαλυτών

Όλες οι αντιδράσεις που περιλάμβαναν άνυδρους διαλύτες ή ουσίες ευαίσθητες στην ατμόσφαιρα έλαβαν χώρα υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου. Το ακετονιτρίλιο αποστάχθηκε υπεράνω υδριδίου του ασβεστίου και το απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 4 Å, όπου και αποθηκεύτηκε.

Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC: Thin Layer Chromatography)

Η παρακολούθηση της πορείας των αντιδράσεων και ο έλεγχος της καθαρότητας των ενώσεων έγινε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας σε πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με silica gel F₂₅₄ (0.2 mm) από την εταιρία E.Merck. Οι κηλίδες των χρωματογραφημάτων ήταν ορατές είτε με τη χρήση λυχνίας υπεριώδους (UV, 254 nm) είτε ύστερα από ψεκασμό με διάλυμα θειικού οξέος 30% και κατόπιν θέρμανση στους 120 °C.

Χρωματογραφία στήλης

Η χρωματογραφία στήλης για τον καθαρισμό και απομόνωση των συντιθέμενων ουσιών πραγματοποιήθηκε υπό πίεση (flash, column chromatography) ύστερα από την εισαγωγή αέρα εντός πακτωμένης στήλης με silica gel 60 (230-400 mesh) της εταιρίας E. Merck.

Μέτρηση οπτικής ενεργότητας

Οι μετρήσεις της γωνίας στροφής πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου με τη βοήθεια πολωσιμέτρου, τύπου Autopol I.

Προσδιορισμός σημείων τήξεως

Τα σημεία τήξεως των μη υγροσκοπικών στερεών καταγράφηκαν με τη βοήθεια οργάνου Mel-Temp Apparatus και δεν είναι διορθωμένα.

Φάσματα υπεριώδους ακτινοβολίας

Τα φάσματα υπεριώδους ακτινοβολίας λήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο τύπου PG Instruments Ltd. Ο μοριακός συντελεστής απόσβεσης ϵ , προσδιορίστηκε από την εξίσωση:

$$\epsilon = \log(I_0 / I) / (C \times d)$$

όπου $\log(I_0 / I)$: η οπτική πυκνότητα μετρημένη στο μέγιστο της απορρόφησης (λ_{\max})

C: η συγκέντρωση της ουσίας σε mol/L και

d: το μήκος της κυψελίδας σε cm

Φάσματα μάζας

Οι μετρήσεις μάζας έγιναν σε φασματόμετρο τύπου Thermo Quest Finnigan AQA και χρησιμοποιούμενη μέθοδος ιονισμού ήταν διά ψεκασμού (electron spray ionization, ESI).

Στοιχειακή ανάλυση

Οι στοιχειακές αναλύσεις έγιναν με τη χρήση αυτοματοποιημένων αναλυτών της εταιρίας Perkin-Elmer 2400 (% προσδιορισμός C, H και N) και οι τιμές κυμαίνονται σε εύρος ± 0.4 των θεωρητικών.

Φάσματα NMR

Τα φάσματα NMR καταγράφηκαν σε φασματόμετρο τύπου Bruker AM300 με συχνότητα συντονισμού τα 300 MHz για τους πυρήνες ^1H και τα 75.5 MHz για τους πυρήνες ^{13}C . Οι δευτεριωμένοι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υψηλής καθαρότητας και σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο αναφοράς το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS). Οι τιμές χημικής απορρόφησης δίνονται σε ppm (δ) ενώ οι τιμές των σταθερών σύζευξης σε Hz.

III.β.2 Σύνθεση του 2,3,5-τρις-*O*-ακετυλο-β-D-ριβοφουρανοζυλαζιδίου (29) (Stimac *et al.*, 1992)

Σε διάλυμα της εμπορικά διαθέσιμης 1,2,3,4-τετρακίς-*O*-ακετυλο-β-D-ριβοφουρανόζης (20 mmol) σε άνυδρο CH₂Cl₂ (40 mL) προστίθενται, υπό ατμόσφαιρα αζώτου, 22 mmol Me₃SiN₃ και 1 mmol SnCl₄. Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση έως το πέρας της αντίδρασης (TLC). Στη συνέχεια εξουδετερώνεται με NaHCO₃ και εκχυλίζεται με CH₂Cl₂. Η οργανική φάση ξηραίνεται υπεράνω Na₂SO₄ και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το επιθυμητό προιον **29** παραλαμβάνεται με τη μορφή παχύρευστου ελαίου ύστερα από χρωματογραφία στήλης υπό πίεση χρησιμοποιώντας ως διαλύτες έκλουσης το σύστημα *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας (7:3) με 91% απόδοση. R_f = 0.46 (*n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 7:3).

$[\alpha]_D^{22} = -110^\circ$ ($c = 0.20$, CHCl₃)

ESIMS m/z : 302.11 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₁H₁₅N₃O₇) C, H, N

Υπολ. (%) C: 43.86 H: 5.02 N: 13.95

Ευρ. (%) C: 43.74 H: 5.13 N: 14.20

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ 5.35 (d, 1H, $J_{1,2} = 1.7$ Hz, H-1), 6.39 (dd, 1H, $J_{3,4} = 6.4$ Hz, H-3), 5.13 (dd, 1H, $J_{2,3} = 4.8$ Hz, H-2), 4.41 (dd, 1H, H-4), 5.79 (dd, 1H, $J = 12.1, 3.1$ Hz, H-5), 4.35 (ddd, 1H, H-4), 4.15 (dd, 1H, $J = 12.4$ and 4.2 Hz, H-5'), 2.12, 2.11, 2.07 (3s, 9H, 3OAc).

III.β.3 Σύνθεση της *N*-1-προπάργυλο ουρακίλης, θυμίνης, 5-βρωμοουρακίλης, 5-χλωροουρακίλης και 5-φθοροουρακίλης (**30a-e**) (Lazrek *et al.*, 1949)

N-1-Προπάργυλο ουρακίλη (**30a**)

Σε διάλυμα της εμπορικά διαθέσιμης ουρακίλης (4 mmol) σε DMF (50 mL) προστίθενται, υπό ατμόσφαιρα αζώτου, άνυδρο K₂CO₃ (4 mmol) και propargyl bromide (12 mmol). Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου έως το πέρας της αντίδρασης (TLC) και στη συνέχεια ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το ποιον **30a** παραλαμβάνεται ύστερα από χρωματογραφία στήλης σε απόδοση 46%. R_f = 0.21 (οξικός αιθυλεστέρας).

ESIMS m/z: 151.08 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₇H₆N₂O₂) C, H, N

Υπολ. (%) C: 56.00 H: 4.03 N: 18.66

Ευρ. (%) C: 56.15 H: 4.14 N: 18.89

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 11.36 (s, 1H, NH), 7.68 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-6), 5.61 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz, H-5), 4.50 (s, 2H, *J* = 7.7 Hz, CH₂), 3.37 (s, 1H, CH).

N-1-Προπάργυλο θυμίνη (**30b**)

Το προϊόν **30b** παραλαμβάνεται από την εμπορικά διαθέσιμη θυμίνη ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε για την ένωση **30a** ως λευκό στερεό και σε απόδοση 51%. R_f = 0.18 (οξικός αιθυλεστέρας).

ESIMS m/z: 165.10 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₈H₈N₂O₂) C, H, N

Υπολ. (%) C: 58.53 H: 4.91 N: 17.06

Ευρ. (%) C: 58.33 H: 5.17 N: 17.20

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 11.34 (s, 1H, NH), 7.54 (s, 1H, H-6), 4.46 (s, 2H, CH₂), 3.40 (s, 1H, CH), 1.77 (s, 3H, CH₃).

***N*-1-Προπάργυλο 5-βρωμοουρακίλη (30c)**

Το προϊόν **30c** παραλαμβάνεται από την εμπορικά διαθέσιμη θυμίνη ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε για την ένωση **30a** ως λευκό στερεό και σε απόδοση 48%. R_f = 0.20 (οξικός αιθυλεστέρας).

ESIMS m/z: 228.01 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₇H₅BrN₂O₂) C, H, N

Υπολ. (%) C: 36.71 H: 2.20 N: 12.23

Ευρ. (%) C: 37.11 H: 2.55 N: 12.40

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 11.90 (s, 1H, NH), 8.24 (s, 1H, H-6), 4.49 (s, 2H, CH₂), 3.43 (s, 1H, CH).

***N*-1-Προπάργυλο 5-χλωροουρακίλη (30d)**

Το προϊόν **30d** παραλαμβάνεται από την εμπορικά διαθέσιμη 5-χλωροουρακίλη ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε για την ένωση **30a** ως λευκό στερεό και σε απόδοση 81%. R_f = 0.22 (οξικός αιθυλεστέρας).

ESIMS m/z: 185.05 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₇H₅ClN₂O₂) C, H, N

Υπολ. (%) C: 45.55 H: 2.73 N: 15.18

Ευρ. (%) C: 45.29 H: 2.89 N: 15.37

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 11.93 (s, 1H, NH), 8.18 (s, 1H, H-6), 4.50 (s, 2H, CH₂), 3.42 (s, 1H, CH).

N-1-Προπάργυλο 5-φθοροουρακίλη (**30e**)

Το προϊόν **30e** παραλαμβάνεται από την εμπορικά διαθέσιμη 5-φθοροουρακίλη ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε για την ένωση **30a** ως λευκό στερεό (απόδοση 51%). R_f = 0.20 (οξικός αιθυλεστέρας).

ESIMS m/z: 169.02 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₇H₅FN₂O₂) C, H, N

Υπολ. (%) C: 50.01 H: 3.00 N: 16.66

Ευρ. (%) C: 50.28 H: 3.25 N: 16.49

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 11.90 (s, 1H, NH), 8.11 (d, 1H, *J* = 6.4 Hz, H-6), 4.46 (s, 2H, CH₂), 4.01 (s, 1H, CH).

III.β.4. Σύνθεση των προστατευμένων τριάζολο νουκλεοζιτών **31a-e**

1-[(2',3',5'-Τρις-*O*-ακετυλο-β-*D*-ριβοφουρανοζυλο)-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]ουρακίλη (**31a**)

Σε διάλυμα του αζιδοσακχάρου **29** (6.6 mmol) και της προπάργυλο ουρακίλης **30a** (7.6 mmol) σε διαλύτη τετραϋδροφουράνιο (41.6 mL), προστίθενται 41.6 mL H₂O στο οποίο έχουν διαλυθεί καταλυτικές ποσότητες ασκορβικού νατρίου (3.5 mmol) και

CuSO₄·5H₂O (0.84 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση με reflux για 2 ώρες και εν συνεχεία ψύχεται. Στο διάλυμα προστίθεται μεθανόλη και οι διαλύτες στη συνέχεια απομακρύνονται υπό κενό. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης τον οξικό αιθυλεστέρα οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **31a** ως λευκό στερεό (απόδοση 75%).

Σημείο Τήξεως 107-109 °C (dec). R_f = 0.28 (οξικός αιθυλεστέρας).

[α]_D²² = +2° (c = 0.20, CHCl₃)

λ_{max} 265 nm (ε 9241)

ESIMS m/z: 452.42 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₈H₂₁N₅O₉) C, H, N

Υπολ. (%) C: 47.90 H: 4.69 N: 15.52

Ευρ. (%) C: 47.73 H: 4.93 N: 15.83

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ 8.97 (br s, 1H, NH), 7.94 (s, 1H, Triazole H), 7.50 (d, 1H, J_{5,6} = 7.9 Hz, H-6), 6.14 (d, 1H, J_{1',2'} = 3.7 Hz, H-1'), 5.79 (dd, 1H, J = 3.9 and 5.1 Hz, H-2'), 5.72 (d, 1H, H-5), 5.59 (t, 1H, H-3'), 5.02, 4.96 (q, AB-system, 2H, J = 15.1 Hz, CH₂), 4.48 (m, 1H, H-4'), 4.40 (dd, 1H, J = 12.4 and 3.1 Hz, H-5'), 4.24 (dd, 1H, J = 12.4 and 4.5 Hz, H-5'), 2.12, 2.11, 2.09 (3s, 9H, 3OAc).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃):

δ 170.4, 169.4, 169.2, 163.2, 150.7, 144.2, 123.3, 102.8, 90.2, 81.0, 74.3, 70.6, 62.8, 43.1, 29.7, 20.7, 20.5, 20.4.

1-[(2',3',5'-Τρις-Ο-ακετυλο-β-D-ριβοφουρανοζυλο)-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]θυμίνη
(31b)

Ο νουκλεοζίτης **31b** συντίθεται από το αζίδιο **29** και την προπάργυλο θυμίνη **30b** με την ίδια διαδικασία που περιγράφεται για το νουκλεοζίτη **31a**. Το προκύπτον έλαιο

καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης τον οξικό αιθυλεστέρα οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **31b** ως λευκό στερεό (απόδοση 70%).

Σημείο Τήξεως 101-102 °C (dec). Rf = 0.3 (οξικός αιθυλεστέρας).

$[\alpha]_D^{22} = -4^\circ$ ($c = 0.20$, CHCl₃)

λ_{\max} 271 nm (ϵ 8030)

ESIMS m/z: 466.39 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₉H₂₃N₅O₉) C, H, N

Υπολ. (%): C: 49.03 H: 4.98 N: 15.05

Ευρ. (%): C: 49.40 H: 4.74 N: 15.32

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ 8.64 (br s, 1H, NH), 7.91 (s, 1H, Triazole H), 7.33 (s, 1H, H-6), 6.13 (d, 1H, $J_{1',2'} = 3.7$ Hz, H-1'), 5.80 (dd, 1H, $J = 3.9$ and 5.1 Hz, H-2'), 5.59 (t, 1H, H-3'), 5.00, 4.92 (q, AB-system, 2H, $J = 15.0$ Hz, CH₂), 4.48 (m, 1H, H-4'), 4.40 (dd, 1H, $J = 12.4$ and 3.0 Hz, H-5'), 4.24 (dd, 1H, $J = 12.4$ and 4.5 Hz, H-5'), 2.12, 2.11, 2.09 (3s, 9H, 3OAc), 1.91 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃):

δ 170.4, 169.4, 169.2, 163.9, 150.8, 142.4, 140.1, 123.2, 111.4, 90.3, 81.0, 74.3, 70.6, 62.8, 42.9, 20.7, 20.5, 20.4, 12.3.

1-[(2',3',5'-Τρις-Ο-ακετυλο-β-D-ριβοφουρανοζυλο)-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]5-βρωμοουρακίλη (31c)

Ο νουκλεοζίτης **31c** συντίθεται από το αζίδιο **29** και την προπάργυλο βρωμοουρακίλη **30c** με την ίδια διαδικασία που περιγράφεται για το νουκλεοζίτη **31a**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης τον οξικό αιθυλεστέρα οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **31c** (Απόδοση 65%) ως λευκό στερεό.

Σημείο Τήξεως 90-93 °C (dec). Rf = 0.41(οξικός αιθυλεστέρας)

$[\alpha]_D^{22} = -24^\circ$ ($c = 0.20$, CHCl₃)

λ_{\max} 282 nm (ϵ 8703)

ESIMS m/z: 531.30 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₈H₂₀BrN₅O₉) C, H, N

Υπολ. (%) C: 40.77 H: 3.80 N: 13.21

Ευρ. (%) C: 41.02 H: 3.53 N: 12.94

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ 8.80 (br s, 1H, NH), 7.93 (s, 1H, Triazole H), 7.87 (s, 1H, H-6), 6.15 (d, 1H, $J_{1',2'} = 3.7$ Hz, H-1'), 5.79 (dd, 1H, $J = 3.9$ and 5.2 Hz, H-2'), 5.58 (t, 1H, H-3'), 5.04, 4.98 (q, AB-system, 2H, $J = 15.1$ Hz, CH₂), 4.48 (m, 1H, H-4'), 4.40 (dd, 1H, $J = 12.4$ and 3.1 Hz, H-5'), 4.25 (dd, 1H, $J = 12.4$ and 4.5 Hz, H-5'), 2.12, 2.11, 2.09 (3s, 9H, 3OAc).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃):

δ 170.4, 169.5, 169.3, 159.2, 150.2, 143.5, 141.6, 123.5, 97.2, 90.3, 81.0, 74.3, 70.6, 62.8, 43.3, 20.7, 20.5, 20.4.

1-[(2',3',5'-Τρις-Ο-ακετυλο-β-D-ριβοφουρανοζυλο)-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]5-χλωροουρακίλη (31d)

Ο νουκλεοζίτης **31d** συντίθεται από το αζίδιο **29** και την προπάργυλο χλωροουρακίλη **30d** με την ίδια διαδικασία που περιγράφεται για το νουκλεοζίτη **31a**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης τον οξικό αιθυλεστέρα οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **31d** ως λευκό στερεό και σε απόδοση 68%.

Σημείο Τήξεως 80-82 °C (dec). Rf = 0.39 (οξικός αιθυλεστέρας).

$[\alpha]_D^{22} = -8^\circ$ ($c = 0.20$, CHCl₃)

λ_{\max} 279 nm (ϵ 9402)

ESIMS m/z: 486.85 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₈H₂₀ClN₅O₉) C, H, N

Υπολ. (%) C: 44.50 H: 4.15 N: 14.42

Ευρ. (%) C: 44.68 H: 3.92 N: 14.12

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ 8.77 (br s, 1H, NH), 7.94 (s, 1H, Triazole H), 7.76 (s, 1H, H-6), 6.15 (d, 1H, $J_{1',2'} = 3.6$ Hz, H-1'), 5.79 (dd, 1H, $J = 4.1$ and 5.0 Hz, H-2'), 5.58 (t, 1H, H-3'), 5.00 (t, 2H, $J = 15.7$ Hz, CH₂), 4.49 (m, 1H, H-4'), 4.40 (dd, 1H, $J = 12.4$ and 3.0 Hz, H-5'), 4.25 (dd, 1H, $J = 12.4$ and 4.5 Hz, H-5'), 2.12, 2.11, 2.10 (3s, 9H, 3OAc).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃):

δ 170.4, 169.5, 169.3, 159.1, 149.9, 141.6, 141.0, 123.4, 109.5, 90.3, 81.0, 74.3, 70.6, 62.8, 43.3, 20.7, 20.5, 20.4.

1-[(2',3',5'-τρις-Ο-ακετυλο-β-D-ριβοφουρανοζυλο)-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]5-φθοροουρακίλη (31e)

Ο νουκλεοζίτης **31e** συντίθεται από το αζίδιο **29** και την προπάργυλο 5-φθοροουρακίλη **30e** με την ίδια διαδικασία που περιγράφεται για το νουκλεοζίτη **31a**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης τον οξικό αιθυλεστέρα οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **31e** (Απόδοση 71%) ως λευκό στερεό.

Σημείο Τήξεως 49-51 °C (dec). R_f = 0.5 (οξικός αιθυλεστέρας)

$[\alpha]_D^{22} = +2^\circ$ ($c = 0.20$, CHCl₃)

λ_{\max} 271 nm (ϵ 7718)

ESIMS m/z: 470.39 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₈H₂₀FN₅O₉) C, H, N

Υπολ. (%) C: 46.06 H: 4.29 N: 14.92

Ευρ. (%) C: 46.45 H: 4.48 N: 14.67

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ 8.78 (br s, 1H, NH), 7.93 (s, 1H, Triazole H), 7.61 (d, 1H, $J_{6,F} = 5.3$ Hz, H-6), 6.15 (d, 1H, $J_{1',2'} = 3.5$ Hz, H-1'), 5.79 (dd, 1H, $J = 3.9$ and 4.9 Hz, H-2'), 5.58 (t, 1H, H-3'), 5.00, 4.94 (q, AB-system, 2H, $J = 15.2$ Hz, CH₂), 4.49 (m, 1H, H-4'), 4.40 (dd, 1H, $J = 12.4$ and 2.9 Hz, H-5'), 4.25 (dd, 1H, $J = 12.5$ and 4.5 Hz, H-5'), 2.13, 2.12, 2.10 (3s, 9H, 3OAc).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃):

δ 170.4, 169.5, 169.3, 157.2, 149.5, 142.2, 139.1, 128.7, 123.4, 90.3, 80.9, 74.3, 70.6, 62.8, 43.2, 20.7, 20.4, 20.3.

III.β.5. Σύνθεση αποπροστατευμένων τριάζολο νουκλεοζιτών 32a-e

1-[(β-D-Ριβοφουρανοζυλο)-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]ουρακίλη (32a)

Διάλυμα του προστατευμένου νουκλεοζίτη **31a** (1 mmol) σε μεθανολική αμμωνία (41.8 ml), κορεσμένης στους 0°C, αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για μια νύχτα. Ο διαλύτης στη συνέχεια απομακρύνεται υπό κενό ώστε να ληφθεί ο τελικός νουκλεοζίτης **32a** ως λευκό στερεό και σε απόδοση 82%.

Σημείο Τήξεως 97-99 °C (dec). Rf = 0.25 (οξικός αιθυλεστέρας/ μεθανόλη 8.5:1.5).

$[\alpha]_D^{22} = -4^\circ$ ($c = 0.20$, MeOH)

λ_{max} 264 nm (ϵ 10255)

ESIMS m/z: 326.27 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₂H₁₅N₅O₆) C, H, N

Υπολ. (%) C: 44.31 H: 4.65 N: 21.53

Ευρ. (%) C: 44.19 H: 4.86 N: 21.13

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 10.97 (br s, 1H, NH), 8.30 (s, 1H, Triazole H), 7.75 (d, 1H, $J_{5,6} = 7.9$ Hz, H-6), 5.91 (d, 1H, $J_{1',2'} = 4.8$ Hz, H-1'), 5.58 (m, 2H, H-5 and 3'-OH), 5.22 (d, 1H, $J_{2'-OH,2'} = 5.1$ Hz, 2'-OH), 4.95 (m, 3H, CH₂ and 5'-OH), 4.36 (dd, 1H, $J = 4.8$ and 10.2 Hz, H-3'), 4.11 (dd, 1H, $J = 4.6$ and 9.2 Hz, H-2'), 3.96 (dd, 1H, $J = 4.2$ and 8.4 Hz, H-4'), 3.63-3.42 (m, 2H, H-5').

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 163.6, 150.6, 145.4, 142.6, 122.0, 101.2, 91.9, 85.8, 74.9, 70.3, 61.2, 42.2.

1-[(β-D-Ριβοφουρανοζυλο)-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]θυμίνη (32b)

Ο τελικός νουκλεοζίτης **32b** συντίθεται με την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για το νουκλεοζίτη **32a** οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν ως λευκό στερεό (Απόδοση 78%).

Σημείο Τήξεως 76-78 °C (dec). R_f = 0.29 (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 8.5:1.5).

$[\alpha]_D^{22} = -8^\circ$ ($c = 0.20$, MeOH)

λ_{max} 270 nm (ϵ 5184)

ESIMS m/z: 340.33 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₃H₁₇N₅O₆) C, H, N

Υπολ. (%) C: 46.02 H: 5.05 N: 20.64

Ευρ. (%) C: 46.35 H: 4.88 N: 20.52

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 11.08 (br s, 1H, NH), 8.28 (s, 1H, Triazole H), 7.63 (s, 1H, H-6), 5.91 (d, 1H, $J_{1',2'} = 4.7$ Hz, H-1'), 5.56 (d, 1H, $J_{3'-OH,3'} = 5.8$ Hz, 3'-OH), 5.22 (d, 1H, $J_{2'-OH,2'} = 4.9$ Hz, 2'-OH), 4.96 (t, 1H, $J = 5.0$ Hz, 5'-OH), 4.91 (s, 2H, CH₂), 4.36 (dd, 1H, $J = 4.3$ and 9.0 Hz, H-3'), 4.09 (d, 1H, H-2'), 3.96 (dd, 1H, $J = 3.4$ and 7.4 Hz, H-4'), 3.63-3.45 (m, 2H, H-5'), 1.76 (s, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO- d_6):

δ 164.2, 150.6, 142.7, 141.1, 122.0, 108.8, 91.9, 85.8, 74.9, 70.3, 61.2, 42.1, 11.9.

1-[(β -D-Ριβοφουρανοζυλο)-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]5-βρωμοουρακίλη (32c)

Ο τελικός νουκλεοζίτης **32c** συντίθεται με την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για το νουκλεοζίτη **32a** οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν υπό τη μορφή λευκού στερεού και σε απόδοση 74%.

Σημείο Τήξεως 176-178 °C (dec). Rf = 0.4 (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 8.5:1.5).

$[\alpha]_D^{22} = -4^\circ$ ($c = 0.20$, MeOH)

λ_{max} 280 nm (ϵ 9785)

ESIMS m/z: 405.19 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Στοιχειακή Ανάλυση: ($\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{BrN}_5\text{O}_6$) C, H, N

Υπολ. (%) C: 35.66 H: 3.49 N: 17.33

Ευρ. (%) C: 35.91 H: 3.25 N: 17.53

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6):

δ 11.65 (br s, 1H, NH), 8.35 (s, 1H, Triazole H), 8.31 (s, 1H, H-6), 5.91 (d, 1H, $J_{1',2'} = 4.7$ Hz, H-1'), 5.56 (d, 1H, $J_{3'-\text{OH},3'} = 6.1$ Hz, 3'-OH), 5.22 (d, 1H, $J_{2'-\text{OH},2'} = 5.2$ Hz, 2'-OH), 4.97 (m, 2H, CH_2 and 5'-OH), 4.37 (dd, 1H, $J = 5.2$ and 10.6 Hz, H-3'), 4.11 (dd, 1H, $J = 4.9$ and 9.5 Hz, H-2'), 3.96 (dd, 1H, $J = 4.3$ and 8.4 Hz, H-4'), 3.62-3.45 (m, 2H, H-5').

^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO- d_6):

δ 159.6, 150.0, 145.1, 142.3, 122.1, 94.9, 91.9, 85.8, 74.9, 70.3, 61.2, 42.7.

1-[(β-D-Ριβοφουρανοζυλο)-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]5-χλωροουρακίλη (32d)

Ο τελικός νουκλεοζίτης **32d** συντίθεται με την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για το νουκλεοζίτη **32a** οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν ως λευκό στερεό και απόδοση 79%.

Σημείο Τήξεως 103-105 °C (dec). Rf = 0.38 (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 8.5:1.5).

$[\alpha]_D^{22} = -4^\circ$ ($c = 0.20$, MeOH)

λ_{\max} 277 nm (ϵ 7550)

ESIMS m/z: 360.71 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₂H₁₄ClN₅O₆) C, H, N

Υπολ. (%) C: 40.07 H: 3.92 N: 19.47

Ευρ. (%) C: 39.97 H: 4.19 N: 19.16

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 10.94 (br s, 1H, NH), 8.32 (s, 1H, Triazole H), 8.28 (s, 1H, H-6), 5.91 (d, 1H, $J_{1',2'} = 4.8$ Hz, H-1'), 5.57, 5.23 (2 br s, 2H, 3'-OH and 2'-OH), 4.96 (m, 3H, CH₂ and 5'-OH), 4.36 (t, 1H, H-3'), 4.10 (t, 1H, H-2'), 3.96 (dd, 1H, $J = 4.2$ and 8.4 Hz, H-4'), 3.62-3.44 (m, 2H, H-5').

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 159.4, 149.8, 142.8, 142.6, 142.3, 122.2, 106.4, 91.9, 85.7, 74.8, 70.3, 42.8.

1-[(β-D-Ριβοφουρανοζυλο)-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]5-φθοροουρακίλη (32e)

Ο τελικός νουκλεοζίτης **32e** συντίθεται με την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για το νουκλεοζίτη **32a** οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν με τη μορφή λευκού στερεού (Απόδοση, 83%).

Σημείο Τήξεως 63-65 °C (dec). Rf = 0.32 (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 8.5:1.5).

$[\alpha]_D^{22} = -4$ ($c = 0.20$, MeOH)

λ_{\max} 271 nm (ϵ 3645)

ESIMS m/z: 344.29 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₂H₁₄FN₅O₆) C, H, N

Υπολ. (%) C: 41.99 H: 4.11 N: 20.40

Ευρ. (%) C: 42.35 H: 3.92 N: 20.69

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 10.73 (br s, 1H, NH), 8.31 (s, 1H, Triazole H), 8.19 (d, 1H, *J*_{6,F} = 6.6 Hz, H-6), 5.91 (d, 1H, *J*_{1',2'} = 4.3 Hz, H-1'), 5.58, 5.24 (2 br s, 2H, 3'-OH and 2'-OH), 4.96, 4.91 (2s, 3H, 5'-OH and CH₂), 4.35 (m, 1H, H-3'), 4.10 (m, 1H, H-2'), 3.95 (m, 1H, H-4'), 3.62-3.46 (m, 2H, H-5').

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 160.5, 152.5, 145.6, 143.5, 142.0, 125.4, 95.0, 89.0, 78.2, 73.5, 64.4, 45.8.

III.β.6. Σύνθεση των ουριδινών 35a-e

1-(2',3',5'-Τρις-Ο-ακετυλο-β-D-ριβοφουρανοζυλο)ουρακίλη (35a)

Διάλυμα της εμπορικά διαθέσιμης ακετυλιωμένης β-D-ριβόζης (6.28 mmol) και της βάσης ουρακίλη (**34a**) (8.8 mmol) σε 30.8 mL ακετονιτρίλιο, εξαμεθυλοδισιλαζάνιο (10.9 mmol, 1.24 eq), σακχαρίνη (0.4 mmol, 0.046 eq) και τριφθορομεθανοσουλφονικό τριμεθυλοσιλυλεστέρα (Me₃SiSO₃CF₃) ως καταλύτη (8.8 mmol, 1.4 eq) ακτινοβολήθηκαν σε οικιακό φούρνο μικροκυμάτων (100 W) για 3 λεπτά. Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC) το μίγμα της αντίδρασης εκχυλίσθηκε με CH₂Cl₂, αφότου εξουδετερώθηκε προηγούμενα με διττανθρακικό νάτριο. Η οργανική φάση συλλέχθηκε και ξηράθηκε υπεράνω άνυδρου Na₂SO₄ ενώ στη συνέχεια ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Το προκύπτον εναιώρημα του νουκλεοζίτη **35a** καθαρίστηκε τέλος με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 7:3 οπότε παραλαμβάνεται ο προστατευμένοι νουκλεοζίτες **35a**, σε απόδοση 80%. R_f = 0.32

ESIMS m/z: 371.12 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₅H₁₈N₂O₉) C, H, N

Υπολ. (%) C: 48.65 H: 4.90 N: 7.56

Ευρ. (%) C: 48.53 H: 5.03 N: 7.71

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ 8.61 (br s, 1H, NH), 7.38 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.1$ Hz, H-6), 6.02 (d, 1H, $J_{1',2'} = 4.2$ Hz, H-1'), 5.78 (d, 1H, H-5), 5.36-5.32 (m, 3H, H-2'-H-4'), 4.41-4.28 (m, 2H, H-5'), 2.16, 2.14, 2.12 (3s, 9H, 3OAc).

1-(2',3',5'-Τρις-Ο-ακετυλο-β-D-ριβοφουρανοζυλο)θυμίνη (35b)

Ο νουκλεοζίτης **35b** συντέθηκε από την εμπορικά διαθέσιμη ακετυλιωμένη β-D-ριβόζη και θυμίνη (**34b**) με την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε για το νουκλεοζίτη **35a**, οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν ως λευκό αφρώδες στερεό και απόδοση 82%. R_f = 0.29

ESIMS m/z: 385.13 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₆H₂₀N₂O₉) C, H, N

Υπολ. (%) C: 50.00 H: 5.25 N: 7.29

Ευρ. (%) C: 50.19 H: 5.09 N: 7.19

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ 8.61 (br s, 1H, NH), 7.18 (s, 1H, H-6), 6.08 (d, 1H, $J_{1',2'} = 3.5$ Hz, H-1'), 5.35-5.30 (m, 3H, H-2'-H-4'), 4.43-4.44 (m, 2H, H-5'), 2.19, 2.16, 2.13 (3s, 9H, 3OAc), 1.97 (s, 3H, CH₃).

1-(2',3',5'-Τρις-Ο-ακετυλο-β-D-ριβοφουρανοζυλο)5-βρωμοουρακίλη (35c)

Ο νουκλεοζίτης **35c** συντέθηκε από την εμπορικά διαθέσιμη ακετυλιωμένη β-D-ριβόζη και 5-βρωμοουρακίλη (**34c**) με την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε για το νουκλεοζίτη **35a**, οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν ως λευκό αφρώδες στερεό σε απόδοση 75%. Rf = 0.24

ESIMS m/z: 449.09 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₅H₁₇BrN₂O₉) C, H, N

Υπολ. (%) C: 40.11 H: 3.81 N: 6.24

Ευρ. (%) C: 39.97 H: 3.92 N: 6.39

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ 8.52 (br s, 1H, NH), 7.84 (s, 1H, H-6), 6.08 (d, 1H, *J*_{1',2'} = 3.6 Hz, H-1'), 5.35-5.30 (m, 3H, H-2'–H-4'), 4.40-4.36 (m, 2H, H-5'), 2.22, 2.13, 2.11 (3s, 9H, 3OAc).

1-(2',3',5'-Τρις-Ο-ακετυλο-β-D-ριβοφουρανοζυλο)5-χλωροουρακίλη (35d)

Ο νουκλεοζίτης **35d** συντέθηκε από την εμπορικά διαθέσιμη ακετυλιωμένη β-D-ριβόζη και 5-χλωροουρακίλη (**34d**) με την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε για το νουκλεοζίτη **35a**, οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν ως λευκό αφρώδες στερεό και απόδοση 78%. Rf = 0.31

ESIMS m/z: 405.10 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₅H₁₇ClN₂O₅) C, H, N

Υπολ. (%) C: 44.51 H: 4.23 N: 6.92

Ευρ. (%) C: 44.61 H: 4.43 N: 6.74

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3):

δ 8.82 (br s, 1H, NH), 7.74 (s, 1H, H-6), 6.09 (d, 1H, $J_{1',2'} = 3.4$ Hz, H-1'), 5.35-5.39 (m, 3H, H-2'-H-4'), 4.40-4.36 (m, 2H, H-5'), 2.21, 2.13, 2.11 (3s, 9H, 3OAc).

1-(2',3',5'-Τρις-Ο-ακετυλο-β-D-ριβοφουρανοζυλο)5-φθοροουρακίλη (35e)

Ο νουκλεοζίτης **35e** συντέθηκε από την εμπορικά διαθέσιμη ακετυλιωμένη β-D-ριβόζη και 5-φθοροουρακίλη (**34e**) με την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε για το νουκλεοζίτη **35a**, οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν ως λευκό αφρώδες στερεό και απόδοση 80%. Rf = 0.21

ESIMS m/z: 389.11 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Στοιχειακή Ανάλυση: ($\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{FN}_2\text{O}_9$) C, H, N

Υπολ. (%) C: 46.40 H: 4.41 N: 7.21

Ευρ. (%) C: 46.57 H: 4.29 N: 7.36

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3):

δ 8.77 (br s, 1H, NH), 7.60 (d, 1H, $J_{6,\text{F}} = 6.1$ Hz, H-6), 6.08 (d, 1H, $J_{1',2'} = 3.1$ Hz, H-1'), 5.33-5.28 (m, 3H, H-2'-H-4'), 4.39-4.35 (m, 2H, H-5'), 2.18, 2.13, 2.11 (3s, 9H, 3OAc).

III.β.7. Σύνθεση των ουριδινών 36a-e (Beranek et al. 1976; Currid et al. 1997; Bavaro et al. 2009; Kumar et al. 2009; Yamamoto et al. 1989).

1-β-D-Ριβοφουρανοζυλο-ουρακίλη (36a)

Διάλυμα του προστατευμένου νουκλεοζίτη **35a** (1 mmol) σε 41.8 mL μεθανολικής αμμωνίας, κορεσμένης στους 0 °C, αφέθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για μια νύχτα. Ο διαλύτης απομακρύνεται στη συνέχεια υπό κενό οπότε λαμβάνεται

το επιθυμητό προϊόν **36a** ως λευκό αφρώδες στερεό, σε απόδοση 87%. Rf = 0.26 (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 8.5:1.5)

ESIMS m/z: 345.07 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₉H₁₂N₂O₆) C, H, N

Υπολ. (%) C: 44.27 H: 4.95 N: 11.47

Ευρ. (%) C: 44.38 H: 4.75 N: 11.32

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD):

δ 7.98 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.0$ Hz, H-6), 5.88 (d, 1H, $J_{1',2'} = 4.2$ Hz, H-1'), 5.68 (d, 1H, H-5), 4.19-4.12 (m, 2H, H-2', H-3'), 4.00 (dd, 1H, $J = 4.2$ and 8.5 Hz, H-4'), 3.84 (dd, 1H, $J = 12.5$ and 2.9 Hz, H-5'), 3.72 (dd, 1H, $J = 12.5$ and 4.3 Hz, H-5').

1-β-D-Ριβοφουρανοζυλο-θυμίνη (36b)

Το αποπροστατευμένο ανάλογο **36b** λήφθηκε με την ίδια πειραματική διαδικασία όπως περιγράφεται για το νουκλεοζίτη **36a** ως λευκό αφρώδες στερεό σε απόδοση 85%. Rf = 0.24 (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 8.5:1.5)

ESIMS m/z: 359.10 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₀H₁₄N₂O₆) C, H, N

Υπολ. (%) C: 46.51 H: 5.46 N: 10.85

Ευρ. (%) C: 46.70 H: 5.63 N: 10.65

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD):

δ 7.82 (s, 1H, H-6), 5.89 (d, 1H, $J_{1',2'} = 4.2$ Hz, H-1'), 4.20-4.14 (m, 2H, H-2', H-3'), 3.99 (dd, 1H, $J = 3.0$ and 7.2 Hz, H-4'), 3.85 (dd, 1H, $J = 12.2$ and 3.1 Hz, H-5'), 3.74 (dd, 1H, $J = 12.2$ and 4.0 Hz, H-5'), 1.89 (s, 3H, CH_3).

1- β -D-Ριβοφουρανοζυλο-5-βρωμοουρακίλη (36c)

Το αποπροστατευμένο ανάλογο **36c** λήφθηκε με την ίδια πειραματική διαδικασία όπως περιγράφεται για το νουκλεοζίτη **36a** ως λευκό αφρώδες στερεό σε απόδοση 86%. $R_f = 0.21$ (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 8.5:1.5)

ESIMS m/z : 323.00 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Στοιχειακή Ανάλυση: ($\text{C}_9\text{H}_{12}\text{BrN}_2\text{O}_6$) C, H, N

Υπολ. (%) C: 33.46 H: 3.43 N: 8.67

Ευρ. (%) C: 33.32 H: 3.59 N: 8.88

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD):

δ 8.55 (s, 1H, H-6), 5.88 (d, 1H, $J_{1',2'} = 4.5$ Hz, H-1'), 4.19-4.15 (m, 2H, H-2', H-3'), 4.02 (dd, 1H, $J = 4.1$ and 8.4 Hz, H-4'), 3.89 (dd, 1H, $J = 12.2$ and 2.8 Hz, H-5'), 3.75 (dd, 1H, $J = 12.5$ and 3.9 Hz, H-5').

1- β -D-Ριβοφουρανοζυλο-5-χλωροουρακίλη (36d)

Το αποπροστατευμένο ανάλογο **36d** λήφθηκε με την ίδια πειραματική διαδικασία όπως περιγράφεται για το νουκλεοζίτη **36a** ως λευκό αφρώδες στερεό σε απόδοση 90%. $R_f = 0.25$ (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 8.5:1.5)

ESIMS m/z : 379.05 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Στοιχειακή Ανάλυση: ($\text{C}_9\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_6$) C, H, N

Υπολ. (%) C: 38.79 H: 3.98 N: 10.05

Ευρ. (%) C: 38.99 H: 3.86 N: 10.17

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD):

δ 8.43 (s, 1H, H-6), 5.88 (d, 1H, $J_{1',2'} = 2.9$ Hz, H-1'), 4.19-4.15 (m, 2H, H-2', H-3'), 4.05-4.01 (m, 1H, H-4'), 3.88 (dd, 1H, $J = 12.2$ and 2.5 Hz, H-5'), 3.75 (dd, 1H, $J = 12.2$ and 3.8 Hz, H-5').

1-β-D-Ριβοφουρανοζυλο-5-φθοροουρακίλη (36e)

Το αποπροστατευμένο ανάλογο **36e** λήφθηκε με την ίδια πειραματική διαδικασία όπως περιγράφεται για το νουκλεοζίτη **36a** ως λευκό αφρώδες στερεό σε απόδοση 92%. Rf = 0.20 (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 8.5:1.5)

ESIMS m/z: 363.07 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₉H₁₁FN₂O₆) C, H, N

Υπολ. (%) C: 41.23 H: 4.23 N: 10.68

Ευρ. (%) C: 41.39 H: 4.37 N: 10.47

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD):

δ 8.31 (d, 1H, $J_{6,F} = 7.0$ Hz, H-6), 5.89 (d, 1H, $J_{1',2'} = 3.8$ Hz, H-1'), 4.19-4.15 (m, 2H, H-2', H-3'), 4.04-4.01 (m, 1H, H-4'), 3.87 (dd, 1H, $J = 12.2$ and 2.7 Hz, H-5'), 3.75 (dd, 1H, $J = 12.2$ and 3.7 Hz, H-5').

III.β.8. Σύνθεση της 3-αζιδο-3-δεοξυ-1,2:5,6-δισ-*O*-ισοπροπυλιδενο- α -D-ριβοφουρανόζης (**39**). (Gao et al. 2012)

Σε διάλυμα από την εμπορικά διαθέσιμη 1,2:5,6-δισ-*O*-ισοπροπυλιδενο- α -D-γλυκοφουρανόζη (DAG, 11.53 mmol) σε διχλωροαιθάνιο (30 mL), προστίθενται 2.8 mL πυριδίνης και 2.9 mL τριφθορομεθανικούσουλφονικού ανυδρίτη στους 0 °C. Το διάλυμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 1 ώρα και στη συνέχεια εκχυλίζεται με διχλωροαιθάνιο και νερό. Η οργανική φάση αφού συλλεχθεί, πλένεται με brine, ξηραίνεται υπεράνω MgSO₄, φιλτράρεται και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό οπότε παραλαμβάνεται το ενδιάμεσο **38**. Στη συνέχεια σε διάλυμα του ενδιαμέσου **38** σε άνυδρο *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο (20 mL) προστίθενται 34.61 mmol sodium azide και το μίγμα αφήνεται να αναδευτεί σε θερμοκρασία δωματίου για 48 h. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα και νερό (×3). Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με MgSO₄, φιλτράρεται και ο διαλύτης εξατμίζεται με κενό. Η ένωση **39** παραλαμβάνεται ως παχύρευστο έλαιο ύστερα από χρωματογραφία στήλης με διαλύτη έκλουσης το σύστημα *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 4:1 σε απόδοση 47%.

IR (KBr): 2113 (N₃) cm⁻¹

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ 5.79 (d, 1H, $J = 3.6$ Hz, H-1'), 4.72 (t, 1H, $J = 4.1$ Hz, H-2'), 4.17-3.97 (m, 4H, H-4'-H-6'), 3.71 (dd, 1H, $J = 4.6, 9.5$ Hz, H-3'), 1.58 (s, 3H, CH₃), 1.48 (s, 3H, CH₃), 1.38 (s, 3H, CH₃), 1.26 (s, 3H, CH₃).

III.β.9. Σύνθεση της 3-αζιδο-3-δεοξυ-1,2-*O*-ισοπροπυλιδενο- α -D-ριβοφουρανόζης (**40**). (Gao et al. 2012)

Διάλυμα της ένωσης **39** (9.22 mmol) σε 30 mL οξικού οξέος (75%) αναδεύεται στους 55 °C για 1,5 ώρα. Μετά το πέρας της 1,5 ώρας ο διαλύτης απομακρύνεται με κενό και toluene και το υπόλειμμα επαναδιαλύεται σε αιθανόλη (30 mL) και σε αυτό προστίθεται στάγδην διάλυμα NaIO₄ (11.09 mmol) σε 15 mL νερό, στους 0 °C. Αφήνεται για ανάδευση για 20 λεπτά και στη συνέχεια προστίθεται βορουδρίδιο του

νατρίου (NaBH_4 , 27.76 mmol) οπότε το διάλυμα αναδεύεται για άλλη μια ώρα στους $0\text{ }^\circ\text{C}$. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα φιλτράρεται και ο διαλύτης απομακρύνεται με κενό. Το προϊόν **40** παραλαμβάνεται ως παχύρευστο έλαιο, ύστερα από χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστερας 1:1 σε απόδοση 84%.

IR (KBr): 2108 (N_3) cm^{-1}

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3):

δ 5.81 (d, 1H, $J = 3.6$ Hz, H-1'), 4.75 (t, 1H, $J = 4.1$ Hz, H-2'), 4.17-4.12 (m, 1H, H-4'), 4.00 (dd, 1H, $J = 2.4, 12.6$ Hz, H-3'), 3.71 (dd, 1H, $J = 3.0, 12.6$ Hz, H-5'), 3.59 (dd, 1H, $J = 4.6, 9.5$ Hz, H-5'), 1.58 (s, 3 H, CH_3), 1.38 (s, 3 H, CH_3).

III.β.10. Σύνθεση της 5-Ο-ακετυλο-3-αζιδο-3-δεοξυ-1,2-Ο-ισοπροπιλιδενο- α -D-ριβοφουρανόζης (**41**). (Gao et al. 2012)

Σε 6.97 mmol της ένωσης **40** σε 15 mL άνυδρη πυριδίνη προστίθεται οξικός ανυδρίτης (Ac_2O , 13.99 mmol) και το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα και νερό και η οργανική φάση αφού σελλεχθεί πλένεται με brine και ξηραίνεται με MgSO_4 . Αφού απομακρυνθεί ο διαλύτης με κενό, στο υπόλειμμα πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης με έκλουσης το σύστημα *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 2:1 οπότε παραλαμβάνεται η ένωση **41** ως παχύρευστο έλαιο σε απόδοση 94%.

IR (KBr): 2111 (N_3) cm^{-1}

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3):

δ 5.82 (d, 1H, $J = 3.6$ Hz, H-1'), 4.74 (t, 1H, $J = 4.4$ Hz, H-2'), 4.44-4.39 (m, 1H, H-4'), 4.15-4.26 (m, 2H, H-5'), 3.35 (dd, 1H, $J = 4.6, 9.2$ Hz, H-3'), 2.10 (s, 3H, OAc), 1.58 (s, 3H, CH_3), 1.37 (s, 3H, CH_3).

III.β.10. Σύνθεση της 1,2,5-τρις-*O*-ακετυλο-3-αζιδο-3-δεοξυ-*D*-ριβοφουρανόζης (42) (Gao et al. 2012)

Διάλυμα της 5-*O*-ακετυλο-3-αζιδο-3-δεοξυ-1,2-*O*-ισοπροπυλιδενο- β -*D*-ριβοφουρανόζης (Gao et al. 2012) (6.84 mmol) σε μυρμηγκικό οξύ 85% (30 mL) αναδεύτηκε για περίπου 2 ώρες και στη συνέχεια ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το διάλυμα επαναδιαλύεται σε πυριδίνη (20 mL) και οξικό ανυδρίτη (88.9 mmol) και αφήνεται υπό ανάδευση για άλλες περίπου 12 ώρες. Στη συνέχεια πραγματοποιείται εκχύλιση με EtOAc και νερό κι η οργανική φάση, συλλέγεται και ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου Na₂SO₄ και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 2:1 οπότε το επιθυμητό προϊόν παραλαμβάνεται ως έλαιο σε απόδοση 84%.

IR (KBr): 2114 (N₃) cm⁻¹

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ 6.14 (d, 1H, $J = 3.5$ Hz, H-1'), 5.34 (dd, 1H, $J = 4.8, 9.5$ Hz, H-2'), 4.34-4.22 (m, 4H, H-3'-H-5'), 2.18, 2.11, 2.08 (3s, 9H, 3OAc)

III.β.9. Σύνθεση των ριβοφουρανονουκλεοζιτών 43a-c, 47a,b

1-(2',5'-Δις-*O*-ακετυλο-3'-αζιδο-3'-δεοξυ- β -*D*-ριβοφουρανοζυλο)ουρακίλη (43a)

Σε διάλυμα εμπορικά διαθέσιμης ουρακίλης (6.97 mmol) σε άνυδρο CH₃CN (28 mL) προστίθενται HMDS (8.64 mmol, 1.24 eq) και σακχαρίνη (0.32 mmol, 0.046 eq) και το προκύπτον εναιώρημα αναδεύεται στους 120 °C με κάθετο ψυκτήρα για 30 min. Αφότου το μίγμα γίνει διαυγές, προστίθενται το αζιδοσάκχαρο **42** (5.36 mmol) και καταλύτης Me₃SiOSO₂CF₃ (7.50 mmol, 1.40 eq) και το μίγμα αναδεύεται υπό ατμόσφαιρα αζώτου, στους 120 °C έως το πέρας της αντίδρασης (TLC *n*-Hexane/EtOAc 5:5). Στη συνέχεια το μίγμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου, εξουδετερώνεται με κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃ και εκχυλίζεται με CH₂Cl₂. Η οργανική φάση στη συνέχεια ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄ και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται στη συνέχεια με

χρωματογραφία στήλης και διαλύτη έκλουσης το σύστημα *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας (5:5), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν με τη μορφή λευκού αφρώδους στερεού σε απόδοση 71%. $R_f = 0.25$ (*n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 5:5).

$$[\alpha]_D^{22} = +26^\circ (c = 0.20, \text{CHCl}_3)$$

$$\lambda_{\text{max}} 257 \text{ nm } (\epsilon 5705)$$

$$\text{ESIMS } m/z: 354.11 (\text{M}+\text{H}^+)$$

Στοιχειακή Ανάλυση: ($\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_7$) C, H, N

Υπολ. (%): C: 44.20 H: 4.28 N: 19.82

Ευρ. (%): C: 43.89 H: 4.40 N: 19.67

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

δ 8.17 (br s, 1H, NH), 7.29 (d, 1H, $J_{5,6} = 7.9$ Hz, H-6), 5.75 (d, 1H, H-5), 5.73 (d, 1H, $J_{1',2'} = 3.5$ Hz, H-1'), 5.49 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 5.8$ Hz, H-2'), 4.27 (t, 1H, $J = 6.4$ Hz, H-3'), 4.42-4.32 (m, 2H, H-4', H-5a'), 4.30-4.10 (m, 1H, H-5b'), 2.20, 2.14 (2s, 6H, 2OAc).

1-(2',5'-Δις-Ο-ακετυλο-3'-αζιδο-3'-δεοξυ-β-D-ριβοφουρανοζυλο)θυμίνη (43b)

Ο νουκλεοζίτης της θυμίνης συντίθεται από το σάκχαρο **42** με την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **43a**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας (5:5), οπότε και λαμβάνεται η ένωση **43b** ως λευκό αφρώδες στερεό σε απόδοση 60%. $R_f = 0.39$ (*n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 5:5).

$$[\alpha]_D^{22} = -6^\circ (c = 0.20, \text{CHCl}_3)$$

$$\lambda_{\text{max}} 263 \text{ nm } (\epsilon 17143)$$

$$\text{ESIMS } m/z: 368.14 (\text{M}+\text{H}^+)$$

Στοιχειακή Ανάλυση: ($\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_7$) C, H, N

Υπολ. (%): C: 45.78 H: 4.66 N: 19.07

Ευρ. (%): C: 45.68 H: 4.78 N: 18.72

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ 8.18 (br s, 1H, NH), 7.10 (s, 1H, H-6), 5.72 (d, 1H, $J_{1',2'} = 3.7$ Hz, H-1'), 5.66-5.64 (m, 1H, H-3'), 5.48 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 5.8$ Hz, H-2'), 4.17-4.08 (m, 3H, H-4', H-5'), 2.20, 2.15 (2s, 6H, 2OAc), 1.93 (s, 3H, CH₃).

1-(2',5'-Δις-Ο-ακετυλο-3'-αζιδο-3'-δεοξυ-β-D-ριβοφουρανοζυλο)5-φθοροουρακίλη (43c)

Η ένωση **43c** συντίθεται με την ίδια ακριβώς πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για το νουκλεοζίτη **43a**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας (5:5), οπότε και λαμβάνεται η ένωση **43c** ως λευκό αφρώδες στερεό σε απόδοση 65%. Rf = 0.43 (*n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 5:5)

$[\alpha]_D^{22} = +20^\circ$ ($c = 0.20$, CHCl₃)

λ_{\max} 265 nm (ϵ 8986)

ESIMS m/z: 372.13 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₃H₁₄FN₅O₇) C, H, N

Υπολ. (%): C: 42.05 H: 3.80 N: 18.86

Ευρ. (%): C: 42.17 H: 3.64 N: 18.67

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ 8.74 (br s, 1H, NH), 7.55 (d, 1H, $J_{6,F} = 6.0$ Hz, H-6) 5.85 (d, 1H, $J_{1',2'} = 3.6$ Hz, H-1'), 5.44 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 5.2$ Hz, H-2'), 4.40-4.37 (m, 2H, H-3', H-4'), 4.24-4.16 (m, 2H, H-5'), 2.20, 2.17 (2s, 6H, 2OAc).

1-(2',5'-Δις-Ο-ακετυλο-3'-αζιδο-3'-δεοξυ-β-D-ριβοφουρανοζυλο)N⁶-βενζοϊλοαδενίνη (47a)

Ο νουκλεοζίτης **47a** συντίθεται με την ίδια ακριβώς πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για το νουκλεοζίτη **43a**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας (5:5), οπότε και λαμβάνεται η ένωση **47a** ως κίτρινο αφρώδες στερεό με απόδοση 42%. Rf = 0.31 (*n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 8:2).

$[\alpha]_D^{22} = +12^\circ$ ($c = 0.20$, CHCl₃)

λ_{\max} 280 nm (ϵ 17323)

ESIMS m/z: 481.21 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₁H₂₀N₈O₆) C, H, N

Υπολ. (%): C: 52.50 H: 4.20 N: 23.32

Ευρ. (%): C: 52.34 H: 4.51 N: 23.72

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ 8.80 (br s, 1H, NH), 8.04, 8.02 (2s, 2H, H-2, H-8), 7.67-7.44 (m, 5H, Bz), 6.13 (d, 1H, $J_{1',2'} = 3.4$ Hz, H-1'), 6.04 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 5.7$ Hz, H-2'), 4.76 (t, 1H, $J = 6.4$ Hz, H-3'), 4.52-4.31 (m, 3H, H-4', H-5'), 2.20, 2.08 (2s, 6H, 2OAc).

1-(2',5'-Δις-Ο-ακετυλο-3'-αζιδο-3'-δεοξυ-β-D-ριβοφουρανοζυλο)N⁶-ακετυλοαδενίνη (47b)

Η ένωση **47b** συντίθεται με την ίδια ακριβώς πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για το νουκλεοζίτη **43a**. Όμοια, το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα *n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας (5:5), οπότε και λαμβάνεται η ένωση **47b** ως κίτρινο αφρώδες στερεό (52% απόδοση). Rf = 0.25 (*n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 6:4).

$[\alpha]_D^{22} = +2^\circ$ ($c = 0.20$, CHCl₃)

λ_{\max} 263 nm (ϵ 18636)

ESIMS m/z: 419.21 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₆H₁₈N₈O₆) C, H, N

Υπολ. (%): C: 45.93 H: 4.34 N: 26.78

Ευρ. (%): C: 45.78 H: 4.74 N: 26.43

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 10.85 (br s, 1H, NH), 8.69, 8.64 (2s, 2H, H-2, H-8), 6.18 (d, 1H, $J_{1',2'} = 3.4$ Hz, H-1'), 6.03 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 5.7$ Hz, H-2'), 4.90 (t, 1H, $J = 6.9$ Hz, H-3'), 4.43-4.36 (m, 3H, H-4', H-5'), 2.25, 2.14, 1.98 (3s, 9H, 3OAc).

III.β.10. Σύνθεση της *N*-9-προπάργυλο αδενίνης (44) και της *N*-1-προπάργυλο 4-ακετυλοκυτοσίνης (48) (Lazrek et al. 2001; Lindsell et al. 2000)

N-9-Προπάργυλο αδενίνη (44)

Η ένωση **44** συντέθηκε από την αδενίνη με την ίδια μέθοδο που περιγράφηκε για τις ενώσεις **30a-e**. Το προϊόν λαμβάνεται ως λευκό στερεό ύστερα από χρωματογραφία στήλης σε απόδοση 81%. Σημείο Τήξεως 210-212 °C (dec). $R_f = 0.30$ (*n*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 8.5:1.5).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 8.17, 7.20 (2s, 2H, H-2, H-8), 5.01 (d, 2H, $J = 2.5$ Hz, CH₂), 3.42 (t, 1H, $J = 2.5$ Hz, CH).

N-1-Προπαργυλο 4-ακετυλοκυτοσίνη (48)

Η ένωση **48** συντέθηκε από την ακετυλοκυτοσίνη με την ίδια μέθοδο που περιγράφηκε για τις ενώσεις **30a-e**. Το προϊόν λαμβάνεται ως λευκό στερεό ύστερα από χρωματογραφία στήλης σε απόδοση 62%.

Σημείο Τήξεως 224-226 °C. $R_f = 0.20$ (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 8:2).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 10.80 (br s, 1H, NH), 8.14 (d, 1H, $J = 7.3$ Hz), 7.19 (d, 1H, $J = \square 7.3$ Hz), 4.64 (d, 2H, $J = 2.3$ Hz, CH₂), 3.41 (t, 1H, $J = 2.3$ Hz, CH), 2.11 (s, 3H, CH₃).

III.β.11. Σύνθεση των προστατευμένων δικέφαλων νουκλεοζιτών **45a-c**, **49a-c** και **51a,b**

1-[2',5'-Δις-Ο-ακετυλο-3'-[4-[(αδενιν-9-υλο)μεθυλο]-1,2,3-τριαζολ-1-υλο]-β-D-ριβοφουρανοζυλο]ουρακίλη (45a)

Σε διάλυμα του άξιδο νουκλεοζίτη της ουρακίλης **43a** (6.60 mmol) και της προπάργυλο αδενίνης (**44**) (7.60 mmol) σε THF (41.6 mL) προστίθενται 41.6 mL H₂O στα οποία έχουν διαλυθεί καταλυτικές ποσότητες ασκορβικού νατρίου (3.50 mmol) και CuSO₄·5H₂O (0.84 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση με κάθετο ψυκτήρα για 3 h και στη συνέχεια ψύχεται. Στο διάλυμα προστίθεται MeOH και οι διαλύτες κατόπιν απομακρύνονται υπό κενό. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης, χρησιμοποιώντας ως διαλύτες έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη (7:3), οπότε λήφθηκε ο δικέφαλος νουκλεοζίτης **45a** ως λευκό αφρώδες στερεό σε απόδοση 56%. R_f = 0.30 (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 7:3).

$[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -2^{\circ}$ ($c = 0.20$, DMSO)

λ_{max} 260 nm (ϵ 12030)

ESIMS m/z: 527.22 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₁H₂₂N₁₀O₇) C, H, N

Υπολ. (%): C: 47.91 H: 4.21 N: 26.61

Ευρ. (%): C: 47.79 H: 4.42 N: 26.95

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 11.37 (br s, 1H, NH Ur), 8.18, 8.16, 8.15 (3s, 3H, H-2 Ade, H-8 Ade, H-triazole), 7.76 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.4$ Hz, H-6 Ur), 7.11 (br s, 2H, NH₂ Ade), 6.06 (d, 1H, $J_{1',2'} = 3.9$ Hz, H-1'), 5.72 (d, 1H, H-5 Ur), 5.67-5.56 (m, 2H, H-2', H-3'), 5.47 (s, 2H, CH₂), 4.94-4.86 (m, 1H, H-4'), 4.34-4.23 (m, 2H, H-5'), 1.97, 1.64 (2s, 6H, 2OAc).

1-[2',5'-Δις-Ο-ακετυλο-3'-[4-{(αδενιν-9-υλο)μεθυλο]-1,2,3-τριαζολ-1-υλο]-β-D-ριβοφουρανοζυλο]θυμίνη (45b)

Σε διάλυμα του άζιδο νουκλεοζίτη της θυμίνης **43b** και της προπάργυλο αδενίνης (**44**) πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία που περιγράφεται για το δικέφαλο νουκλεοζίτη **45a**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης, χρησιμοποιώντας ως διαλύτες έκλουσης το σύστημα EtOAc/MeOH (7:3), οπότε λήφθηκε ο επιθυμητός νουκλεοζίτης **45b** ως λευκό αφρώδες στερεό και απόδοση 55%. Rf = 0.33 (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 7:3).

$[\alpha]_D^{22} = -22^\circ$ ($c = 0.20$, DMSO)

λ_{\max} 261 nm (ϵ 5095)

ESIMS m/z: 541.26 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₂H₂₄N₁₀O₇) C, H, N

Υπολ. (%): C: 48.89 H: 4.48 N: 25.91

Ευρ. (%): C: 49.05 H: 4.20 N: 26.06

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 11.35 (br s, 1H, NH Thy), 8.18, 8.16, 8.15 (3s, 3H, H-2 Ade, H-8 Ade, H-triazole), 7.61 (s, 1H, H-6 Thy), 7.11 (br s, 2H, NH₂ Ade), 6.08 (d, 1H, $J_{1',2'} = 4.6$ Hz, H-1'), 5.65 (t, 1H, $J = 7.2$ Hz, H-3'), 5.56 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 7.2$ Hz, H-2'), 5.48 (s, 2H, CH₂), 4.92-4.84 (m, 1H, H-4'), 4.32 (dd, 1H, $J_{5a',5b'} = 12.3$ Hz, $J_{4',5a'} = 3.8$ Hz, H-5a'), 4.24 (dd, 1H, $J_{4',5b'} = 5.1$ Hz, H-5b'), 1.97, 1.81 (2s, 6H, 2OAc), 1.63 (s, 3H, CH₃ Thy).

1-[2',5'-Δις-Ο-ακετυλο-3'-[4-{(αδενιν-9-υλο)μεθυλο]-1,2,3-τριαζολ-1-υλο]-β-D-ριβοφουρανοζυλο]5-φθοροουρακίλη (45c)

Σε διάλυμα του άζιδο νουκλεοζίτη της 5-φθοροουρακίλης **43c** και της προπάργυλο αδενίνης (**44**) πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία που περιγράφεται για το δικέφαλο νουκλεοζίτη **45a**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης, χρησιμοποιώντας ως διαλύτες έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη

(7:3), οπότε λήφθηκε ο επιθυμητός νουκλεοζίτης **45c** ως λευκό αφρώδες στερεό και απόδοση 61%. Rf = 0.38 (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 7:3).

$[\alpha]_D^{22} = +2^\circ$ ($c = 0.20$, DMSO)

λ_{\max} 284 nm (ϵ 3980)

ESIMS m/z: 545.13 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₁H₂₁FN₁₀O₇) C, H, N

Υπολ. (%): C: 46.33 H: 3.89 N: 25.73

Ευρ. (%): C: 46.08 H: 3.76 N: 26.09

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 8.20-8.12 (m, 4H, H-2 Ade, H-8 Ade, H-triazole, H-6 FUr), 7.25 (br s, 2H, NH₂ Ade), 6.08 (d, 1H, $J_{1',2'} = 4.1$ Hz, H-1'), 5.61 (t, 1H, $J = 7.2$ Hz, H-3'), 5.55 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 7.1$ Hz, H-2'), 5.46 (s, 2H, CH₂), 4.91-4.84 (m, 1H, H-4'), 4.30 (dd, 1H, $J_{5a',5b'} = 12.7$ Hz, $J_{4',5a'} = 3.8$ Hz, H-5a'), 4.25 (dd, 1H, $J_{4',5b'} = 5.5$ Hz, H-5b'), 1.96, 1.60 (2s, 6H, 2OAc).

9-[2',5'-Δις-Ο-ακετυλο-3'-[4'-(ουρακίλ-1-υλο)μεθυλο]-1,2,3-τριαζολ-1-υλο]-β-D-ριβοφουρανοζυλο]N⁶-βενζοϋλοαδενίνη (49a)

Σε διάλυμα του άζιδο νουκλεοζίτη της N⁶-βενζοϋλοαδενίνης **47a** και της προπάργυλο ουρακίλης **30a** πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία που περιγράφεται για το δικέφαλο νουκλεοζίτη **45a**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης, χρησιμοποιώντας ως διαλύτες έκλουσης το σύστημα EtOAc/MeOH (8:2), οπότε λήφθηκε ο επιθυμητός νουκλεοζίτης **49a** ως λευκό αφρώδες στερεό και απόδοση και απόδοση 57%. Rf = 0.29 (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 8:2).

$[\alpha]_D^{22} = -2^\circ$ ($c = 0.20$, DMSO)

λ_{\max} 273 nm (ϵ 55838)

ESIMS m/z: 631.14 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₈H₂₆N₁₀O₈) C, H, N

Υπολ. (%): C: 53.33 H: 4.16 N: 22.21

Ευρ. (%): C: 52.95 H: 4.33 N: 22.02

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 11.22 (br s, 1H, NH Ur), 8.81, 8.74, 8.25 (3s, 3H, H-2 BzAde, H-8 BzAde, H-triazole), 8.05 (d, 2H, *J* = 7.1 Hz, Bz), 7.95 (br s, 1H, NH BzAde), 7.76 (d, 1H, *J*_{5,6} = 7.9 Hz, H-6 Ur), 7.64 (t, 1H, *J* = 7.1 Hz, Bz), 7.56 (t, 2H, *J* = 7.1 Hz, Bz), 6.54 (d, 1H, *J*_{1',2'} = 4.5 Hz, H-1'), 6.19 (dd, 1H, *J*_{2',3'} = 6.7 Hz, H-2'), 6.04 (t, 1H, *J* = 6.6 Hz, H-3'), 5.60 (d, 1H, H-5 Ur), 5.13-5.04 (m, 1H, H-4'), 5.00 (s, 2H, CH₂), 4.44 (dd, 1H, *J*_{5a',5b'} = 12.3 Hz, *J*_{4',5a'} = 3.7 Hz, H-5a'), 4.30 (dd, 1H, *J*_{4',5b'} = 5.4 Hz, H-5b'), 1.96, 1.81 (2s, 6H, 2OAc).

***9*-[2',5'-Δις-*O*-ακετυλο-3'-[4-[(θυμιν-1-υλο)μεθυλο]-1,2,3-τριαζολ-1-υλο]-β-*D*-ριβοφουρανοζυλο]N⁶-βενζοϋλοαδενίνη (49b)**

Σε διάλυμα του άζιδο νουκλεοζίτη της N⁶-βενζοϋλοαδενίνης **47a** και της προπάργυλο θυμίνης (**30b**) πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του δικέφαλου νουκλεοζίτη **45a**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης, χρησιμοποιώντας ως διαλύτες έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη (8:2), οπότε λήφθηκε ο επιθυμητός νουκλεοζίτης **49b** ως λευκό αφρώδες στερεό και σε απόδοση 48%. R_f = 0.36 (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 8:2).

[α]_D²² = -2° (*c* = 0.20, DMSO)

λ_{max} 269 nm (ε 9003)

ESIMS *m/z*: 645.16 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₉H₂₈N₁₀O₈) C, H, N

Υπολ. (%): C: 54.04 H: 4.38 N: 21.73

Ευρ. (%): C: 54.41 H: 4.19 N: 22.13

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 11.26 (br s, 1H, NH Thy), 8.82, 8.74, 8.25 (3s, 3H, H-2 BzAde, H-8 BzAde, H-triazole), 8.05 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz, Bz), 7.69-7.53 (m, 5H, NH BzAde, H-6 Thy, Bz), 6.54 (d, 1H, *J*_{1',2'} = 4.2 Hz, H-1'), 6.40 (dd, 1H, *J*_{2',3'} = 6.4 Hz, H-2'), 6.03 (t, 1H, *J* = 6.7 Hz, H-3'), 5.11-5.04 (m, 1H, H-4'), 4.96 (s, 2H, CH₂), 4.43 (dd, 1H, *J*_{5a',5b'} = 12.6 Hz, *J*_{4',5a'} = 3.1 Hz, H-5a'), 4.31 (dd, 1H, *J*_{4',5b'} = 5.0 Hz, H-5b'), 1.96, 1.80, 1.77 (3s, 9H, 2OAc, CH₃ Thy).

9-[2',5'-Δις-Ο-ακετυλο-3'-[4-{(N⁴-ακετυλοκυτοσιν-1-υλο)μεθυλο]-1,2,3-τριαζολ-1-υλο]-β-D-ριβοφουρανοζυλο]N⁶-βενζοϋλοαδενίνη (49c)

Σε διάλυμα του άζιδο νουκλεοζίτη της N⁶-βενζοϋλοαδενίνης **47a** και της προπάργυλο N⁴-ακετυλοκυτοσίνης **48** πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία που περιγράφεται για το δικέφαλο νουκλεοζίτη **45a**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης, χρησιμοποιώντας ως διαλύτες έκλυσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη (7:3), οπότε λαμβάνεται ο επιθυμητός νουκλεοζίτης **49c** ως λευκό αφρώδες στερεό (απόδοση 57%). R_f = 0.12 (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 7:3).

[α]_D²² = -39° (*c* = 0.20, DMSO)

λ_{max} 269 nm (ε 9215)

ESIMS *m/z*: 672.18 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₃₀H₂₉N₁₁O₈) C, H, N

Υπολ. (%): C: 53.65 H: 4.35 N: 22.94

Ευρ. (%): C: 53.45 H: 4.46 N: 22.69

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 11.19 (br s, 1H, NH BzAde), 10.78 (br s, 1H, NH AcCyt), 8.81, 8.84, 8.25 (3s, 3H, H-2 BzAde, H-8 BzAde, H-triazole), 8.22 (d, 1H, $J_{5,6} = 7.2$ Hz, H-6 AcCyt), 8.05 (d, 2H, $J = 7.4$ Hz, Bz), 7.64 (t, 1H, $J = 7.4$ Hz, Bz), 7.70 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz, Bz), 7.18 (d, 1H, H-5 AcCyt), 6.54 (d, 1H, $J_{1',2'} = 4.4$ Hz, H-1'), 6.19 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 6.2$ Hz, H-2'), 6.03 (t, 1H, $J = 6.8$ Hz, H-3'), 5.12 (s, 2H, CH₂), 4.47-4.39 (m, 1H, H-4'), 4.44 (dd, 1H, $J_{5a',5b'} = 12.2$ Hz, $J_{4',5a'} = 3.7$ Hz, H-5a'), 4.31 (dd, 1H, $J_{4',5b'} = 5.1$ Hz, H-5b'), 2.09, 1.96, 1.79 (3s, 9H, 3OAc).

9-[2',5'-Δις-Ο-ακετυλο-3'-[4-{(ουρακίλ-1-υλο)μεθυλο}-1,2,3-τριαζολ-1-υλο]-β-D-ριβοφουρανοζυλο]N⁶-ακετυλοαδενίνη (51a)

Σε διάλυμα του άξιδο νουκλεοζίτητης N⁶-ακετυλοαδενίνης **47b** και της προπάργυλο ουρακίλης **30a** πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία που περιγράφεται για το δικέφαλο νουκλεοζίτη **45a**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης, χρησιμοποιώντας ως διαλύτες έκλυσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη (7:3) οπότε και λαμβάνεται η ένωση **51a** υπό τη μορφή λευκού αφρώδους στερεού (απόδοση 47%). R_f = 0.38 (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 7:3).

$[\alpha]_D^{22} = -6^\circ$ ($c = 0.20$, DMSO)

$\lambda_{\max} 276$ nm ($\epsilon 51026$)

ESIMS m/z: 569.21 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₃H₂₄N₁₀O₈) C, H, N

Υπολ. (%): C: 48.59 H: 4.26 N: 24.64

Ευρ. (%): C: 48.29 H: 4.02 N: 24.49

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 11.23 (br s, 1H, NH Ur), 10.63 (br s, 1H, NH AcAde), 8.70, 8.23, 8.20 (3s, 3H, H-2 AcAde, H-8 AcAde, H-triazole), 7.74 (d, 1H, *J*_{5,6} = 7.6 Hz, H-6 Ur), 6.50 (d, 1H, *J*_{1',2'} = 4.3 Hz, H-1'), 6.19-6.09 (m, 1H, H-2'), 6.00 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz, H-3'), 5.59 (d, 1H, H-5 Ur), 5.12-5.02 (m, 1H, H-4'), 4.99 (s, 2H, CH₂), 4.47-4.26 (m, 2H, H-5'), 2.27, 1.94, 1.79 (3s, 9H, 3OAc).

***9*-[2',5'-Δις-*O*-ακετυλο-3'-[4-[(θυμιν-1-υλο)μεθυλο]-1,2,3-τριαζολ-1-υλο]-β-*D*-ριβοφουρανοζυλο]N⁶-ακετυλοαδενίνη (**51b**)**

Σε διάλυμα του άξιδο νουκλεοζιτιτης N⁶-ακετυλοαδενίνης **47b** και της προπάργυλο θυμίνης **30b** πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία που περιγράφεται για το δικέφαλο νουκλεοζίτη **45a**. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης, χρησιμοποιώντας ως διαλύτες έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη (7:3). Το επιθυμητό προϊόν **51b** λαμβάνεται ως λευκό αφρώδες στερεό και με απόδοση 54%. R_f = 0.21 (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 7:3).

[α]_D²² = -6° (*c* = 0.20, DMSO)

λ_{max} 272 nm (ε 51784)

ESIMS *m/z*: 583.25 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₄H₂₆N₁₀O₈) C, H, N

Υπολ. (%): C: 49.48 H: 4.50 N: 24.04

Ευρ. (%): C: 49.58 H: 4.39 N: 24.24

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6):

δ 11.22 (br s, 1H, NH Thy), 8.70 (br s, 1H, NH AcAde), 8.38, 8.21, 8.20 (3s, 3H, H-2 AcAde, H-8 AcAde, H-triazole), 7.60 (s, 1H, H-6 Thy), 6.34 (d, 1H, $J_{1',2'} = 4.1$ Hz, H-1'), 6.15-6.10 (m, 1H, H-2'), 6.02 (t, 1H, $J = 6.7$ Hz, H-3'), 5.00-4.98 (m, 1H, H-4'), 4.95 (s, 2H, CH₂), 4.41 (dd, 1H, $J_{5a',5b'} = 12.0$ Hz, $J_{4',5a'} = 3.2$ Hz, H-5a'), 4.27 (dd, 1H, $J_{4',5b'} = 4.9$ Hz, H-5b'), 1.93, 1.78, 1.76 (3s, 12H, 3OAc, CH₃ Thy).

III.β.12. Σύνθεση των αποπροστατευμένων δικέφαλων νουκλεοζιτών **46a-c**, **50a-c** και **52a,b**

1-[3'-[4-[(Αδεριν-9-υλο)μεθυλο]-1,2,3-τριαζολ-1-υλο]-β-D-ριβοφουρανοζυλο]ουρακίλη (46a)

Διάλυμα του προστατευμένου δικέφαλου νουκλεοζίτη της ουρακίλης **45a** (1.00 mmol) σε μεθανολική αμμωνία (κορεσμένη στους 0 °C, 27.9 mL) αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h. Ο διαλύτης στη συνέχεια απομακρύνεται υπό κενό οπότε λαμβάνεται ο τελικός νουκλεοζίτης **46a** σε απόδοση 61%. R_f = 0.36 (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 5:5).

$[\alpha]_D^{22} = +12^\circ$ ($c = 0.20$, DMSO)

λ_{max} 278 nm (ϵ 25310)

ESIMS m/z: 443.18 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₇H₁₈N₁₀O₅) C, H, N

Υπολ. (%): C: 46.15 H: 4.10 N: 31.66

Ευρ. (%): C: 45.77 H: 3.82 N: 31.31

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6):

δ 8.36 (d, 1H, $J_{5,6} = 7.3$ Hz, H-6 Ur), 8.17, 8.14 (2s, 3H, H-2 Ade, H-8 Ade, H-triazole), 7.12 (br s, 2H, NH_2 Ade), 6.58, 5.97 (2br s, 2H, 2OH), 5.90 (d, 1H, $J_{1',2'} = 3.7$ Hz, H-1'), 5.47 (s, 2H, CH_2), 5.42 (d, 1H, H-5 Ur), 5.18 (t, 1H, $J = 6.3$ Hz, H-3'), 4.69-4.64 (m, 1H, H-2'), 4.51-4.44 (m, 1H, H-4'), 3.81-3.53 (m, 2H, H-5').

^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO- d_6):

δ 164.1, 155.9, 152.4, 151.0, 150.1, 142.8, 141.7, 140.8, 122.9, 119.3, 102.6, 91.2, 68.7, 63.3, 56.4, 55.2.

1-[3'-[4-[(Αδενιν-9-ολο)μεθυλο]-1,2,3-τριαζολ-1-ολο]-β-D-ριβοφουρανοζυλο]θυμίνη (46b)

Ο τελικός δικέφαλος νουκλεοζίτης της θυμίνης **46b** παραλαμβάνεται από το προστατευμένο ανάλογο **45b** με την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε για το νουκλεοζίτη **46a**. Λευκό αφρώδες στερεό, απόδοση 78%; Rf = 0.41 (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 5:5).

$[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -2^\circ$ ($c = 0.20$, DMSO)

λ_{max} 277 nm (ϵ 6358)

ESIMS m/z: 457.24 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Στοιχειακή Ανάλυση: ($\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_{10}\text{O}_5$) C, H, N

Υπολ. (%): C: 47.37 H: 4.42 N: 30.69

Ευρ. (%): C: 47.08 H: 4.24 N: 30.95

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6):

δ 8.17, 8.16, 8.14 (3s, 3H, H-2 Ade, H-8 Ade, H-triazole), 7.81 (s, 1H, H-6 Thy), 7.06 (br s, 2H, NH₂ Ade), 6.51 (br s, 1H, OH), 5.94 (d, 1H, $J_{1',2'} = 4.9$ Hz, H-1'), 5.87 (br s, 1H, OH), 5.46 (s, 2H, CH₂), 5.19 (t, 1H, $J = 6.2$ Hz, H-3'), 4.64-4.60 (m, 1H, H-2'), 4.52-4.46 (m, 1H, H-4'), 3.73 (dd, 1H, $J_{5a',5b'} = 12.6$ Hz, $J_{4',5a'} = 3.3$ Hz, H-5a'), 3.58 (dd, 1H, $J_{4',5b'} = 2.8$ Hz, H-5b'). 1.77 (s, 3H, CH₃ Thy).

^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO- d_6):

δ 163.4, 155.7, 152.3, 151.8, 150.0, 142.4, 141.0, 136.7, 123.4, 120.1, 111.2, 93.3, 70.0, 62.4, 56.8, 55.7, 16.1.

1-[3'-[4-[(Αδεριν-9-υλο)μεθυλο]-1,2,3-τριαζολ-1-υλο]-β-D-ριβοφουρανοζυλο]5-φθοροουρακίλη (46c)

Ο τελικός δικέφαλος νουκλεοζίτης της 5-φθοροουρακίλης **46c** παραλαμβάνεται από το προστατευμένο ανάλογο **45c** με την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε για το νουκλεοζίτη **46a** Λευκό αφρώδες στερεό, απόδοση 72%; Rf = 0.45 (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 5:5).

$[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +2^\circ$ ($c = 0.20$, DMSO)

λ_{max} 277nm (ϵ 6103)

ESIMS m/z: 461.17 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₇H₁₇FN₁₀O₅) C, H, N

Υπολ. (%): C: 44.35 H: 3.72 N: 30.42

Ευρ. (%): C: 44.62 H: 3.88 N: 30.27

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6):

δ 8.36 (d, 1H, $J_{6,\text{F5}} = 7.3$ Hz, H-6 FUr), 8.17, 8.13 (2s, 3H, H-2 Ade, H-8 Ade, H-triazole), 7.11 (br s, 2H, NH_2 Ade), 6.57, 5.97 (2br s, 2H, 2OH), 5.89 (d, 1H, $J_{1',2'} = 3.7$ Hz, H-1'), 5.46 (s, 2H, CH_2), 5.17 (t, 1H, $J = 6.2$ Hz, H-3'), 4.68-4.64 (m, 1H, H-2'), 4.50-4.43 (m, 1H, H-4'), 3.78 (dd, 1H, $J_{5a',5b'} = 12.9$ Hz, $J_{4',5a'} = 3.3$ Hz, H-5a'), 3.57 (dd, 1H, $J_{4',5b'} = 2.7$ Hz, H-5b').

^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO- d_6):

δ 161.2, 156.7, 152.3, 151.1, 150.4, 143.8, 141.0, 140.9, 127.7, 123.4, 120.1, 92.1, 70.3, 63.2, 56.7, 55.4.

9-[3'-[4-[(Ουρακιλ-1-υλο)μεθυλο]-1,2,3-τριαζολ-1-υλο]-β-D-ριβοφουρανοζυλο]N⁶-βενζοϋλοαδενίνη (50a)

Ο τελικός δικέφαλος νουκλεοζίτης της N^6 -βενζοϋλοαδενίνης **50a** παραλαμβάνεται από το προστατευμένο ανάλογο **49a** με την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε για το νουκλεοζίτη **46a**. Λευκό αφρώδες στερεό, απόδοση 66%; Rf = 0.38 (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 5:3).

$[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -14^\circ$ ($c = 0.20$, DMSO)

$\lambda_{\text{max}} 273$ nm ($\epsilon 51779$)

ESIMS m/z: 547.16 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Στοιχειακή Ανάλυση: ($\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{N}_{10}\text{O}_6$) C, H, N

Υπολ. (%): C: 52.75 H: 4.06 N: 25.63

Ευρ. (%): C: 52.57 H: 3.89 N: 25.29

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6):

δ 8.43, 8.18, 8.16 (3s, H-2 BzAde, H-8 BzAde, H-triazole), 7.87 (d, 2H, $J = 7.0$ Hz, Bz), 7.77 (d, 1H, $J_{5,6} = 7.8$ Hz, H-6 Ur), 7.47-7.38 (m, 3H, Bz), 6.08 (d, 1H, $J_{1',2'} = 5.7$ Hz, H-1'), 5.73 (br s, 1H, OH), 5.61 (d, 1H, H-5 Ur), 5.41 (t, 1H, $J = 6.1$ Hz, H-3'), 5.08-4.97 (m, 1H, H-2'), 4.98 (s, 2H, CH₂), 4.76-4.72 (m, 2H, OH, H-4'), 3.79-3.60 (m, 2H, H-5').

^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO- d_6):

δ 165.6, 163.2, 152.3, 151.8, 151.0, 150.4, 143.5, 141.2, 140.9, 133.9, 132.6, 128.7, 127.1, 123.0, 120.2, 102.2, 91.7, 70.8, 64.5, 56.7, 50.4.

9-[3'-[4-{(Θυμιν-1-υλο)μεθυλο]-1,2,3-τριαζολ-1-υλο]-β-D-ριβοφουρανοζυλο]N⁶-βενζοϋλοαδενίνη (50b)

Ο τελικός δικέφαλος νουκλεοζίτης **50b** παραλαμβάνεται από το προστατευμένο ανάλογο **49b** με την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε για το νουκλεοζίτη **46a**. Λευκό αφρώδες στερεό, απόδοση 71%; R_f = 0.29 (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 5:5).

$[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -2^\circ$ ($c = 0.20$, DMSO)

λ_{max} 275 nm (ϵ 6824)

ESIMS m/z: 561.13 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₅H₂₄N₁₀O₆) C, H, N

Υπολ. (%): C: 53.57 H: 4.32 N: 24.99

Ευρ. (%): C: 53.74 H: 4.46 N: 24.87

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6):

δ 11.18 (br s, 1H, NH), 8.41, 8.17, 8.15 (3s, 3H, H-2 BzAde, H-8 BzAde, H-triazole), 7.87 (d, 2H, $J = 6.9$ Hz, Bz), 7.62 (s, 1H, H-6 Thy), 7.53-7.40 (m, 3H, Bz), 6.09 (d, 1H, $J_{1',2'} = 5.6$ Hz, H-1'), 5.99 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz, OH), 5.59 (br s, 1H, OH), 5.41 (t, 1H, $J = 6.1$ Hz, H-3'), 5.07-4.99 (m, 1H, H-2'), 4.95 (s, 2H, CH₂), 4.77-4.69 (m, 1H, H-4'), 3.78 (dd, 1H, $J_{5a',5b'} = 12.7$ Hz, $J_{4',5a'} = 4.0$ Hz, H-5a'), 3.63 (dd, 1H, $J_{4',5b'} = 5.4$ Hz, H-5b'), 1.77 (s, 3H, CH₃ Thy).

^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO- d_6):

δ 165.4, 163.7, 152.8, 151.1, 150.4, 150.0, 142.9, 141.1, 138.4, 135.6, 133.3, 129.0, 128.2, 122.8, 120.4, 111.1, 93.3, 70.0, 64.5, 56.7, 50.2, 16.3.

9-[3'-[4-[(Κυτοσιν-1-υλο)μεθυλο]-1,2,3-τριαζολ-1-υλο]-β-D-ριβοφουρανοζυλο]αδενίνη (50c)

Ο τελικός δικέφαλος νουκλεοζίτης **50c** παραλαμβάνεται από το προστατευμένο ανάλογο **49c** με την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε για το νουκλεοζίτη **46a**. Λευκό αφρώδες στερεό, απόδοση 71%; $R_f = 0.21$ (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 7:3).

$[\alpha]_D^{22} = -2^\circ$ ($c = 0.20$, DMSO)

λ_{\max} 278 nm (ϵ 10932)

ESIMS m/z : 444.17 ($M+H^+$)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₇H₂₁N₁₁O₄) C, H, N

Υπολ. (%): C: 46.05 H: 4.77 N: 34.75

Ευρ. (%): C: 45.65 H: 4.63 N: 34.87

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6):

δ 8.41, 8.16, 8.08 (3s, 3H, H-2 Ade, H-8 Ade, H-triazole), 7.69 (d, 1H, $J_{5,6} = 7.2$ Hz, H-6 Cyt), 7.33 (br s, 2H, NH_2 Cyt), 6.99 (br s, 2H, NH_2 Ade), 6.08 (d, 1H, $J_{1',2'} = 5.7$ Hz, H-1'), 6.00 (br s, 1H, OH), 5.68 (d, 1H, H-5 Cyt), 5.66 (br s, 1H, OH), 5.40 (t, 1H, $J = 6.2$ Hz, H-3'), 5.02 (t, 1H, H-2'), 4.93 (s, 2H, CH_2), 4.73-4.68 (m, 1H, H-4'), 3.79-3.58 (m, 2H, H-5').

^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO- d_6):

δ 164.9, 157.2, 155.8, 152.4, 150.3, 142.5, 140.8, 138.7, 122.1, 119.9, 99.2, 95.3, 70.1, 64.1, 62.9, 56.3.

9-[3'-[4-[(Οουρακιλ-1-υλο)μεθυλο]-1,2,3-τριαζολ-1-υλο]-β-D-ριβοφουρανοζυλο]αδερίνη (52a)

Ο τελικός δικέφαλος νουκλεοζίτης **52a** παραλαμβάνεται από το προστατευμένο ανάλογο **51a** με την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε για το νουκλεοζίτη **46a**. Λευκό αφρώδες στερεό, απόδοση 63%; $R_f = 0.25$ (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 7:3).

$[\alpha]_D^{22} = +12^\circ$ ($c = 0.20$, DMSO)

$\lambda_{\text{max}} 278 \text{ nm}$ ($\epsilon 10774$)

ESIMS m/z : 443.10 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Στοιχειακή Ανάλυση: ($\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_{10}\text{O}_5$) C, H, N

Υπολ. (%): C: 46.15 H: 4.10 N: 31.66

Ευρ. (%): C: 46.35 H: 3.92 N: 31.41

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 11.23 (br s, 1H, NH), 8.41, 8.16 (2s, 3H, H-2 Ade, H-8 Ade, H-triazole), 7.74 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.4$ Hz, H-6 Ur), 7.29 (s, 2H, NH₂ Ade), 6.58 (br s, 1H, OH), 6.09 (d, 1H, $J_{1',2'} = 5.3$ Hz, H-1'), 6.00 (br s, 1H, OH), 5.59 (d, 1H, H-5 Ur), 5.47-5.37 (m, 1H, H-3'), 5.11-5.00 (m, 1H, H-2'), 4.98 (s, 2H, CH₂), 4.77-4.68 (m, 1H, H-4'), 3.82-3.58 (m, 2H, H-5').

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 162.7, 157.3, 152.2, 150.9, 148.4, 143.5, 142.0, 140.6, 122.7, 120.1, 102.2, 92.5, 68.6, 63.6, 54.9, 48.0.

9-[3'-[4-[(Θυμιν-1-υλο)μεθυλο]-1,2,3-τριαζολ-1-υλο]-β-D-ριβοφουρανοζυλο]αδενίνη (52b)

Ο τελικός δικέφαλος νουκλεοζίτης **52b** παραλαμβάνεται από το προστατευμένο ανάλογο **51b** με την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε για το νουκλεοζίτη **46a**. Λευκό αφρώδες στερεό, απόδοση 66%; R_f = 0.23 (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 7:3).

$[\alpha]_D^{22} = +10^\circ$ ($c = 0.20$, DMSO)

λ_{\max} 278 nm (ϵ 18211)

ESIMS m/z: 457.20 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₁₈H₂₀N₁₀O₅) C, H, N

Υπολ. (%): C: 47.37 H: 4.42 N: 30.69

Ευρ. (%): C: 47.07 H: 4.56 N: 30.52

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6):

δ 11.25 (br s, 1H, NH), 8.43, 8.18, 8.16 (3s, 3H, H-2 Ade, H-8 Ade, H-triazole), 7.63 (s, 1H, H-6 Thy), 7.31 (s, 2H, NH₂ Ade), 6.10 (d, 1H, $J_{1,2'} = 5.3$ Hz, H-1'), 6.01, 5.62 (2br s, 2H, 2OH), 5.47-5.36 (m, 1H, H-3'), 5.09-4.99 (m, 1H, H-2'), 4.95 (s, 2H, CH₂), 4.75-4.70 (m, 1H, H-4'), 3.83-3.56 (m, 2H, H-5'), 1.25 (s, 3H, CH₃ Thy).

 ^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO- d_6):

δ 164.5, 157.3, 152.4, 150.1, 148.8, 143.6, 140.7, 136.4, 122.3, 120.0, 110.5, 93.1, 68.9, 63.2, 55.4, 50.4, 16.7.

IV. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε επιτυχώς η σύνθεση νέων γλυκοπυρανοζυλοαμιδικών και φουρανοζυλονουκλεοζιτικών αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και των ριβονουκλεασών παγκρεατική ριβονουκλεάση A (RNase A) και ηωσινοφιλική νευροτοξίνη (EDN), αντίστοιχα. Η προτεινόμενη συνθετική μεθοδολογία είχε ως κεντρικό άξονα τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό των νέων ενώσεων.

Συγκεκριμένα, επιτεύχθηκε η σύνθεση και η βιολογική αποτίμηση έξι γλυκοπυρανοζυλαμινών με διαφορετικούς υποκαταστάτες ως αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Τα νέα μόρια φάνηκε ότι αναστέλλουν το ένζυμο, συναγωνιστικά ως προς το υπόστρωμα (1-φωσφορική γλυκόζη), ενώ οι ισχυρότεροι αναστολείς εμφάνισαν σταθερές αναστολής (K_i) 4.98, 5.14 και 8.25 μM , αντίστοιχα. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, από τις γλυκοπυρανοζυλουρίες που συντέθηκαν και παρατηρήθηκε ότι αναστέλλουν επίσης την gmGPb συναγωνιστικά, το μεγαλύτερο μήκος του συνδέσμου NHCONHCO οδήγησε σε ελάττωση της σταθεράς αναστολής κατά το ήμισυ μόνο στη μία περίπτωση ($K_i = 4.98 \mu\text{M}$ και 2.53 μM , αντίστοιχα). Συνεπώς, το μήκος του συνδέσμου μεταξύ του σακχάρου και του υποκαταστάτη καθώς και ο βαθμός ελευθερίας του φαίνεται να διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο κατά την αναστολή. Όλα τα νέα ανάλογα επέδειξαν επιπλέον αντικαρκινική δράση έναντι των καρκινικών σειρών L1210, CEM και HeLa. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα ακετυλιωμένα ανάλογα φάνηκαν να έχουν καλύτερη αντικαρκινική δράση έναντι των αποπροστατευμένων αναλόγων τους ενώ κατά την αντική τους αξιολόγηση η *N*-(*S*)-3-(4-ισοπροπυλοφαινυλο)-2-μεθυλοπροπανούλο-*N'*-(2,3,4,6-τετρακίς-*O*-ακετυλο)- β -D-γλυκοπυρανοζυλουρία φάνηκε ότι αναστέλει τον πολλαπλασιασμό των ιών της παραγρίπης τύπου 3, καθώς και των ιών Sindbis και Coxsackie B4 σε καλλιέργεια κυττάρων Vero (IC_{50} 45-58 μM).

Επιπλέον επιτεύχθηκε η σύνθεση νέων τριαζολο ριβοφουρανοζυλο νουκλεοζιτών ως εν δυνάμει αναστολείς της RNase A με τη βοήθεια click χημείας. Η πορεία των αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε με γρήγορο και προβλεπόμενο τρόπο δίχως τη δημιουργία παραπροϊόντων και οι νέες ενώσεις έφεραν έναν τριαζολικό δακτύλιο στην 1'-θέση του σακχάρου ενώ στη θέση της βάσης βρισκόταν ουρακίλη, θυμίνη, 5-βρωμοουρακίλη, 5-χλωροουρακίλη και 5-φθοροουρακίλη, αντίστοιχα. Επίσης πραγματοποιήθηκε η σύνθεση των αντίστοιχων ουριδινών από τις οποίες απουσίαζε ο τριαζολικός δακτύλιος. Όλα τα ανάλογα αξιολογήθηκαν για την

ανασταλτική τους δράση έναντι στο ένζυμο RNase A. Ο καλύτερος τριαζολο αναστολέας υπήρξε η 1-[(β-D-ριβοφουρανοζυλο)-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]ουρακίλη, με σταθερά αναστολής K_i ίση με 1.6 μM όταν η αντίστοιχη ουριδίνη, από την οποία απουσίαζε ο τριαζολικός δακτύλιος, εμφάνισε τιμή ίση με 28.5 μM . Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι η απόσταση μεταξύ του σακχάρου και της βάσης του νουκλεοζίτη διαδραματίζει ρόλο στην ικανότητα αναστολής, ενώ η αντικατάσταση του υδρογόνου στην 5-θέση της ουρακίλης από αλογόνα, οδήγησε σε υψηλότερες μα απόλυτα σχετιζόμενες με το βάρος του αλογόνου τιμές σταθεράς αναστολής K_i . Από τους τριαζολο δικέφαλους νουκλεοζίτες, που συντέθηκαν και αξιολογήθηκαν στη συνέχεια έναντι του ενζύμου, τα ανάλογα που έφεραν την πυριμιδίνη σε απευθείας σύνδεση με τον τριαζολικό δακτύλιο εμφάνισαν καλύτερη ανασταλτική ικανότητα σε σχέση με εκείνα που έφεραν την πουρίνη σε σύνδεση με τον τριαζολικό δακτύλιο στην 3'-θέση. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει πως τόσο η ύπαρξη του τριαζολικού δακτυλίου στη δομή των νουκλεοζιτικών αυτών αναστολέων όσο και τμήμα της βάσης στη δομή του μορίου διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο για την εκλεκτικότητα των ενώσεων ως προς το ένζυμο. Οι ίδιοι αναστολείς αξιολογήθηκαν και για την ανασταλτική τους ικανότητά τους έναντι της EDN, που είναι ομόλογη της RNase A. Αξιοσημείωτο είναι ότι οι αναστολείς αυτοί, δεν έχουν όμοια ανασταλτική ικανότητα για την EDN όπως και για την RNase A ενώ η απόσταση μεταξύ του σακχάρου και της βάσης δε φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο για την ανασταλτική ικανότητα των ενώσεων όπως στην περίπτωση της RNase A. Τέλος, η παρουσία του τριαζολικού δακτυλίου στη δομή των ενώσεων βελτίωσε όσο και μείωσε την ανασταλτική τους ικανότητα. Γενικά, όλοι οι αναστολείς επέδειξαν καλύτερη ανασταλτική ικανότητα για την RNase A από ότι για την EDN, με εξαίρεση την 9-[3'-[4-[(κυτοσιν-1-υλο)μεθυλο]-1,2,3-τριαζολ-1-υλο]-β-D-ριβοφουρανοζυλο]αδενίνη. Η συγκεκριμένη ένωση, αποτελεί την πρώτη περίπτωση αναστολέα με καλύτερη ανασταλτική ικανότητα για την EDN από ότι για την RNase A, εφόσον εμφανίζει δραστικότητα περίπου δύο φορές καλύτερη για το εν λόγω ένζυμο.

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

- Acharya KR, Shapiro R, Allen SC, Riordan JF, Vallee BF. Proc Natl Acad Sci USA **1994**, 91, 2915.
- Acharya KR, Ackerman SJ. J Biol Chem **2014**, 289, 17406.
- Agalave SG, Maujan SR, Pore VS. Chem Asian J **2011**, 6, 2696.
- Anagnostou E, Kosmopoulou MN, Chrysina ED, Leonidas DD, Hadjiloi T, Tiraidis C, Zographos SE, Gyorgydeak Z, Somsak L, Dosca T, Gergely P, Kolisis FN, Oikonomakos NG. Bioorg Med Chem **2006**, 14, 181.
- Anantharaman V, Koonin EV, Aravind L. Nucl Acids Res **2002**, 30, 1427.
- Ardelt W, Ardelt B, Darzynkiewicz. Eur J Pharmacol **2009**, 625, 181.
- Barford D, Hu SH, Johnson L.N. Nature **1989**, 340, 609.
- Barnard EA, Stein WD. J Mol Biol **1959α**, 1, 339.
- Barnard EA, Stein WD. J Mol Biol **1959β**, 1, 350.
- Bavaro T, Rocchietti S, Ubiali D, Filice M, Terreni M, Pregnotato M. Eur J Org Chem **2009**, 2009, 1967.
- Beranek J, Hrebabecky H. Nucleic Acids Res **1976**, 3, 1387.
- Blackburn P, Moore S. Enzymes **1982**, XV, 317.
- Blanc J, Geney R, Menet C. Anti-Cancer Agents Med Chem **2013**, 13, 731.
- Board M, Hadwen M, Johnson LN. Eur. J. Biochem, **1995**, 228, 753.
- Borkakoti N. Eur J Biochem **1983**, 132, 89.
- Brahme NM, Smith WTJR. J Heterocyclic Chem **1985**, 22, 109.
- Burgmann H, Hollenstein U, Maca T, Zedwitz-Liebenstein K, Thalhammer F, Koppensteiner R, Ehringer H, Graninger W. J Clin Pathol **1996**, 49, 508.
- Chiarelli F, Pomilio M, Mohn A, Tumini S, Verotti A, Mezzetti A, Cipollone F, Wasniewska M, Morgese G, Spagnoli A. Eur J Clin Invest **2002**, 32, 110.
- Cho JH, Bernard DL, Sidwell RW, Kern ER, Chu CK. J Med Chem **2006**, 49, 1140.
- Chrysina ED. Mini Rev Med Chem **2010**, 10, 1093.
- Cori CF, Cori GT. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **1936**, 34, 702.
- Crestfield AM, Stein WH, Moore S. Arch Biochem Biophys **1962**, Suppl. 1, 217.
- Cuchillo CM, Nogues MV, Raines RT. Biochemistry **2011**, 50, 7835.

- Currid P, Wightman RH. Nucleosides Nucleotides **1997**, 16, 115.
- Czifrak K, Hadady Z, Docsa T, Gergely P, Schmidt J, Wess-johann LA, Somsak L. Carbohydr Res **2006**, 341, 947.
- Davis MI, Hunt JP, Herrgard S, Ciceri P, Wodicka LM, Pallares G, Hocker M, Treiber DK, Zarrinkar PP. Nat Biotechnol **2011**, 29, 1046.
- Deakyne CA, Allen LC. J Am Chem Soc **1979**, 101, 3951.
- delCardayre SB, Ribo M, Yokel EM, Quirk DJ, Rutter WJ, Raines RT. Protein Eng **1995**, 8, 261.
- Domachowske JB, Dyer KD, Bonville CA, Rosenberg HF. J Infect Dis **1998**, 177, 1458.
- Efthymiou T, Gong W, Desaulniers J-P. Molecules **2012**, 17, 12665.
- Esposito L, Vitagliano L, Sica F, Sorrentino G, Zagari A, Mazzarella L. J Mol Biol **2000**, 297, 713.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Int J Cancer **2015**, 136, E359.
- Ferreira SB, Sodero ACR, Cardoso MFC, Lima ES, Kaiser CR, Silva Jr. FP, Ferreira VF. J Med Chem **2010**, 53, 2364.
- Fletterick RJ, Madsen NB. Annu. Rev. Biochem., **1980**, 49, 31.
- Fredens K, Dahl R, Venge P. J. Allergy Clin. Immunol **1982**, 70, 361.
- Folkman J. Nat Rev Drug Discov **2007**, 6, 273.
- Galema SA, Halstead BSJ, Mingos DMP. Chem Soc Rev **1998**, 2; 213.
- Galmarini CM, Mackey JR, Dumontet C. Lancet Oncol **2002**, 3, 415.
- Gao X, Xu Z. Acta Biochim Biophys Sin **2008**, 40, 619.
- Gedye RN, Smith FE, Westaway KC. Can J Chem **1988**, 66, 17.
- Gleich GJ, Loegering DA, Bell MP, Checkel JL, Ackerman SJ, McKean DJ. Proc Natl Acad Sci USA **1986**, 83, 3146.
- Gundlach HG, Stein WH, Moore S. J Biol Chem **1959**, 234, 1754.
- Gyorgydeak Z, Hadady Z, Felfoldi N, Krakomperger A, Nagy V, Toth M, Brunyanszky A, Docsa T, Gergely P, Somsak L. Bioorg Med Chem **2004**, 12, 4861.
- Hadjiloi T, Tiraidis C, Chrysina ED, Leonidas DD, Oikonomakos NG, Tsipos P, Gimisis T. Bioorg Med Chem **2006**, 14, 3872.
- Hallahan TW, Shapiro R, Vallee BL. Proc Natl Acad Sci USA **1991**, 88, 2222.

- Hamann KJ, Barker RL, Loegering DA, Gleich GJ. *J Parasitol* **1987**, 73, 523.
- Hamann KJ, Gleich GJ, Checkel JL, Loegering DA, McCall JW, Barker RL. *J. Immunol* **1990**, 144, 3166.
- Hatzopoulos GN, Leonidas DD, Kardakaris R, Kobe J, Oikonomakos NG. *FEBS J* **2005**, 272, 3988.
- Hayes JM, Leonidas DD. *Mini Rev Med Chem* **2010**, 10, 1156.
- Himo F, Lovell T, Hilgraf R, Rostovtsev VV, Noodleman L, Sharpless KB, Fokin VV. *J Am Chem Soc* **2005**, 127, 210.
- Horikoshi S, Hamamura T, Kajitani M, Yoshizawa-Fujita M, Serpone N. *Org Process Res Dev* **2008**, 12, 1089.
- Hosaka S, Shah MR, Barquin N, Haines GK, Koch AE. *Pathobiology* **1995**, 63, 249.
- Hou JL, Liu XF, Shen J, Zhao GL, Wang PG. *Expert Opin Drug Discov* **2012**, 7, 489.
- Houseley J, Tollervey D. *Cell* **2009**, 136, 763.
- Hu G, Riordan JF, Vallee BL. *Proc Natl Acad Sci USA* **1994**, 91, 12096.
- Isbell HS, Frush HL. *J Org Chem* **1958**, 23, 1309.
- Israili ZH. *American Journal of Therapeutics* **2011**, 18, 285.
- Jacobs S, Fridrich D, Hofem S, Pahlke G, Eisenbrand G. *Mol Nutr Food Res* **2006**, 50, 52.
- Jänne PA, Gray N, Settleman J. *Nat Rev Drug Discov* **2009**, 8, 709.
- Jarrahpour A, Alvand P. *Iran J Sci Tech Trans a-Sci* **2007**, 31, 17.
- Johnson LN, Barford D. *J Biol Chem* **1990**, 265, 2409.
- Jordão AK, Ferreira VF, Lima ES, de Souza MCBV, Carlos ECL, Castro HC, Geraldo RB, Rodrigues CR, Almeida MCB, Cunha AC. *Bioorg Med Chem* **2009**, 17, 3713.
- Kantsadi AL, Apostolou A, Theofanous S, Stravodimos GA, Kyriakis E, Gorgogietas VA, Chatzileontiadou DS, Pegiou K, Skamnaki VT, Stagos D, Kouretas D, Psarra AM, Haroutounian SA, Leonidas DD. *Food Chem Toxicol* **2014**, 67, 35.
- Kašnar B, Škarić V, Klaić B, Žinić M. *Tetrahedron Lett* **1993**, 34, 4997.
- Kim HM, Kang DK, Kim HY, Kang SS, Chang SI. *Biochem Biophys Res Commun* **2007**, 352, 509.

- Kiritsis C, Manta S, Papatotiriou I, Coutouli-Argyropoulou E, Trakossas S, Balzarini J, Komiotis D. *Med Chem* **2012**, 8, 320.
- Kishimoto K, Liu S, Tsuji T, Olson KA, Hu GF. *Oncogene* **2005**, 24, 445.
- Komiotis D, Manta S, Tsoukala E, Tzioumaki N. *Cur Med Chem: Anti-Infect Agents* **2008**, 7, 219.
- Kumar V, Malhotra SV. *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids* **2009**, 28, 821.
- Ladner JE, Wladkowski BD, Svensson LA, Sjolín L, Gilliland GL. *Acta Crystallogr Sect D* **1997**, 53, 290.
- Lazrek HB, Taourirte M, Oulih T, Barascut JL, Imbach JL, Pannecouque C, Witrouw M, De Clercq E. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **1949**, 2001, 20.
- Ledoux L. *Biochim Biophys Acta* **1956**, 20, 369.
- Ledoux L, Revell SH. *Biochim Biophys Acta* **1955**, 18, 416.
- Ledoux L, *Nature* **1955 α** , 174, 258.
- Ledoux L, *Nature* **1955 β** , 176, 36.
- Ledoux L, Baltus E. *Experientia* **1954**, 10, 500.
- Lee FS, Shapiro R, Vallee BL. *Biochemistry* **1989**, 28, 225.
- Leonidas DD, Shapiro R, Irons LI, Russo N, Acharya KR. *Biochemistry* **1997**, 36, 5578.
- Leonidas DD, Chavali GB, Oikonomakos NG, Chrysina ED, Kosmopoulou MN, Vlassi M, Frankling C, Acharya KR. *Protein Sci* **2003**, 12, 2559.
- Li J, Zheng M, Tang W, He PL, Zhu W, Li T, Zuo JP, Liu H, Jiang H. *Bioorg Med Chem Lett* **2006**, 16, 5009.
- Lindsell WE, Murray C, Preston PN, Woodman TA. *J Tetrahedron* **2000**, 56, 1233.
- Lindquist RN, Lynn JJJr, Lienhard GE. *J Am Chem Soc* **1973**, 95, 8762.
- Liu H-M, Yan X, Li W, Huang C. *Carbohydr Res* **2002**, 337, 1763.
- Liu S, Yu D, Xu ZP, Riordan JF, Hu GF. *Biochem Biophys Res Commun* **2001**, 287, 305.
- Lu CS, Tang K, Li Y, Jin B, Yin DL, Ma C, Chen XG, Huang HH. *Yao Xue Xue Bao* **2013**, 48, 709.

- Manta S, Kiritsis C, Dimopoulou A, Parmenopoulou V, Kollatos N, Tsotinis A, Komiotis D. *Anti-Infect Agents* **2014**, 12, 2.
- Mathé C, Gosselin G. *Antiviral Res* **2006**, 71, 276.
- Meadows CD, Gervay-Hague J. *Chem Med Chem* **2006**, 1, 16.
- Messmore JM, Raines RT. *Archiv Biochem Biophys* **2000**, 381, 25.
- Moller DE, *Nature*, **2001**, 414, 821.
- Monod J, Changeux J-P, Jacob F. *J. Mol. Biol.* **1963**, 6, 306.
- Monod J, Wyman J, Changeux J-P. *J. Mol. Biol.* **1965**, 12, 88.
- Montagut C, Settleman J. *Cancer Lett* **2009**, 283, 125.
- Montalbetti CANG, Falque V. *Tetrahedron* **2005**, 61, 10827.
- Moorhouse AD, Moses JE. *Chem Med Chem* **2008**, 3, 715.
- Murdock AL, Grist KL, Hirs CHW. *Arch Biochem Biophys* **1966**, 114, 375.
- Niedballa U, Vorbruggen H. *Angew Chem Int Ed* **1970**, 9, 461.
- Neurath H. In *Proteolytic enzymes: a practical approach*; Beynon RJ, Bond JS, Eds.; IRL Press, New York, pp 1-13.
- Newton DL, Nicholls P, Rybak SM, Youle RJ. *J Biol Chem* **1994**, 269, 26739.
- Nüchter M, Ondruschka B, Bonrath W, Gum A. *Green Chem* **2004**, 6, 128.
- Oikonomakos NG, Acharya KR, Johnson LN, **1992**, Harding J. J. & Crabbe M. J. C. eds, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 81-127.
- Oikonomakos NG, Kontou M, Zographos SE, Tsitoura HS, Johnson LN, Watson KA, Mitchell EP, Fleet GWj, Son JC, Bichard CJF, Leonidas DD, Acharya KR. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* **1994**, 19, 185.
- Oikonomakos, NG. *Curr Protein Pept Sci* **2002a**, 3, 561.
- Oikonomakos NG, Kosmopoulou M, Zographos SE, Leonidas DD, Somsak L, Nagy V, Praly J-P, Docsa T, Toth B, Gergely P. *Eur J Biochem* **2002b**, 269, 1684.
- Park C, Raines RT. *J Am Chem Soc* **2001**, 123, 11472.
- Paulsen H, Pflughaupt KW. In *The Carbohydrates Chemistry and Biochemistry*; Pigman W, Horton D, Eds.; Academic Press: New York, **1980**; pp 881-927.
- Peterson QP, Hsu DC, Goode DR, Novotny CJ, Totten RK, Hergenrother PJ. *J Med Chem* **2009**, 52, 5721.

- Pradhan DK, Dharamrajan TS, Mishra MR, Mishra A. Int J Res Dev Phar L Sci **2012**, 1, 44.
- Putt KS, Chen GW, Pearson JM, Sandhorst JS, Hoagland MS, Kwon JJ, Hwang SK, Jin H, Churchwell MI, Cho MH, Doerge DR, Helferich WG, Hergenrother PJ. Nat Chem Biol **2006**, 2, 543.
- Raines RT. Chem Rev **1998**, 98, 1045.
- Raines RT. Nucleic Acids & Molecular Biology **2004**, 13, 19.
- Reece JB, Urry LA, Cain ML, Wasserman SA, Minorsky PV, Jackson RB, Wasserman SB, 2011, Campbell Biology, 9th Edition, Pearson Education, Somerset, New Jersey, U.S.A.
- Rosenberg HF. Curr Pharm Biotechnol **2008**, 9, 135.
- Roth JS. Methods Cancer Res **1967**, 3, 153.
- Russo A, Acharya KR, Shapiro R. Methods Enzymol **2001**, 341, 629.
- Russo N, Shapiro R. J Biol Chem **1999**, 274, 14902.
- Russo N, Shapiro R, Acharya KR, Riordan JF, Vallee BL. Proc Natl Acad Sci USA **1994**, 91, 2920.
- Samanta A, Leonidas DD, Dasgupta S, Pathak T, Zographos SE, Oikonomakos NG. J Med Chem **2009**, 52, 932.
- Sausville EA. Anticancer Drug Des **2000**, 15, 1.
- Schwoen RL In *Mechanistic principles of enzyme activity*; Liebman JF, Greenberg A, Eds.; VCH, New York, **1988**; pp 119-168.
- Seshasai SR, Kapoge S, Thompson A, Di Angelantonio E, Gao P, Sarwar N, Whincup PH, Mukamal KJ, Gillum RF, Holme I, Njolstad I, Fletcher A, Nilsson P, Lewington S, Collins R, Gudnason V, Thompson SG, Sattar N, Selvin E, Hu FB, Danesh J. N Engl J Med. **2011**, 364, 1281.
- Shapiro R, Vallee BL. Biochemistry **1989 α** , 28, 7401.
- Shapiro R, Fox EA, Riordan JF. Biochemistry **1989 β** , 28, 1726.
- Smith BD, Goodenough-Lashua DM, D'Sousa CJE, Norton KJ, Schmidt LM, Tung JC. Tetrahedron Lett. 2004, 45, 2747.
- Somsak L, Czifrak K, Toth M, Bokor E, Chrysina ED, Alexacou K-M, Hayes JM, Tiraidis C, Lazoura E, Leonidas DD, Zographos SE, Oikonomakos NG. Current Medicinal Chemistry **2008 α** , 15, 2933.

- Somsak L, Felfoldi N, Konya B, Huse C, Telepo K, Bokor E, Czifrak K. Carbohydr Res. **2008β**, 343, 2083.
- Soncin F. Proc Natl Acad Sci USA **1992**, 89, 2232.
- Sorrentino S, Glitz DG, Hamann KJ, Loegering DA, Checkel JA, Gleich GJ. J Biol Chem **1992**, 267, 14859.
- Sprang SR, Goldsmith EJ, Fletterick RJ, Withers SG, Madsen NB. Biochemistry, **1982**, 21, 5364.
- Stimac A, Kobe J. Carbohydr Res **1992**, 232, 359.
- Strydom DJ, Fett JW, Lobb RR, Alderman EM, Bethume JL, Riordan JF, Vallee BL. Biochemistry **1985**, 24, 5486.
- Stryer L., 1997, Βιοχημεία, Τόμος Ι, Έκδοση 2^η, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.
- Suzumori N, Zhao XX, Suzumori K. Fertil Steril **2004**, 82, 93.
- Thompson JE, Raines RT. J Am Chem Soc **1994**, 116, 5467.
- Trakossas S, Coutouli-Argyropoulou E, Hadjipavlou-Litina DJ. Tetrahedron Lett **2011**, 52, 1673.
- Trautwein K, Holliger P, Stackhouse J, Benner SA. FEBS Lett **1991**, 281, 275.
- Tsirkone VG, Dossi K, Drakou C, Zographos SE, Kontou M, Leonidas DD. Structural Biology and Crystallization Communications **2009**, F65, 671.
- Tsoukala E, Manta S, Kiritsis C, Komiotis D. Mini-Rev Med Chem **2012**, 12, 255.
- Varma RS. Green Chem **1999**, 1, 43.
- Vorbrüggen H, Ruh-Pohlentz C. Org React **2000**, 55, 1.
- Watson KS, Mitchell EP, Johnson LN, Cruciani G, Son JC, Bichard CJF, Fleet GWJ, Oikonomakos NG, Kontou M, Zographos SE. Acta Crystallographica **1995**, D51, 458.
- Wlodawer A, Bott R, Sjolín L. J Biol Chem **1981**, 257, 1325.
- Wlodawer A, Miller M, Sjolín L. Proc Natl Acad Sci USA **1983**, 80, 3628.
- Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA, Schwartz B, Simantov R, Kelley S. Nat Rev Drug Discov **2006**, 5, 835.
- Xu Z, Monti DM, Hu G. Biochem Biophys Res Commun **2001**, 285, 909.
- Xu ZP, Tsuji T, Riordan JF, Hu GF. Biochemistry **2003**, 42, 121.

- Yamamoto Y, Shimokawa K, Tanaka K, Hisanaga Y. U.S. Patent 4,847,366, **1989**.
- Yang D, Chen Q, Rosenberg HF, Rybak SM, Newton DL, Wang ZY, Fu Q, Tchernev VT, Wang M, Schweitzer B, Kingsmore SF, Patel DD, Oppenheim JJ, Howard OM. *J Immunol* **2004**, 173, 6134.
- Yoshioka N, Wang L, Kishimoto K, Tsuji T, Hu GF. *Proc Natl Acad Sci USA* **2006**, 103, 14519.
- Yun TK, Kim YK, Kim BS, Park HK, Park SS, Koh CS, Kim JY, Park KB. *Korean Cancer Res Assoc* **1972**, 7, 23.
- Zhang B, Zhao Y, Zhai X, Wang L, Yang J, Tan Z, Gong P. *Chem Pharm Bull* **2012**, 60,1046.
- Zhang X, Amer A, Fan X, Balzarini J, Neyts J, De Clercq E, Prichard M, Kern E, Torrence PF. *Bioorg Chem* **2007**, 35, 221.

ABSTRACT

Glycogen phosphorylase is the key enzyme in the degradation of glycogen. Because of its critical role in glycogen metabolism, the enzyme has been used as a model for the structure-assisted design of inhibitors. As glucose is the physiological inhibitor of the enzyme, many glucose analogs have been designed, synthesized and evaluated. Based on these data, and making use of Zinc database, 1888 *N*-acyl- β -D-glucopyranosyl amines (β -D-Glcp-NHCO-R) were designed and evaluated through molecular docking. Six of them that differed in the substituent (R) were synthesized and were biologically evaluated. Based on these results, the NHCO linker was then replaced by the longer NHCONHCO in order to compare the interactions of the new molecules, bearing the same substituents, to those of the parental ones.

Ribonucleases (RNases) are endonucleases and exonucleases that control post-transcriptionally the RNA population in cells. RNase A, has proven to be a good model for the study of protein structure, folding, and stability and enzymatic catalysis. In the last decade, members of the RNase A superfamily have been found to play a pivotal role in many human diseases. For this reason, these proteins are drug targets for the molecular design of novel inhibitors that suppress the activity and reduce their pathologic actions. In order to study the effect of the length of novel inhibitors on the bioactivity of RNase A, triazole ribonucleoside analogs with various heterocyclic bases as well as the corresponding uridines were synthesized and were also biologically evaluated. Additionally, since the 5-position of the pyrimidine base is susceptible to the addition of functional groups, we explored the effect of the new chemical groups inserted to the inhibitory potency of compounds. Finally, in order to improve the inhibitory effect of those analogs, a novel series of modified ribonucleosides bearing two heterocyclic bases in its structure, double-headed nucleoside, was synthesized.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc

Triazole pyrimidine nucleosides as inhibitors of Ribonuclease A. Synthesis, biochemical, and structural evaluation

Vanessa Parmenopoulou^{a,†}, Demetra S.M. Chatzileontiadou^{a,†}, Stella Manta^a, Stamatina Bougiatioti^a, Panagiotis Maragozidis^a, Dimitra-Niki Gkaragkouni^a, Eleni Kaffesaki^a, Anastassia L. Kantsadi^a, Vassiliki T. Skamnaki^a, Spyridon E. Zographos^b, Panagiotis Zounpoulakis^b, Nikolaos A.A. Balatsos^{a,*}, Dimitris Komiotis^{a,*}, Demetres D. Leonidas^{a,*}

^a Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, 26 Ploutonos St., 41221 Larissa, Greece

^b Institute of Biology, Medicinal Chemistry & Biotechnology, National Hellenic Research Foundation, 48 Vas. Constantinou Avenue, 11635 Athens, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 July 2012

Revised 21 September 2012

Accepted 24 September 2012

Available online 16 October 2012

Keywords:

Ribonuclease A

Inhibition

X-ray crystallography

Triazole nucleosides

Structure-assisted inhibitor design

ABSTRACT

Five ribofuranosyl pyrimidine nucleosides and their corresponding 1,2,3-triazole derivatives have been synthesized and characterized. Their inhibitory action to Ribonuclease A has been studied by biochemical analysis and X-ray crystallography. These compounds are potent competitive inhibitors of RNase A with low μM inhibition constant (K_i) values with the ones having a triazolo linker being more potent than the ones without. The most potent of these is 1-[(β -D-ribofuranosyl)-1,2,3-triazolo-4-yl]uracil being with $K_i = 1.6 \mu\text{M}$. The high resolution X-ray crystal structures of the RNase A in complex with three most potent inhibitors of these inhibitors have shown that they bind at the enzyme catalytic cleft with the pyrimidine nucleobase at the B_1 subsite while the triazole moiety binds at the main subsite P_1 , where P-O5' bond cleavage occurs, and the ribose at the interface between subsites P_1 and P_0 exploiting interactions with residues from both subsites. The effect of a subsituent group at the 5-pyrimidine position at the inhibitory potency has been also examined and results show that any addition at this position leads to a less efficient inhibitor. Comparative structural analysis of these RNase A complexes with other similar RNase A–ligand complexes reveals that the triazole moiety interactions with the protein form the structural basis of their increased potency. The insertion of a triazole linker between the pyrimidine base and the ribose forms the starting point for further improvement of these inhibitors in the quest for potent ribonucleolytic inhibitors with pharmaceutical potential.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Ribonucleases (RNases) are endonucleases that control post-transcriptionally the RNA population in cells. RNases and in particular RNase A, have proven to be excellent model systems for the study of protein structure, folding and stability, and enzyme catalysis. In the last decade several homologues of the RNase A superfamily have been found to play an important role in human pathologies.¹ Human angiogenin (Ang), a potent inducer of neovascularization in vivo is an important target for many angiogenesis dependent diseases such as tumors and other non-neoplastic

Abbreviations: RNase A, bovine pancreatic Ribonuclease A; PEG, poly(ethylene glycol); USP, deoxyuridine 5'-phosphate; ppA-3'-p, 5'-diphosphoadenosine 3'-phosphate.

* Corresponding authors. Tel.: +30 2410 565261; fax: +30 2410 565290 (N.A.A.B.); tel.: +30 2410 565285; fax: +30 2410 565290 (D.K.); tel.: +30 2410 565278; fax: +30 2410 565290 (D.D.L.).

E-mail addresses: balatsos@bio.uth.gr (N.A.A. Balatsos), dkom@bio.uth.gr (D. Komiotis), ddleonidas@bio.uth.gr (D.D. Leonidas).

[†] These two authors contributed equally to this work.

0968-0896/\$ - see front matter © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2012.09.067>

diseases.² Eosinophil ribonucleases, eosinophil derived neurotoxin (EDN) and eosinophil cationic protein (ECP) are both involved in the immune response system and inflammatory disorders.^{3,4} The biological activity of all these RNase A homologues is linked to their enzymatic activity. Therefore, these proteins are pharmaceutical targets for the rational design of specific inhibitors to suppress their activity and hence modulate their pathological actions.

Several subsites exist within the central catalytic groove of RNases, where substrate RNA, binds. These are defined as $P_0\dots P_n$, $R_0\dots R_n$, and $B_0\dots B_n$ according to the phosphate, ribose and base of RNA that bind respectively, (n indicates the position of the group with respect to the cleaved phosphate phosphodiester bond where $n = 1$).⁵ The active site of all RNases is highly conserved in terms of sequence and structural architecture. However, specific differences in their peripheral RNA binding sites give rise to variations in their specificity towards different substrates and may provide clues for the rational design of specific ligands for each RNase. In the past, we have initiated structure assisted inhibitor design studies using as a template RNase A, and studied a variety of substrate analogues, mainly mono and diphosphate (di)nucleotides with

adenine at the 5'-position, and cytosine or uridine at the 3'-position of the scissile bond.^{6–10} All these compounds had significant number of polar groups (pyrophosphates, phosphates or sulfates) which may lead to cell impermeability and problems in their bioavailability.¹¹ Especially pyrophosphate groups could be hydrolysed by enzymes like Ap₃A and Ap₄A hydrolases^{12,13} rendering them ineffective and possibly toxic (themselves or degraded products).¹⁴ Hence, we have turned our attention towards compounds that did not have phosphate groups.

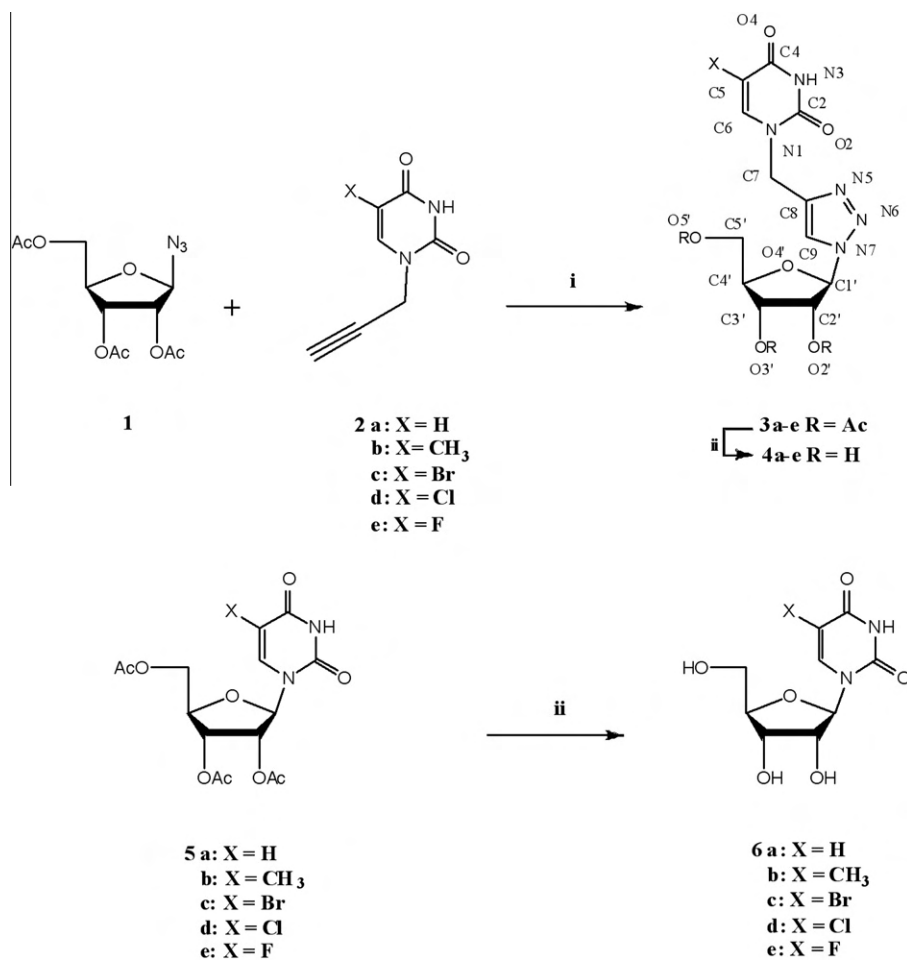
In the recent years, aminonucleosides have been identified as a new class of potent inhibitors of RNase A and angiogenin¹⁵ with *K_i* values in the mid μM range while the binding of the most potent of this class has been studied by X-ray crystallography.¹⁶ The binding a series of uridine and thymidine analogues that had a morpholino, piperidino, or pyrrolidino group at the 5'-position and *K_i* values for RNase A in the mid μM range has been also studied.¹⁷ Nucleoside-dibasic acid and nucleoside-amino acid conjugates^{18–20} have been also shown to be inhibitors of similar potency. Furthermore, two 3'-*N*-piperidine-4-carboxyl-3'-deoxy-*ara*-uridine molecules¹⁶ and three molecules of IMP⁹ bind in the catalytic site cleft of RNase A. More recently dinucleosides connected by either polar or non-polar linkers have been shown to inhibit RNase A and angiogenin with *K_i* values in the areas of mid- μM and upper- μM range, respectively.²¹ Despite the number of synthetic inhibitors examined thus far, the best ribonucleolytic inhibitor is pdUppA-3'p with *K_i* values of 27 nM, 180 nM, and 360 μM for RNase A, EDN and Ang, respectively,^{7,22,23} whereas transition state theory predicts pM values for genuine transition states.¹

Most of the more recent studies try to replace the pyrophosphate linker of the most potent inhibitors with a non-phosphoryl group.^{15,16,18,21} Thus, following the structure-guided inhibitor design approach we wanted to study the effect of the molecular length in the inhibitory potency and more specifically the effect of the distance between the nucleotide base and the ribose. This way we could correlate this distance to their potency for RNase A. Furthermore, since the 5-position of pyrimidine is amenable to additions we also wanted to explore the limitations as to the molecular size of any putative chemical group addition to this position. Herein, we have explored the binding effect of nucleoside analogs lacking any phosphate groups with the insertion of a triazole group between the ribose and the base moieties, in order to provide a variation in the inhibitor length. Our results show that the insertion of a triazole between the sugar and the base moieties increases the inhibitory potency significantly while any substitution at the 5-pyrimidine proton with halogens or a methyl group partially released the inhibitory effect of the novel nucleosides.

2. Results

2.1. Chemistry

Our first approach was focused on the synthesis of the 1,2,3-triazole 5-substituted uracil furanonucleosides **4a–e** (Scheme 1). Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) was utilized to couple the protected azido ribofuranose **1**²⁴ with propargyl uracil (**2a**), thymine (**2b**), 5-bromouracil (**2c**), 5-chlorouracil (**2d**) and



Scheme 1. (i) propargyl pyrimidine base, THF, H₂O, CuSO₄·5H₂O, sodium ascorbate; (ii) methanolic ammonia.

5-fluorouracil (**2e**),²⁵ in the presence of catalytic amounts of CuSO₄·5H₂O and sodium ascorbate. The Cu(I)-catalyzed [2 + 3] dipolar cycloaddition reaction occurred with full regioselectivity, resulting in the formation of the corresponding 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles **3a–e**. Finally, the acetyl groups of the protected nucleosides **3a–e** were cleaved using NH₃/MeOH solution to afford the corresponding free analogues **4a–e**, in very good yields (74–83%).

The current study also describes an effective and high-yield approach for the preparation of C-5 substituted uridines **6a–e** using a domestic microwave oven and adapting the typical two step Vorbruggen coupling²⁶ into a 3 min one pot reaction. Therefore, condensation of the commercially available 1,2,3,5-tetra-*O*-acetyl-β-D-ribofuranose with 5-fluorouracil, 5-chlorouracil, 5-bromouracil, uracil and thymine furnished the protected furanonucleosides **5a–e**, in the presence of trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate, as catalyst.²⁶ The participation of 2'-acetoxy group led to the exclusive formation of the β-anomers **5**. Finally, removal of all *O*-acetyl protecting groups of **5a–e** with saturated methanolic ammonia, afforded the target unprotected nucleosides **6a–e**, in quantitative yields (85–92%).

All new compounds were well-characterized by NMR and UV spectroscopy, mass spectrometry and elemental analysis. The structure elucidation of the newly synthesized 1-(β-D-ribofuranosyl)-1,2,3-triazole nucleosides, was made on the basis of their spectroscopic data. According to ¹H NMR spectra of the 'click' products the newly formed triazole proton was observed at 7.91–7.94 ppm for analogues **3a–e** and 8.27–8.35 ppm for analogues **4a–e**.

2.2. Enzyme activity

We have evaluated the effect of the novel nucleoside analogs bearing a triazole-ring between the ribose and the sugar moieties and also lacking any phosphate groups (Fig. 1). Kinetic analysis revealed that compound **4a** could efficiently inhibit RNase A in a competitive mode with $K_i = 1.6 \mu\text{M}$. The same nucleoside without the triazole group, **6a**, inhibited the enzyme following again competitive kinetics, but the K_i value was 28.5 μM. This result shows that the distance between the sugar and the base moieties of the nucleoside is important for inhibitory potency, as the insertion of a triazole group ameliorated the inhibitory effect of the nucleoside. We further designed and synthesized nucleoside analogs with substitutions at the 5-position of the base moiety. This position is important for activity modulation and the substitution with halogens has been widely used in modern medicinal chemistry.²⁷ We therefore substituted the proton at 5-position with Br, Cl or F resulting to compounds **4c**, **4d** or **4e**, respectively. Detailed kinetic analysis of the inhibitory potencies of **4d** or **4e** against RNase A revealed that the K_i values were, 94.76 ± 8.73 and $30.85 \pm 4.44 \mu\text{M}$, respectively, while 50 μM of **4c** produced 20% inhibition of the enzymatic activity (Table 1). The analysis showed that the halogen substitution resulted to partial release of the inhibition, and the bulkier the halogen the greater the K_i value and the less efficient the inhibition. When the same experiments were performed with the nucleoside analogs lacking the triazole ring, (compounds **6a–e**), the calculated K_i values were following the same potency pattern as the triazole-bearing ones (Table 1). We also substituted the 5-proton with a methyl group, which is less polar than the halogens, in both triazole and non-triazole nucleosides (**4b** and **6b**, respectively). In this case, the K_i value for **4b** was $25.8 \pm 2.4 \mu\text{M}$, while for **6b** was $44.1 \pm 6.4 \mu\text{M}$, showing again that the triazole group is important for efficient inhibition. For either the triazole or non-triazole methyl-substituted nucleoside, the K_i values were higher than the unsubstituted nucleosides (Table 1), but lower than almost all the 5-halogen substituted ones.

Conclusively, the previous results show that the presence of the triazole group between the sugar and the base of the inhibitor is of primary importance for efficient inhibition, while adding a substituent at

5-position of the base decreases potency.

2.3. X-ray crystallography

To elucidate the structural basis of inhibition, we have determined the crystal structure of RNase A in complex with the three most potent compounds, **4a**, **4b**, and **4e**. In the monoclinic crystal form of RNase A used in the experiments there are two protein molecules in the asymmetric unit.¹⁶ All three ligands were found bound only in one of these molecules since binding to the active site of the other RNase A molecules is impeded by crystal packing contacts. This has been also observed in previous studies^{8,16,17} and provided us with two structures one free and one inhibitor complexed, from the same crystal, facilitating thus a comparative structural analysis of the binding of each ligand to RNase A. The structures of the **4a**, **4b**, and **4e** complexes are determined at 1.7, 1.8 and 1.9 Å resolution and contain 334, 246, and 324 water molecules, respectively. Upon binding to RNase A, all inhibitor molecules adopt similar conformations and bind similarly at the active site by anchoring the uracil at the B₁ subsite like previous pyrimidine inhibitors.^{5,7,8,10} The primary functional component of this subsite is Thr45, forms two hydrogen bonds with pyrimidine: its main-chain NH donates a hydrogen to O2 of the uracil while its Oγ1 donates a hydrogen to N3 of uracil (Fig. 2). The phenyl group of Phe120 and His12 Cε1 on one side, and Val43 and Asn44 on the opposite side of the pyrimidine, lie in van der Waals contact distance from the ring stabilizing its binding (Fig. 2). The triazole moiety is involved in an extensive hydrogen bond interactions network with protein residues His12, Lys41 and Gln11 (Fig. 2) at subsite P₁, (Table 2) while the ribose binds at the far end of subsite P₁ hydrogen-bonding to His119, Gln11 and Lys7 (subsite P₂). The 5-methyl group of **4b** is involved in van der Waals interactions with Asp121. The 5-fluorine of **4e** forms halogen bonds with NZ of Lys66 (subsite P₀) and the carbonyl oxygen of Asp121 (Table 2; Fig. 2).

Upon binding to RNase A, inhibitor molecules become partly buried. The solvent accessibilities of the free ligand molecules **4a**, **4b**, and **4e** are 488, 507, and 517 Å², respectively. When bound these molecular surfaces shrink to 134, 165, and 154 Å², respectively. This indicates that approximately 70% of the ligand molecules surfaces become buried. Compounds **4a**, **4b**, and **4e** on binding to RNase A, make a total of 14, 12 and 15 hydrogen bonds, respectively and 72, 55 and 61 van der Waals interactions, respectively (**4a**: 11 nonpolar/nonpolar, 45 polar/nonpolar, 16 polar/polar; **4b**: 8 nonpolar/nonpolar, 36 polar/nonpolar, 11 polar/polar; **4e**: 10 nonpolar/nonpolar, 37 polar/nonpolar, 14 polar/polar) (see Supplementary data).

3. Discussion

The hydrogen bond and the van der Waals interactions of the triazole moiety seem to form the structural basis of the increased potency of these compounds in comparison to the ones that lack this moiety (Table 1). Structural comparison of the three triazole pyrimidine nucleoside protein complexes with the RNase A-U5P complex¹⁰ (Fig. 3) reveals that although they bind with their uracil at the B₁ subsite in a similar structural mode the rest of the molecules follow a different binding pattern, which could be attributed to the introduction of the triazole moiety in the pyrimidine nucleosides. Thus while in the RNase A-U5P complex¹⁰ the phosphoribose moiety binds away from subsite P₁ pointing to the solvent, the triazole nucleosides bind at the core of the enzyme active site (subsites B₁-R₁-P₁). There, they exploit more protein interactions than U5P and

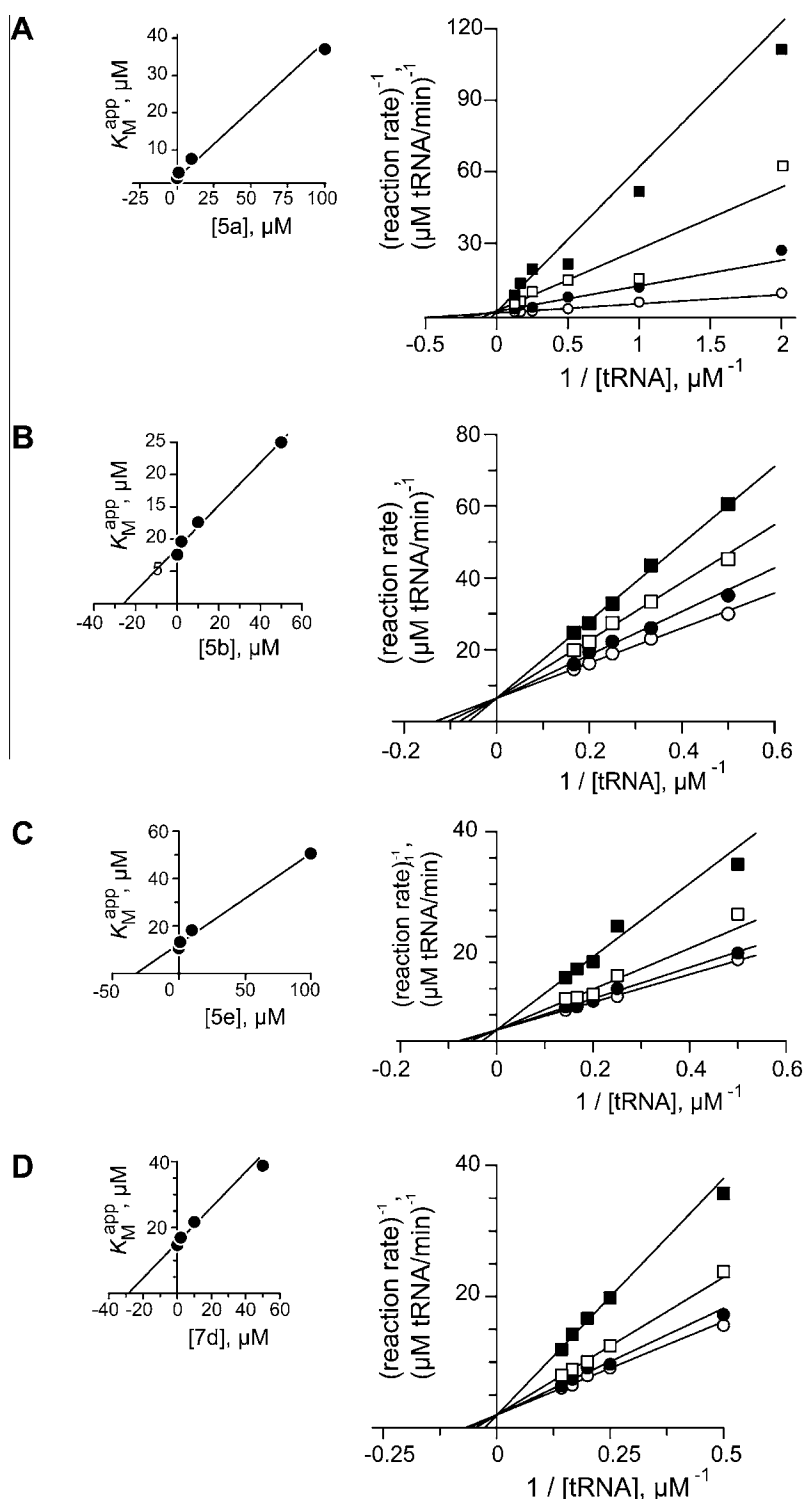


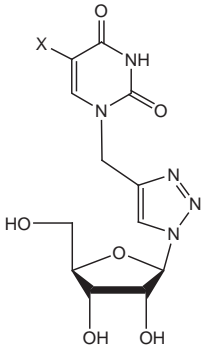
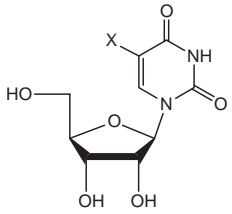
Figure 1. Pyrimidine and triazole pyrimidine nucleosides are competitive inhibitors of RNase A. Double reciprocal plots of enzyme assays are shown for nucleosides **4a** (A), **4b** (B), **4e** (C) and **6e** (D). **6e** is a pyrimidine nucleoside without a triazole ring. The nucleoside concentrations are 0 (○), 1 (●), 10 (□) and 50 (■) μM, except (A) and (C) where (■) is 100 μM. RNase A concentration is 10 nM and substrate tRNA concentrations vary from 0–6 μM. Calculated K_i values are listed in Table 1. K_M^{app} versus [I] plots for the calculation of K_i values are shown on the right of each panel. Representative plots of at least three independent experiments.

hence they are more potent inhibitors with K_i values an order of magnitude lower than that of U5P ($K_i = 4$ mM).¹⁰ Structural comparison of the binding of **4a** to that of ppA-3'-p⁶ (the most potent mononucleoside inhibitors thus far with $K_i = 240$ nM²⁸) to RNase A reveals that the ribose moiety of **4a** superposes onto the pyrophosphate group in the RNase A–ppA-3'-p complex with its hydroxyl groups onto the position of the pyrophosphate oxygen atoms

providing a possible structural explanation for **4a** potency. It is however the interactions of the adenosine of ppA-3'-p with residues of the B₂ subsite which lead to the higher potency of ppA-3'-p in comparison to **4a**. This is also supported by the fact that UDP with a K_i value of 650 μM¹⁰ is a weaker inhibitor of RNase A.

Earlier kinetic studies^{23,29,30} had demonstrated that thymidine nucleotides bind to RNase A with K_i values comparable with those

Table 1
Kinetic parameters and structures of the inhibitors

Triazole nucleoside			Nucleoside	
				
5-Substitute (-X)	Compound	K_i (μM)	Compound	K_i (μM)
H	4a	1.6 ± 0.2	6a	28.5 ± 4.5
Me	4b	25.8 ± 2.4	6b	44.1 ± 6.4
Br	4c	20% inhibition at $50 \mu\text{M}$	6c	69.1 ± 2.1
Cl	4d	94.8 ± 8.7	6d	44.5 ± 4.6
F	4e	30.8 ± 4.4	6e	33.6 ± 2.6

of uridine inhibitors. Our results with compounds **6a–e** are in agreement with these studies since uracil (**6a**) and thymine (**6b**) compounds have similar K_i values (Table 1). Furthermore, halogen atoms do not seem to improve significantly the inhibitory potency with the fluorine compound (**6e**) being slightly better than thymine (**6b**) which in turn is almost equipotent with the chlorine compound (**6d**) while the bromine compound (**6c**) is the less potent of all, but only 2.4 times less potent than the best inhibitor (**6a**). However, with the triazole compounds it seems that the diversity of the 5-pyrimidine substituent has an impact on RNase A inhibition since the potency of these compounds ranges from 1.6 to $94.8 \mu\text{M}$ and beyond ($50 \mu\text{M}$ of compound **4c** cause only 20% inhibition). In addition the triazole compound with uracil is more potent than that with a thymine. The structural superposition of the **4a**, **4b**, and **4e** complexes (Fig. 4) reveals that the addition of a methyl group in the 5-position of pyrimidine causes a tilt of the pyrimidine ring by $\sim 10^\circ$ since it is moving away from the amide nitrogen of the Lys66 side chain which also moves to a new position with respect to its position in **4a** and **4e** complexes (Fig. 4). As a result the entire inhibitor molecule is shifted by $\sim 0.7 \text{ \AA}$ and hydroxyl O5' of the ribose cannot form hydrogen bond interaction with the side chain of Lys7 (Table 2). This together with the fact that **4a** forms 72 van der Waals interactions with the protein while **4b** forms 55 can offer a structural explanation for the greater potency of **4a** with respect to **4b**. Comparison of the **4a** and **4e** complexes reveals that the fluorine atom of **4e** engages in halogen bond interactions with the side chain amide of Lys66 (Table 2); interactions which are not observed in the **4a** complex. Furthermore, **4e** participates in 61 van der Waals interactions with the protein, 11 less than **4a**. It seems that these 11 van der Waals interactions are enough to counterbalance the halogen bond interactions of **4e** and the latter is 20 times less potent than **4a**. These observations show that even small modifications of the inhibitor's chemical structure can generate profound alterations in its inhibitory potency for the target protein. Nevertheless, the main conclusion is that any substitution of the 5-pyrimidine proton leads to a decrease in inhibitory potency.

Although previous studies with dinucleosides synthesized by linking two nucleosides with either a polar or a non-polar linker²¹ led to potent inhibitors with K_i values between 59 and $544 \mu\text{M}$ for RNase A. However, the introduction of a polar linker between the

base and the ribose (as opposed between the 3'- and the 5' positions of the two ribose molecules of a dinucleotide) produced more potent ribonuclease inhibitors. This encourages following this route in our structure assisted inhibitor design approach. Comparative structural analysis of the RNase A in complex with **4a**, **4b**, and **4e** with other RNase A–ligand complexes, suggests ways to improve their potency and this study is the starting point for the design of better inhibitors. Thus, we are currently aiming to introduce an additional triazole ring at the 3'-position of the ribose of **4a**, to link a second heterocyclic base with the nucleosidic moiety, yielding to more potent inhibitors.

4. Experimental section

4.1. Chemistry. Materials and general methods

Thin layer chromatography (TLC) was performed on Merck pre-coated 60F254 plates. Reactions were monitored by TLC on silica gel, with detection by UV light (254 nm) or by charring with sulfuric acid. Flash column chromatography was performed using silica gel (240–400 mesh, Merck). UV–Vis spectra were recorded on a PG T70 UV–VIS spectrometer and mass spectra were obtained with a Micromass Platform LC (ESIMS). ^1H NMR spectra were recorded at 300 MHz on a Bruker AVANCE^{III} 300 spectrometer and ^{13}C NMR spectra at 75.5 MHz on the same spectrometer, using respectively CDCl_3 and dimethylsulfoxide- d_6 ($\text{DMSO}-d_6$) with internal tetramethylsilane (TMS). Chemical shifts (δ) were given in ppm measured downfield from TMS, and spin–spin coupling constants are in Hz. UV–Vis spectra were recorded on a PG T70 UV–VIS spectrometer and mass spectra were obtained on a Thermo Quest Finnigan AQA Mass Spectrometer (electrospray ionization). Optical rotations were measured using an Autopol I polarimeter. Acetonitrile was distilled from calcium hydride and stored over 3E molecular sieves. Microwave assisted reactions were carried out in a domestic microwave oven (Samsung-LCE 2733 GXTL) for realistic control of the microwaves operating at 850 W generating 2450 MHz frequency throughout the required time.

With the exception of CuAAC reactions, all reactions sensitive to moisture or oxygen were carried out under nitrogen environment. Azide **1**²⁴ as well as the corresponding propargyl bases **2a–e**²⁵ were prepared according to the procedures described in literature.

4.2. General procedure for preparation of the protected nucleosides **3a–e**

To a stirred mixture of azide **1**²⁴ (6.6 mmol) and the corresponding propargyl base **2a–e**²⁵ (7.6 mmol) in THF (41.6 mL), was added a solution of sodium ascorbate (3.5 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.84 mmol) in H_2O (41.6 mL). The reaction mixture was refluxed for 2 h and then cooled. After being treated with MeOH and concentrated, the residue was purified by flash chromatography (EtOAc) to give the desired analogues **3a–e** as white solids.

4.2.1. 1-[(2',3',5'-Tri-O-acetyl- β -D-ribofuranosyl)-1,2,3-triazol-4-yl]uracil (**3a**)

Yield 75%; $R_f = 0.28$ (EtOAc); $[\alpha]_D^{22} +2$ (c 0.20, CHCl_3); λ_{max} 265 nm (ϵ 9241); mp: 107–109 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 8.97 (br s, 1H, NH), 7.94 (s, 1H, Triazole H), 7.50 (d, 1H, $J_{5,6} = 7.9$ Hz, H-6), 6.14 (d, 1H, $J'_{1,2} = 3.7$ Hz, H-1'), 5.79 (dd, 1H, $J = 3.9$ and 5.1 Hz, H-2'), 5.72 (d, 1H, H-5), 5.59 (t, 1H, H-3'), 5.02, 4.96 (q, AB-system, 2H, $J = 15.1$ Hz, CH_2), 4.48 (m, 1H, H-4'), 4.40 (dd, 1H, $J = 12.4$ and 3.1 Hz, H-5'), 4.24 (dd, 1H, $J = 12.4$ and 4.5 Hz, H-5'), 2.12, 2.11, 2.09 (3s, 9H, 3OAc). ^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3) δ 170.4, 169.4, 169.2, 163.2, 150.7, 144.2, 123.3, 102.8, 90.2, 81.0, 74.3, 70.6, 62.8, 43.1, 29.7, 20.7, 20.5, 20.4; ESIMS m/z :

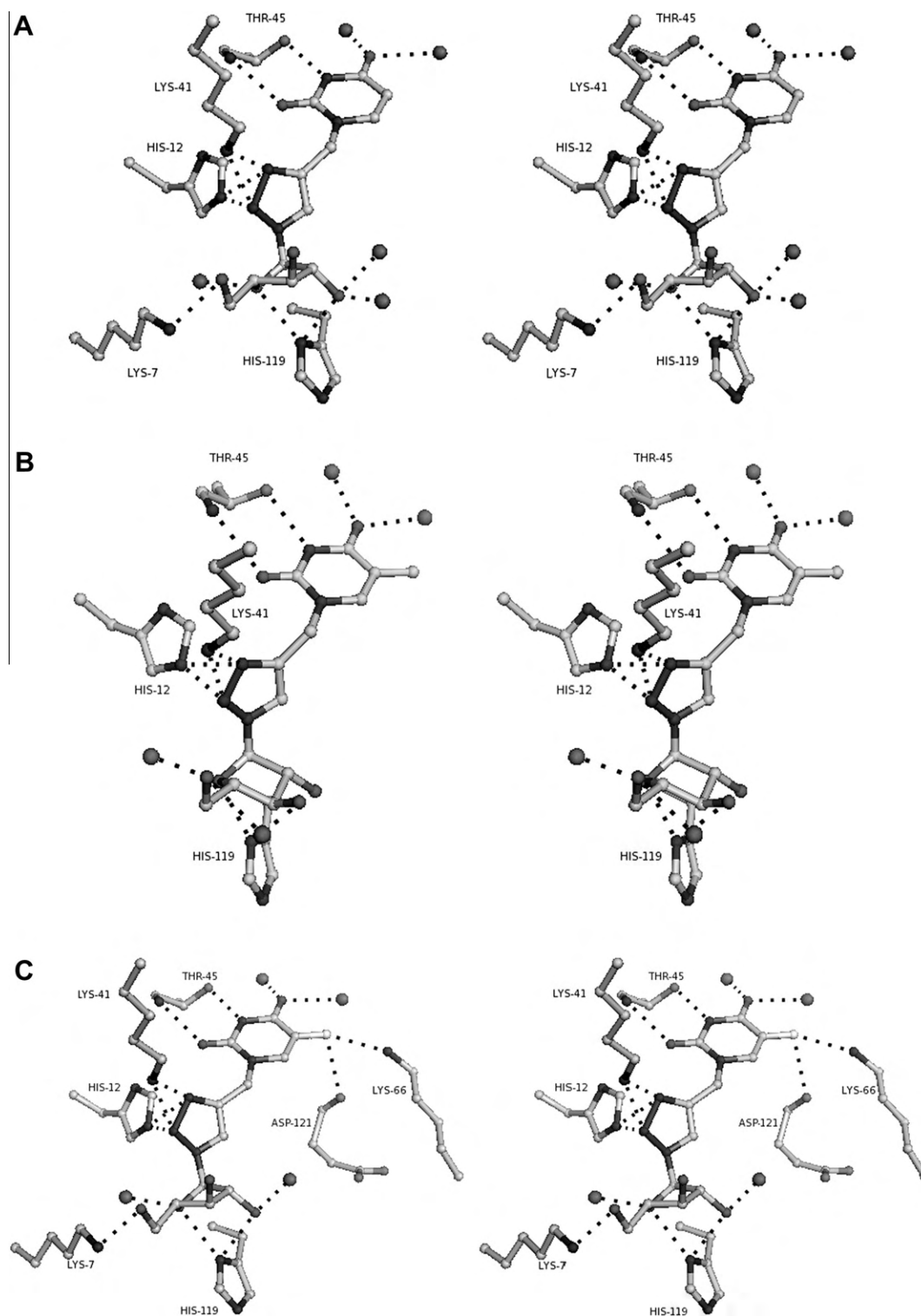


Figure 2. Stereo diagrams of the interactions between RNase A and molecule **4a** (A), **4b** (B) and **4e** (C). The side chain atoms of protein residues involved in ligand binding are shown as ball-and-stick models. Bound waters are shown as black spheres. Hydrogen bond interactions are represented as dashed lines.

452.42 [M+H]⁺. Anal. Calcd for C₁₈H₂₁N₅O₉: C, 47.90; H, 4.69; N, 15.52. Found: C, 47.73; H, 4.93; N, 15.83.

4.2.2. 1-[(2',3',5'-Tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosyl)-1,2,3-triazol-4-yl]thymine (3b)

Yield 70%; *R*_f = 0.3 (EtOAc); [α]_D²² −4 (c 0.20, CHCl₃); λ _{max} 271 nm (ϵ 8030); mp: 101–102 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.64 (br s,

1H, NH), 7.91 (s, 1H, Triazole H), 7.33 (s, 1H, H-6), 6.13 (d, 1H, *J*_{1,2}' = 3.7 Hz, H-1'), 5.80 (dd, 1H, *J* = 3.9 and 5.1 Hz, H-2'), 5.59 (t, 1H, H-3'), 5.00, 4.92 (q, AB-system, 2H, *J* = 15.0 Hz, CH₂), 4.48 (m, 1H, H-4'), 4.40 (dd, 1H, *J* = 12.4 and 3.0 Hz, H-5'), 4.24 (dd, 1H, *J* = 12.4 and 4.5 Hz, H-5'), 2.12, 2.11, 2.09 (3s, 9H, 3OAc), 1.91 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ 170.4, 169.4, 169.2, 163.9, 150.8, 142.4, 140.1, 123.2, 111.4, 90.3, 81.0, 74.3, 70.6,

Table 2
Potential hydrogen bond interactions of the inhibitors when bound to RNase A in the crystal

Inhibitor atom ^a	Protein atom	4a	4b	4e
O2'	His119 ND1	2.3	2.8	2.3
	Wat215	2.2	—	—
	Wat306	3.1	—	3.3
O4'	His119 ND1	3.0	2.9	3.2
	Wat22	2.5	3.0	2.8
O5'	Lys7 NZ	2.4	—	2.4
	Wat226	—	2.6	—
N3	Thr45 OG1	2.8	2.8	2.8
N5	His12 NE2	3.0	2.8	3.0
	Lys41 NZ	2.7	2.7	2.9
N6	His12 NE2	2.6	2.7	2.7
	Lys41 NZ	2.9	3.1	3.3
O2	Thr45 N	2.9	2.9	2.9
O4	Wat186	2.5	2.9	2.7
	Wat99	3.1	3.1	2.9
F5A	Asp121 O	—	—	3.3
	Lys66 NZ	—	—	3.1
Total		14	12	15

Water mediated interactions. Wat215 is hydrogen-bonded to Wat306, which in turn forms hydrogen bonds with Wat221. Wat221 is hydrogen-bonded to Asp121 OD1. Wat22 is hydrogen-bonded to Gln11 OE1, Wat16, which in turn forms hydrogen bond interactions with Ala4 O, and Val118 O. Wat186 is hydrogen-bonded Ser123 OG, Thr45 OG1, and Asp83 OD1. Wat99 forms hydrogen bonds with Ser123 N and Wat100. Wat100 is hydrogen-bonded to Ser123 O.

^a For ligand atom definitions see Table 1.

62.8, 42.9, 20.7, 20.5, 20.4, 12.3; ESIMS *m/z*: 466.39 [M+H]⁺. Anal. Calcd for C₁₉H₂₃N₅O₉: C, 49.03; H, 4.98; N, 15.05. Found: C, 49.40; H, 4.74; N, 15.32.

4.2.3. 1-[(2',3',5'-Tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosyl)-1,2,3-triazol-4-yl]5-bromouracil (3c)

Yield 65%; *R*_f = 0.41 (EtOAc); [α]_D²² –24 (c 0.20, CHCl₃); λ_{max} 282 nm (ε 8703); mp: 90–93 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.80 (br s, 1H, NH), 7.93 (s, 1H, Triazole H), 7.87 (s, 1H, H-6), 6.15 (d, 1H, *J*_{1,2}' = 3.7 Hz, H-1'), 5.79 (dd, 1H, *J* = 3.9 and 5.2 Hz, H-2'), 5.58 (t, 1H, H-3'), 5.04, 4.98 (q, AB-system, 2H, *J* = 15.1 Hz, CH₂), 4.48 (m, 1H, H-4'), 4.40 (dd, 1H, *J* = 12.4 and 3.1 Hz, H-5'), 4.25 (dd, 1H, *J* = 12.4 and 4.5 Hz, H-5'), 2.12, 2.11, 2.09 (3s, 9H, 3OAc). ¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ 170.4, 169.5, 169.3, 159.2,

150.2, 143.5, 141.6, 123.5, 97.2, 90.3, 81.0, 74.3, 70.6, 62.8, 43.3, 20.7, 20.5, 20.4; ESIMS *m/z*: 531.30 [M+H]⁺. Anal. Calcd for C₁₈H₂₀BrN₅O₉: C, 40.77; H, 3.80; N, 13.21. Found: C, 41.02; H, 3.53; N, 12.94.

4.2.4. 1-[(2',3',5'-Tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosyl)-1,2,3-triazol-4-yl]5-chlorouracil (3d)

Yield 68%; *R*_f = 0.39 (EtOAc); [α]_D²² –8 (c 0.20, CHCl₃); λ_{max} 279 nm (ε 9402); mp: 80–82 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.77 (br s, 1H, NH), 7.94 (s, 1H, Triazole H), 7.76 (s, 1H, H-6), 6.15 (d, 1H, *J*_{1,2}' = 3.6 Hz, H-1'), 5.79 (dd, 1H, *J*' = 4.1 and 5.0 Hz, H-2'), 5.58 (t, 1H, H-3'), 5.00 (t, 2H, *J* = 15.7 Hz, CH₂), 4.49 (m, 1H, H-4'), 4.40 (dd, 1H, *J* = 12.4 and 3.0 Hz, H-5'), 4.25 (dd, 1H, *J* = 12.4 and 4.5 Hz, H-5'), 2.12, 2.11, 2.10 (3s, 9H, 3OAc). ¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ 170.4, 169.5, 169.3, 159.1, 149.9, 141.6, 141.0, 123.4, 109.5, 90.3, 81.0, 74.3, 70.6, 62.8, 43.3, 20.7, 20.5, 20.4; ESIMS *m/z*: 486.85 [M+H]⁺. Anal. Calcd for C₁₈H₂₀ClN₅O₉: C, 44.50; H, 4.15; N, 14.42. Found: C, 44.68; H, 3.92; N, 14.12.

4.2.5. 1-[2',3',5'-Tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosyl)-1,2,3-triazol-4-yl]5-fluorouracil (3e)

Yield 71%; *R*_f = 0.5 (EtOAc); [α]_D²² +2 (c 0.20, CHCl₃); λ_{max} 271 nm (ε 7718); mp: 49–51 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.78 (br s, 1H, NH), 7.93 (s, 1H, Triazole H), 7.61 (d, 1H, *J*_{6,F} = 5.3 Hz, H-6), 6.15 (d, 1H, *J*_{1,2}' = 3.5 Hz, H-1'), 5.79 (dd, 1H, *J* = 3.9 and 4.9 Hz, H-2'), 5.58 (t, 1H, H-3'), 5.00, 4.94 (q, AB-system, 2H, *J* = 15.2 Hz, CH₂), 4.49 (m, 1H, H-4'), 4.40 (dd, 1H, *J* = 12.4 and 2.9 Hz, H-5'), 4.25 (dd, 1H, *J* = 12.5 and 4.5 Hz, H-5'), 2.13, 2.12, 2.10 (3s, 9H, 3OAc). ¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ 170.4, 169.5, 169.3, 157.2, 149.5, 142.2, 141.6, 139.1, 128.7, 123.4, 90.3, 80.9, 74.3, 70.6, 62.8, 20.7, 20.4, 20.3; ESIMS *m/z*: 470.39 [M+H]⁺. Anal. Calcd for C₁₈H₂₀FN₅O₉: C, 46.06; H, 4.29; N, 14.92. Found: C, 46.45; H, 4.48; N, 14.67.

4.3. General procedure for the preparation of unprotected nucleosides 4a–e

The protected nucleosides **3a–e** (1 mmol) were treated with ammonia/MeOH (saturated at 0 °C, 41.8 mL) overnight at room temperature. The solvent was evaporated under reduced pressure to afford pure **4a–e**, in 74–83% yields as white solids.

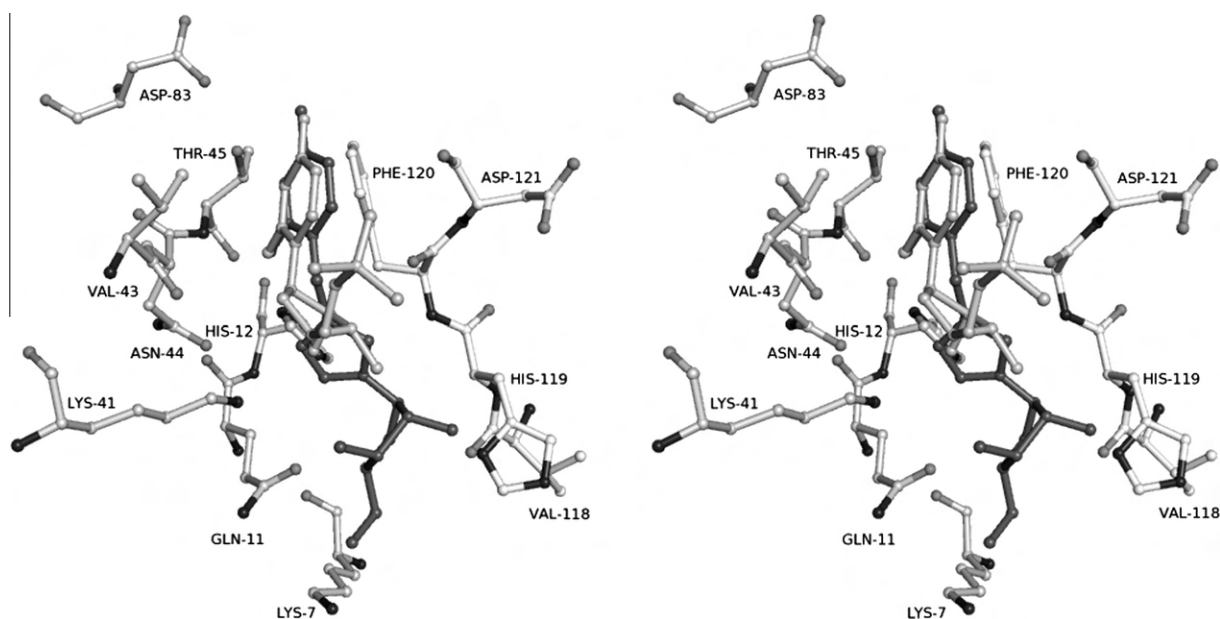


Figure 3. A stereo diagram of the RNase A–**4a** complex structure (grey) superimposed onto the RNase A–U-5'-P complex structure¹⁰ (white). Ligand molecules, **4a** and U-5'-P, are in grey and white, respectively.

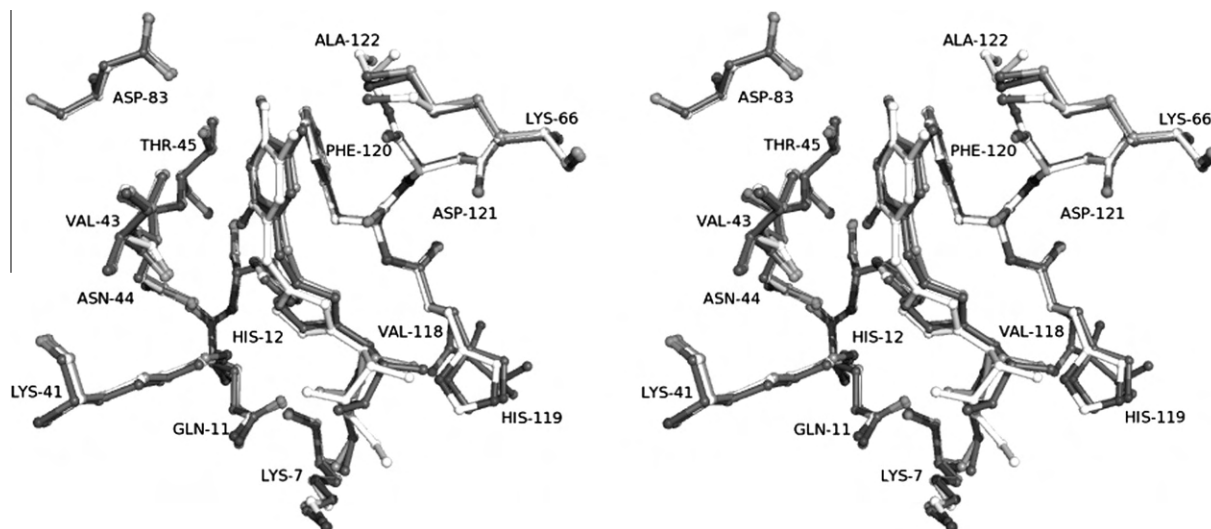


Figure 4. A stereo diagram of the with the superimposed structures of the three RNase A inhibitor complexes at the active site. Coloring scheme used for the complexes is **4a** grey, **4b** white, and **4e** black.

4.3.1. 1-[(β -D-Ribofuranosyl)-1,2,3-triazol-4-yl]juracil (**4a**)

Yield 82%; $R_f = 0.25$ (EtOAc/MeOH 8.5:1.5); $[\alpha]_D^{22} -4$ (c 0.20, MeOH); λ_{max} 264 nm (ϵ 10255); mp: 97–99 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 10.97 (br s, 1H, NH), 8.30 (s, 1H, Triazole H), 7.75 (d, 1H, $J_{5,6} = 7.9$ Hz, H-6), 5.91 (d, 1H, $J_{1',2'} = 4.8$ Hz, H-1'), 5.58 (m, 2H, H-5 and 3'-OH), 5.22 (d, 1H, $J_{2',\text{OH}2'} = 5.1$ Hz, 2'-OH), 4.95 (m, 3H, CH₂ and 5'-OH), 4.36 (dd, 1H, $J = 4.8$ and 10.2 Hz, H-3'), 4.11 (dd, 1H, $J = 4.6$ and 9.2 Hz, H-2'), 3.96 (dd, 1H, $J = 4.2$ and 8.4 Hz, H-4'), 3.63–3.42 (m, 2H, H-5'). ^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO- d_6) δ 171.4, 163.6, 150.6, 145.4, 142.6, 122.0, 101.2, 91.9, 85.8, 74.9, 70.3, 61.2; ESIMS m/z : 326.27 [M+H]⁺. Anal. Calcd for C₁₂H₁₅N₅O₆: C, 44.31; H, 4.65; N, 21.53. Found: C, 44.19; H, 4.86; N, 21.13.

4.3.2. 1-[(β -D-Ribofuranosyl)-1,2,3-triazol-4-yl]thymine (**4b**)

Yield 78%; $R_f = 0.29$ (EtOAc/MeOH 8.5:1.5); $[\alpha]_D^{22} -8$ (c 0.20, MeOH); λ_{max} 270 nm (ϵ 5184); mp: 76–78 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 11.08 (br s, 1H, NH), 8.28 (s, 1H, Triazole H), 7.63 (s, 1H, H-6), 5.91 (d, 1H, $J_{1',2'} = 4.7$ Hz, H-1'), 5.56 (d, 1H, $J_{3',\text{OH}3'} = 5.8$ Hz, 3'-OH), 5.22 (d, 1H, $J_{2',\text{OH}2'} = 4.9$ Hz, 2'-OH), 4.96 (t, 1H, $J = 5.0$ Hz, 5'-OH), 4.91 (s, 2H, CH₂), 4.36 (dd, 1H, $J = 4.3$ and 9.0 Hz, H-3'), 4.09 (d, 1H, H-2'), 3.96 (dd, 1H, $J = 3.4$ and 7.4 Hz, H-4'), 3.63–3.45 (m, 2H, H-5'), 1.76 (s, 3H, CH₃). ^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO- d_6) δ 164.2, 150.6, 142.7, 141.1, 122.0, 108.8, 91.9, 85.8, 74.9, 70.3, 61.2, 22.4, 11.9; ESIMS m/z : 340.33 [M+H]⁺. Anal. Calcd for C₁₃H₁₇N₅O₆: C, 46.02; H, 5.05; N, 20.64. Found: C, 46.35; H, 4.88; N, 20.52.

4.3.3. 1-[(β -D-Ribofuranosyl)-1,2,3-triazol-4-yl]5-bromouracil (**4c**)

Yield 74%; $R_f = 0.4$ (EtOAc/MeOH 8.5:1.5); $[\alpha]_D^{22} -4$ (c 0.20, MeOH); λ_{max} 280 nm (ϵ 9785); mp: 176–178 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 11.65 (br s, 1H, NH), 8.35 (s, 1H, Triazole H), 8.31 (s, 1H, H-6), 5.91 (d, 1H, $J_{1',2'} = 4.7$ Hz, H-1'), 5.56 (d, 1H, $J_{3',\text{OH}3'} = 6.1$ Hz, 3'-OH), 5.22 (d, 1H, $J_{2',\text{OH}2'} = 5.2$ Hz, 2'-OH), 4.97 (m, 2H, CH₂ and 5'-OH), 4.37 (dd, 1H, $J = 5.2$ and 10.6 Hz, H-3'), 4.11 (dd, 1H, $J = 4.9$ and 9.5 Hz, H-2'), 3.96 (dd, 1H, $J = 4.3$ and 8.4 Hz, H-4'), 3.62–3.45 (m, 2H, H-5'). ^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO- d_6) δ 159.6, 150.0, 145.1, 142.3, 122.1, 94.9, 91.9, 85.8, 74.9, 70.3, 61.2, 42.7; ESIMS m/z : 405.19 [M+H]⁺. Anal. Calcd for C₁₂H₁₄BrN₅O₆: C, 35.66; H, 3.49; N, 17.33. Found: C, 35.91; H, 3.25; N, 17.53.

4.3.4. 1-[(β -D-Ribofuranosyl)-1,2,3-triazol-4-yl]5-chlorouracil (**4d**)

Yield 79%; $R_f = 0.38$ (EtOAc/MeOH 8.5:1.5); $[\alpha]_D^{22} -4$ (c 0.20, MeOH); λ_{max} 277 nm (ϵ 7550); mp: 103–105 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 10.94 (br s, 1H, NH), 8.32 (s, 1H, Triazole H), 8.28 (s, 1H, H-6), 5.91 (d, 1H, $J_{1',2'} = 4.8$ Hz, H-1'), 5.57, 5.23 (2 br s, 2H, 3'-OH and 2'-OH), 4.96 (m, 3H, CH₂ and 5'-OH), 4.36 (t, 1H, H-3'), 4.10 (t, 1H, H-2'), 3.96 (dd, 1H, $J = 4.2$ and 8.4 Hz, H-4'), 3.62–3.44 (m, 2H, H-5'). ^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO- d_6) δ 159.4, 149.8, 142.8, 142.6, 142.3, 122.2, 106.4, 91.9, 85.7, 74.8, 70.3, 42.8; ESIMS m/z : 360.71 [M+H]⁺. Anal. Calcd for C₁₂H₁₄ClN₅O₆: C, 40.07; H, 3.92; N, 19.47. Found: C, 39.97; H, 4.19; N, 19.16.

4.3.5. 1-[(β -D-Ribofuranosyl)-1,2,3-triazol-4-yl]5-fluorouracil (**4e**)

Yield 83%; $R_f = 0.32$ (EtOAc/MeOH 8.5:1.5); $[\alpha]_D^{22} -4$ (c 0.20, MeOH); λ_{max} 271 nm (ϵ 3645); mp: 63–65 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 10.73 (br s, 1H, NH), 8.31 (s, 1H, Triazole H), 8.19 (d, 1H, $J_{6,F} = 6.6$ Hz, H-6), 5.91 (d, 1H, $J_{1',2'} = 4.3$ Hz, H-1'), 5.58, 5.24 (2 br s, 2H, 3'-OH and 2'-OH), 4.96, 4.91 (2s, 3H, 5'-OH and CH₂), 4.35 (m, 1H, H-3'), 4.10 (m, 1H, H-2'), 3.95 (m, 1H, H-4'), 3.62–3.46 (m, 2H, H-5'). ^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO- d_6) δ 160.5, 152.5, 145.6, 143.5, 142.0, 125.4, 95.0, 89.0, 78.2, 73.5, 64.4, 45.8; ESIMS m/z : 344.29 [M+H]⁺. Anal. Calcd for C₁₂H₁₄FN₅O₆: C, 41.99; H, 4.11; N, 20.40. Found: C, 42.35; H, 3.92; N, 20.69.

4.4. Preparation of uridines **6a–e**

A mixture of commercially available β -D-ribose tetraacetate (6.28 mmol) with pyrimidine base (8.8 mmol), 30.8 mL of acetonitrile, hexamethyldisilazane (10.9 mmol, 1.24 equiv), saccharine (0.4 mmol, 0.046 equiv) and trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate (8.8 mmol, 1.4 equiv) was taken in a Erlenmeyer flask. The Erlenmeyer flask was placed in a microwave oven and irradiated under at low power (100 W) for 3 min. The reaction mixture was cooled at room temperature, neutralized with aqueous sodium bicarbonate, and extracted with CH₂Cl₂. The organic extract was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. The residue was purified by column chromatography eluting with AcOEt/hexane 7:3, resulting in the desired nucleosides **5a–e**, in 75–82% yields. Finally, the protected nucleosides **5a–e** (1 mmol) were treated with ammonia/MeOH (saturated at 0 °C,

Table 3
Crystallographic statistics

RNase complex	4a	4b	4c
Experiment	10 mM (3 h)	10 mM (19 h)	10 mM (19 h)
Resolution (Å)	30–1.7	30–1.80	30–1.90
Outermost shell (Å)	1.79–1.70	1.9–1.8	2.0–1.9
Reflections measured	95436	157333	72335
Unique reflections	25105	22087	18814
R_{sym}^a	0.051 (0.195)	0.100 (0.441)	0.072 (0.312)
Completeness (%) ^a	96.6 (78.1)	99.7 (99.7)	99.6 (98.9)
$\langle I/\sigma \rangle^a$	15.1 (3.2)	12.4 (2.8)	12.7 (2.8)
R_{cryst}^a	0.187 (0.229)	0.199 (0.241)	0.175 (0.206)
R_{free}^a	0.237 (0.295)	0.257 (0.332)	0.236 (0.271)
No of solvent molecules	334	246	324
r.m.s. deviation from ideality			
in bond lengths (Å)	0.007	0.006	0.007
in angles (°)	1.3	1.2	1.2
Average B factor			
Protein atoms (Å ²)	16.5/18.0	16.7/16.9	17.7/18.1
(molecule A/molecule B)			
Solvent molecules (Å ²)	24.3	22.9	25.5
Ligand atoms (Å ²)	30.1	30.2	42.0
PDB entry	4G8V	4G8Y	4G90

^a Values in parentheses are for the outermost shell.

41.8 mL) overnight at room temperature. The solvent was evaporated under reduced pressure to give compounds **6a–c**, in 85–92% yields. Chemical and physical properties of the ribofuranosyl nucleosides were in agreement with previous data.^{31–35}

4.5. Enzyme kinetics

Bovine pancreatic RNase A (type XII-A), yeast tRNA and other chemicals were obtained from Sigma–Aldrich (Athens, Greece). Concentrations of the RNase A solutions were determined spectrophotometrically using absorption coefficient $\epsilon_{278.5} = 9800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.³⁶ The Ribonuclease A activity assay used was adapted from the procedure described by Anfinsen et al.³⁷ and Slifman et al.³⁸ Briefly, yeast tRNA was solubilized in a 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 at concentrations varying from 2 μM to 7 μM . The final volume of the reaction was 300 μl . tRNA solutions were incubated at 30 °C for 10 min. 10 nM RNase A diluted in 0.1 M sodium acetate/acetic acid buffer, pH 6.0, and added to the reaction mixture. The reaction was stopped one minute later by the addition of 300 μl of fresh ice-cold solution of 40 mM lanthanum nitrate, 6% v/v perchloric acid. Stopped reactions were maintained on ice for 15 min, and insoluble tRNA was removed by centrifugation at 4 °C for 15 min at 14,500 rpm on a bench centrifuge. 50 μl of the supernatant was taken and diluted to 1 ml. The amount of cleaved tRNA was determined from the ultraviolet absorbance at 260 nm (A_{260}) of the supernatant fraction. The same procedure was repeated, by adding different concentrations of the inhibitors in the tRNA solutions as described in the text. Preliminary experiments where RNase A solutions were incubated with the inhibitors before starting the reaction did not show any difference in the reaction rate. Calculations included the following approximations: the average molecular weight (Mr) of tRNA as Mr 28,100 (75–90 ribonucleotides/tRNA molecule X Mr 341/ribonucleotide), with A_{260} of 1.0 corresponding to 40 μg of RNA.³

4.6. Crystallization, data collection and structure refinement

The protein–ligand complexes were formed by soaking native crystals of RNase A grown in the monoclinic lattice C2 as described previously⁶ with each of the compounds in a buffered solution (20 mM sodium citrate pH 5.5, 25% PEG 4000), prior to data collection (experiment conditions are shown in Table 3). X-ray diffraction data were collected on an Oxford Diffraction SuperNova

source diffractometer with a 135 mm Atlas CCD area detector using Nova microfocuss Cu-K α radiation source ($\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$) at 100 K using a cryoprotectant solution of the crystallization medium supplemented with 20% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol. Data processing was performed with CrysAlis^{Pro}³⁹ and scaled using SCA-LA from CCP4 program suite.⁴⁰ The crystal structure of the free RNase A¹⁶ was used as a starting model, building was performed with COOT⁴¹, and refinement using the maximum likelihood target function as implemented in the program PHENIX.⁴² Inhibitor molecules were modeled using the Dundee PRODRG server (<http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrgr/>) and they were fitted in the electron density maps by adjustment of their torsion angles during the final stages of the refinement. Details of data processing and refinement statistics are provided in Table 3. The stereochemistry of the protein residues was validated by MolProbity.⁴³ Hydrogen bonds and van der Waals interactions were calculated with the program CONTACT as implemented in CCP4⁴⁰ applying a distance cut off 3.3 and 4.0 Å, respectively. Solvent accessible areas were calculated with the program NACCESS.⁴⁴ Figures were prepared with the program Pymol.⁴⁵

Acknowledgments

We would like to thank S. Karoulias, for preliminary work with the inhibitors. This work was supported by the Hellenic General Secretariat for Research and Technology (GSRT), through a Joint Research and Technology project between Greece and France (2010–2012) and in part by the Postgraduate Programmes ‘Biotechnology–Quality assessment in Nutrition and the Environment’, ‘Application of Molecular Biology–Molecular Genetics–Molecular Markers’, Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2012.09.067>.

References and notes

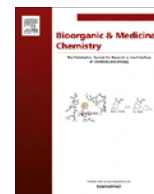
- Loverix, S.; Steyaert, J. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 779.
- Folkman, J. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 273.
- Boix, E.; Torrent, M.; Sanchez, D.; Nogues, M. V. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2008**, *9*, 141.
- Rosenberg, H. F. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2008**, *9*, 135.
- Raines, R. T. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1045.
- Leonidas, D. D.; Shapiro, R.; Irons, L. I.; Russo, N.; Acharya, K. R. *Biochemistry* **1997**, *36*, 5578.
- Leonidas, D. D.; Shapiro, R.; Irons, L. I.; Russo, N.; Acharya, K. R. *Biochemistry* **1999**, *38*, 10287.
- Leonidas, D. D.; Chavali, G. B.; Oikonomakos, N. G.; Chrysina, E. D.; Kosmopoulou, M. N.; Vlassi, M.; Frankling, C.; Acharya, K. R. *Protein Sci.* **2003**, *12*, 2559.
- Hatzopoulos, G. N.; Leonidas, D. D.; Kardakaris, R.; Kobe, J.; Oikonomakos, N. G. *FEBS J.* **2005**, *272*, 3988.
- Tsirkone, V. G.; Dossi, K.; Drakou, C.; Zographos, S. E.; Kontou, M.; Leonidas, D. D. *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2009**, *65*, 671.
- Yakovlev, G. I.; Mitkevich, V. A.; Makarov, A. A. *Mol. Biol.* **2006**, *40*, 867.
- Pace, H. C.; Garrison, P. N.; Robinson, A. K.; Barnes, L. D.; Draganescu, A.; Rosler, A.; Blackburn, G. M.; Siprashvili, Z.; Croce, C. M.; Huebner, K.; Brenner, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 5484.
- Swarbrick, J. D.; Buyya, S.; Gunawardana, D.; Gayler, K. R.; McLennan, A. G.; Gooley, P. R. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 8471.
- McLennan, A. G. *Pharmacol. Ther.* **2000**, *87*, 73.
- Maiti, T. K.; Soumya, D.; Dasgupta, S.; Pathak, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 1221.
- Leonidas, D. D.; Maiti, T. K.; Samanta, A.; Dasgupta, S.; Pathak, T.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6055.
- Samanta, A.; Leonidas, D. D.; Dasgupta, S.; Pathak, T.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 932.
- Thiyagarajan, N.; Smith, B. D.; Raines, R. T.; Acharya, K. R. *FEBS J.* **2011**, *278*, 541.
- Debnath, J.; Dasgupta, S.; Pathak, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 6491.

20. Debnath, J.; Dasgupta, S.; Pathak, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 4921.
21. Debnath, J.; Dasgupta, S.; Pathak, T. *Chemistry* **2012**, *18*, 1618.
22. Russo, A.; Acharya, K. R.; Shapiro, R. In *Methods of Enzymology*; Nicholson, A. W., Ed.; Academic Press: London, 2001; Vol. 341, pp 629–648.
23. Russo, N.; Shapiro, R. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 14902.
24. Stimac, A.; Kobe, J. *Carbohydr. Res.* **1992**, *232*, 359.
25. Lazrek, H. B.; Taourirte, M.; Oulih, T.; Barascut, J. L.; Imbach, J. L.; Pannecouque, C.; Witrouw, M.; De Clercq, E. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **1949**, *2001*, 20.
26. Vorbruggen, H.; Bennua, B. *Chem. Ber. Recl.* **1981**, *114*, 1279.
27. Hernandes, M. Z.; Cavalcanti, S. M.; Moreira, D. R.; de Azevedo, W. F., Jr.; Leite, A. C. *Curr. Drug Targets* **2010**, *11*, 303.
28. Russo, N.; Shapiro, R.; Vallee, B. L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *231*, 671.
29. Richards, F. M.; Wyckoff, H. W. *The Enzymes* **1971**, *4*, 647.
30. Iwahashi, K.; Nakamura, K.; Mitsui, Y.; Ohgi, K.; Irie, M. *J. Biochem. (Tokyo)* **1981**, *90*, 1685.
31. Beranek, J.; Hrebabecky, H. *Nucleic Acids Res.* **1976**, *3*, 1387.
32. Currid, P.; Wightman, R. H. *Nucleosides Nucleotides* **1997**, *16*, 115.
33. Bavaro, T.; Rocchietti, S.; Ubiali, D.; Filice, M.; Terreni, M.; Pregnotato, M. *Eur. J. Org. Chem.* **1967**, *2009*.
34. Kumar, V.; Malhotra, S. V. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2009**, *28*, 821.
35. Yamamoto, Y.; Shimokawa, K.; Tanaka, K.; Hisanaga, Y. U.S. Patent 4847, **1989**, 366.
36. Sela, M.; Anfinsen, C. B. *Biochim. Biophys. Acta* **1957**, *24*, 229.
37. Anfinsen, C. B.; Redfield, R. R.; Choate, W. L.; Page, J.; Carroll, W. R. *J. Biol. Chem.* **1954**, *207*, 201.
38. Slifman, N. R.; Leogering, D. A.; McKean, D. J.; Gleich, G. J. *J. Immunol.* **1986**, *137*, 2913.
39. CrysAlisPro Software system, 2011. Agilent Technologies UK Ltd., Oxford, U.K.
40. CCP4. *Acta Crystallogr.* **1994**, *D 50*, 760.
41. Emsley, P.; Cowtan, K. *Acta Crystallogr., D: Biol. Crystallogr.* **2004**, *60*, 2126.
42. Adams, P. D.; Afonine, P. V.; Bunkoczi, G.; Chen, V. B.; Davis, I. W.; Echols, N.; Headd, J. J.; Hung, L. W.; Kapral, G. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; McCoy, A. J.; Moriarty, N. W.; Oeffner, R.; Read, R. J.; Richardson, D. C.; Richardson, J. S.; Terwilliger, T. C.; Zwart, P. H. *Acta Crystallogr., D: Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 213.
43. Chen, V. B.; Arendall, W. B.; Headd, J. J.; Keedy, D. A.; Immormino, R. M.; Kapral, G. J.; Murray, L. W.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. *Acta Crystallogr., D: Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 12.
44. Hubbard, S. J.; Thornton, J. M. Naccess V2.1.1 1993.
45. DeLano, W.L. *The PyMol Molecular Visualization System*, Sa Carlos, CA, USA, 2002.



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc

Structure based inhibitor design targeting glycogen phosphorylase b. Virtual screening, synthesis, biochemical and biological assessment of novel *N*-acyl- β -D-glucopyranosylamines



Vanessa Parmenopoulou^{a,†}, Anastassia L. Kantsadi^{a,†}, Vicky G. Tsirkone^{a,†,‡}, Demetra S. M. Chatzileontiadiou^a, Stella Manta^a, Spyros E. Zographos^b, Christina Molfeta^a, Georgios Archontis^c, Loranne Agius^d, Joseph M. Hayes^{e,*}, Demetres D. Leonidas^{a,*}, Dimitri Komiotis^{a,*}

^aLaboratory of Bio-Organic Chemistry, Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, 26 Ploutonos Str., 41221 Larissa, Greece

^bInstitute of Biology, Medicinal Chemistry and Biotechnology, National Hellenic Research Foundation, Athens, Greece

^cDepartment of Physics, University of Cyprus, Nicosia, Cyprus

^dInstitute of Cellular Medicine, Newcastle University, Newcastle upon Tyne NE2 4HH, UK

^eCentre for Materials Science, Division of Chemistry, University of Central Lancashire, Preston PR1 2HE, UK

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 April 2014

Revised 20 June 2014

Accepted 30 June 2014

Available online 16 July 2014

Keywords:

Glycogen metabolism

Diabetes type 2

Inhibitor

Glycogen phosphorylase

X-ray crystallography

N-Acyl- β -D-glucopyranosylamines

Virtual screening

Consensus scoring

ABSTRACT

Glycogen phosphorylase (GP) is a validated target for the development of new type 2 diabetes treatments. Exploiting the Zinc docking database, we report the *in silico* screening of 1888 *N*-acyl- β -D-glucopyranosylamines putative GP inhibitors differing only in their R groups. CombiGlide and GOLD docking programs with different scoring functions were employed with the best performing methods combined in a 'consensus scoring' approach to ranking of ligand binding affinities for the active site. Six selected candidates from the screening were then synthesized and their inhibitory potency was assessed both *in vitro* and *ex vivo*. Their inhibition constants' values, *in vitro*, ranged from 5 to 377 μ M while two of them were effective at causing inactivation of GP in rat hepatocytes at low μ M concentrations. The crystal structures of GP in complex with the inhibitors were defined and provided the structural basis for their inhibitory potency and data for further structure based design of more potent inhibitors.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Glycogen phosphorylase (GP), an enzyme that catalyzes the first step of intracellular degradation of glycogen to Glc-1-P,¹ has been an important target for the discovery of novel hypoglycaemic agents, both synthetic and natural.^{1–5} The efficacy of such inhibitors on blood glucose control and hepatic glycogen balance has been confirmed from biological studies.^{6–10} GP is an allosteric

Abbreviations: GP, glycogen phosphorylase; GPb, rabbit muscle glycogen phosphorylase b; GPa, rat hepatocytes glycogen phosphorylase a; PLP, pyridoxal 5'-phosphate; Glc-1-P, α -D-glucose 1-phosphate; rmsd, root-mean-square deviation; DMF, *N,N*-dimethylformamide; MeOH, methanol; Et₃N, triethylamine.

* Corresponding authors. Tel.: +44 1772894334; fax: +44 (0) 1772 894981 (J.M.H.); tel.: +30 2410 565278; fax: +30 2410 565290 (D.D.L.); tel.: +30 2410 565285; fax: +30 2410 565290 (D.K.).

E-mail addresses: jhayes@uclan.ac.uk (J.M. Hayes), ddleonidas@bio.uth.gr (D.D. Leonidas), dkom@bio.uth.gr (D. Komiotis).

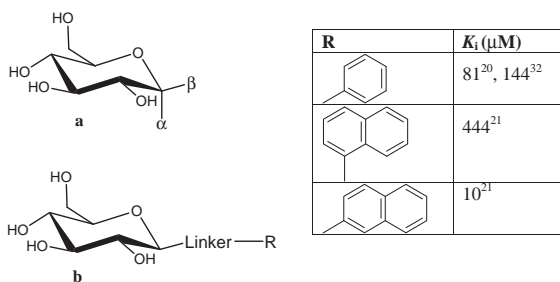
[†] Authors contributed equally to this work.

[‡] Current work address: Laboratory for Biocrystallography, Department of Pharmaceutical and Pharmacological Sciences, KU Leuven, Belgium.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2014.06.058>

0968-0896/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

enzyme, which exists in two interconvertible forms GP_a (phosphorylated, active, high substrate affinity) and GP_b (unphosphorylated, inactive, low substrate affinity).¹ Apart from the catalytic site at the centre of the GP structure, X-ray crystallography has revealed the existence of another four regulatory peripheral sites.¹ These include the inhibitor site at the entrance of the active site (most potent inhibitor for this site is a 4-chloro derivative of flavopyridol with $K_i = 0.83 \mu$ M for GP_b¹¹), the allosteric site at the surface of the molecule, where the physiological allosteric activator AMP binds (best inhibitor for this site is 1,4-dihydropyridine-2,3-dicarboxylate, $K_i = 1.6$ nM for GP_b¹²), the glycogen storage site (maltoheptaose with $K_i = 1$ mM¹³ is the most potent inhibitor studied for this site thus far), and the new allosteric site located at the dimer interface (CP526423, an indole-2-carboxamide derivative with $IC_{50} = 6$ nM¹⁴ for GP_a is the most potent inhibitor for this site thus far). Recently, another distinct binding site named quercetin binding site since it binds quercetin ($IC_{50} = 4.8 \mu$ M for GP_a¹⁵), has been reported.¹⁶ The main physiological inhibitor of GP is α -D-glucose, albeit a weak inhibitor (K_i values of 1.7¹⁷ or 3.2¹⁸ mM for GP_b



Scheme 1. (a) glucose based analogues with α - and β -substituents at the C1 atom; (b) glucose based analogues with linker which connects the glucose moiety with an R group. The –NHCO–linker was investigated in this work.

and 4.9¹⁸ mM for GP α , respectively). Glucose, in a self-regulated system, inhibits glycogen degradation and induces glycogen synthesis by acting directly on GP,¹ and as result lowers blood glucose levels. It has been postulated that glucose analogs with greater inhibitory potency for GP than glucose might be more effective regulators in lowering blood glucose levels.¹⁷ Inhibition of the catalytic site of the enzyme has therefore been probed with glucose based analogues,¹⁹ designed on the basis of information derived from the crystal structure of the T-state GP β - α -D-glucose complex.¹⁷ These inhibitors mainly have α - and β -substituents at the C1 atom of the glucose moiety^{2,19} with the β -substituents aiming to exploit interactions with the catalytic subsite called β -cavity, an empty space within the catalytic site opposite to β -substituents of atom C1 of glucose which is lined by both polar and non-polar groups.¹ A key structural feature of glucose based ligands is the so called linker which connects the glucose moiety with an R group (Scheme 1). One such linker is the –NHCO– group and has led to the identification of ligands in the μ M range for GP inhibition.^{20–22} Using this linker, however, only selected R groups have been previously studied towards exploiting the β -cavity features. Hence in the current work we have adopted a more systematic approach and used a virtual screening methodology to discover new –R groups. Docking using both the Glide (CombiGlide)^{23,24} and GOLD²⁵ programs with different scoring functions was employed for this purpose, with the final ranking of ligand potencies based on a consensus scoring approach²⁶ combining the best performing scoring functions based on calculations for a training set of ligands. The diverse set of R groups for virtual screening was derived from acid chloride (RCOCl) molecules downloaded from the Zinc docking database.²⁷ The structural variance of the *N*-acyl- β -D-glucopyranosylamines (β -D-Glcp-NHCO-R) is limited to different R groups from the acid chlorides available in the Zinc docking database, but with 1888 different variations ultimately screened. Selected candidates from the virtual screening were then experimentally evaluated. Absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) property predictions from the QikProp program²⁴ allowing us to select a final set of β -D-Glcp-NHCO-R ligands with drug-like properties as a criterion for further evaluation.^{28,29} Thus, we also report here the synthesis of novel *N*-acyl- β -D-glucopyranosylamine type inhibitor series (S) shown in Table 1 and their biochemical and ex vivo assessment. We have determined the crystal structures of their complexes with GP β to analyze the molecular interactions that govern molecular recognition by the catalytic site of the enzyme with emphasis in the β -pocket environment.

2. Materials and methods

2.1. Virtual screening

2.1.1. Protein preparation

The GP β receptor structure was prepared for modeling using the 2.15 Å resolution GP β -*N*-4-phenylbenzoyl-2-*N'*- β -D-glycopyr-

anosyl urea crystal complex³⁰ (PDB ID: 2QLN). This receptor was chosen based on its previous performance in docking studies, its co-crystallized ligand having a bulkier R substituent which opens up the β -cavity in regions complementary to binding of the other ligands.⁴ Schrödinger's 'Protein Preparation Wizard'²⁴ was used for the preparation with water molecules within 5 Å of the ligand initially retained, but deleted for subsequent docking. Bond orders were assigned and hydrogen atoms added, with protonation states for basic and acidic residues based on residue pK_a's at normal pH (7.0). However, subsequent optimization of hydroxyl groups, histidine C/N atom 'flips' and protonation states, and side chain O/N atom 'flips' of Asn and Gln residues was based on optimizing hydrogen bonding patterns, so that the final assignments were checked on visual inspection of the protein. In particular, all final His residues were assigned as neutral, either in a HIE or HID state. The PLP co-factor was used in its mono-anion form. Finally, the system was softly minimized using Impref and the OPLS-AA(2005) forcefield³¹ with the root-mean-square deviation (RMSD) of heavy atoms kept within 0.3 Å of the crystallographic positions.

2.1.2. Ligand preparation

The training set of 40 ligands (Table S1) was selected from previous studies^{2,32} with K_i values ranged from 0.35 μ M to no inhibition. For consistency, a similar protocol for preparation of both the training and screening set ligands was used. In effect, the training set –R groups were first built as acid chlorides using Maestro and LigPrep. The acid chlorides were then 'reacted' at a β -D-glucopyranose-NH₂ attachment point (–NH₂) using modules from the combinatorial screening CombiGlide program of Schrodinger²⁴ in a manner that reflected the actual synthetic routine (Scheme 2). For the virtual screening set, the acid chloride molecules were downloaded in pre-determined low energy conformations (any relevant tautomers/ionization states included) from the Zinc database. To ensure that the final ligands were 'drug-like', the following criteria were used as filters: the structural pattern –C(Cl)=O, 0 \leq MW \leq 250 amu and 0 \leq rotatable bonds \leq 4. A 1888 ligand screening set resulted. In effect, the CombiGlide workflow provided a 3D minimized structure of a molecule that contains a 'core' (in this case D-glucose) and a defined attachment point for a set of reagents. CombiGlide exploits the program LigPrep for this purpose with the final structures ready to be employed in the docking studies.

2.1.3. CombiGlide docking

In the docking calculations with CombiGlide 2.6,²⁴ the shape and properties of the catalytic binding site were mapped onto grids with dimensions of 28.6 \times 28.6 \times 28.6 Å centred on the native 2QLN ligand. Standards parameters were applied including van der Waals scaling for non-polar atoms (by 0.8) to include modest 'induced-fit' effects. Positional constraints were applied on the hydroxyl (–OH) groups of glucose.³³ Glide standard (SP) and extra-precision (XP) modes were used.

2.1.4. GOLD docking

In the docking calculations with GOLD 5.0,²⁵ all atoms and their associated residues within 10 Å of the ligand were used to define the active site. The information about the ligand hydrogen-bonding interactions and conformation was encoded into the corresponding genetics algorithms (GA) of GOLD GoldScore, ChemScore, ASP and ChemPLP using the default GA parameters. Scaffold constraints were applied for the glucose ring atoms with weight 1.0 Å.

2.1.5. Consensus scoring

In combining the results from individual docking methods, the ranks from the best performing scoring functions were added to

Table 1
The chemical structures of the inhibitors studied with the K_i values for each inhibitor

Compound	Chemical structure	K_i (μM)
F		3.5 ²¹
S1		5.14 ± 0.77
S2		48.68 ± 4.49
S3		8.25 ± 0.77
S6		4.98 ± 0.58
S20		376.87 ± 17.04
S21		75.29 ± 6.96

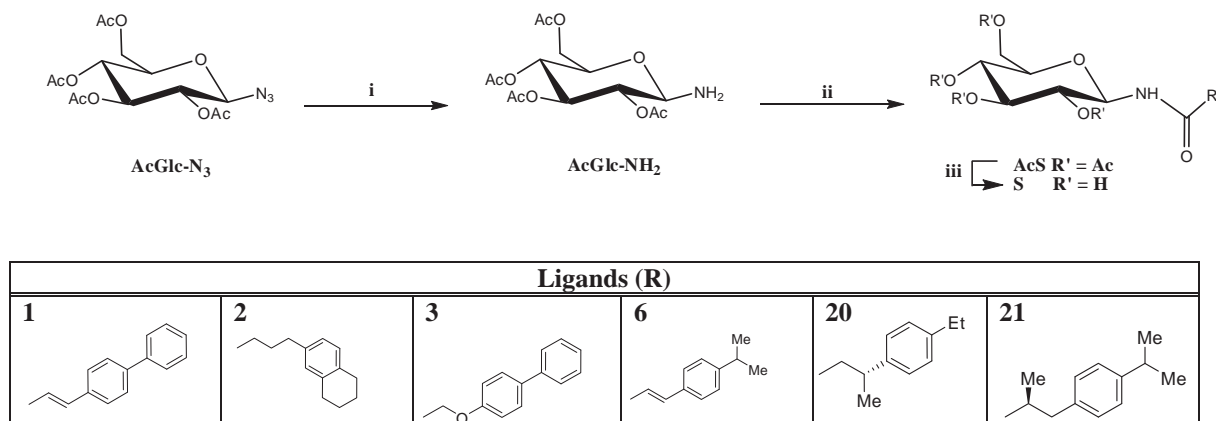
The best analogous, previously studied inhibitor (**F**) is also shown.

give a rank-sum for each ligand, otherwise known as a Simple Sum Rank.²⁶

2.1.6. Statistical analysis of docking performance

For the training set, performance with respect to recovery of the actives (top 10 inhibitors) was analyzed in a statistical manner.^{34–37} Since only a small fraction of a database is tested experimentally in practical VS studies, it is important to recognize actives or leads as 'early' as possible. We therefore examined several metrics ranging

from the commonly used hit rate and enrichment factor (EF), to those that better highlight 'early recognition'. Hit-rate is the simplest metric and represented the % of actives in the predicted top 10 ligands for a particular docking method. The EF may be defined as the ratio of the number of actives retrieved relative to the number of database molecules tested. An EF is often described with respect to a given percentage of the database screened. In general, if n represents the total number of actives and N represents the total number of molecules in the database, then if there are n_a



Scheme 2. Reagents and conditions: (i) H₂, 10% Pd/C, EtOAc, 20 °C, 24 h; (ii) DMF, RCOCl, Et₃N, room temperature, 1 h; (iii) ammonia/MeOH or MeOH, methanolic NaOMe (1 M), amberlyst 15 (H⁺ form), room temperature.

actives among the $N_{x\%}$ molecules in the first $x\%$ of the database screened, the EF is given by Mackey and Melville³⁸

$$EF_{x\%} = \frac{n_a/N_{x\%}}{n/N} \quad (1)$$

In our case we are looking at simply recovery of $n_a = 10$ actives in a set of $N = 40$ ligands, where $x\% = 25\%$. A receiver operator characteristic (ROC) plot is conceptually similar to an enrichment plot and shows the relationship between the true positive rate (TPR, or sensitivity) and the false positive rate (FPR, or specificity).³⁹ The Area Under the ROC curve (AU-ROC) is a common way to summarize the overall quality of a ROC plot.

$$AUC = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (1 - f_i) \quad (2)$$

where f_i is the fraction of decoys or non-actives ranked higher than the i th active. The value of the AU-ROC varies between 0 and 1, where 1 represents a perfect ranking (all actives ranked above the decoys) while 0.5 corresponds to a random ranking. However, EF and AU-ROC values do not distinguish early and late performance.³⁴ Accordingly, we also used the metric 'sum of logarithms of ranks' (SLR) which emphasizes on the 'early recognition' of actives. The SLR metric is calculated as:

$$SLR = -\sum_{i=1}^n \log\left(\frac{r_i}{N}\right) \quad (3)$$

where r_i is the rank of the i th active. The negative logarithm emphasizes early recognition. Noting that for an ideal case, a VS method would rank all actives within the first n positions, a theoretical maximum SLR may be calculated as:

$$SLR_{\max} = -\sum_{i=1}^n \log\left(\frac{i}{N}\right) \quad (4)$$

This allows a normalized SLR (NSLR) to be calculated as:

$$NSLR = \frac{SLR}{SLR_{\max}} \quad (5)$$

This metric ranges from 0 to 1 (best achievable ranking).

2.1.7. Screening set analysis/candidate selection

2.1.7.1. (a) Consensus scoring. Based on the training set results and a statistical evaluation of the performance of the different docking methods and their combination in consensus scoring, the protocol employed for final re-ranking of the screening set ligands was a Simple Sum Rank^{26,40,41} of Glide-SP and

GOLD-ChemPLP individual rankings. A Simple Sum Rank value of <150 was chosen as the cut off for the 'final set' of ligands. Votes (coarse quantile voting)²⁶ received by the final set of ligands from other scoring functions/algorithms if ranked in the top ~1.5% and top ~4% with these methods were considered as a criteria in selecting ligands for synthesis; a minimum–maximum of 0–3 votes was possible, one from each of GOLD-ChemScore, -GoldScore, ASP.

2.1.7.2. (b) ADME property predictions. QikProp from Schrödinger²⁴ was used for ADME properties predictions allowing us to select ligands with drug-like properties as an extra criteria.^{28,29} Specifically, Lipinski's rules of five⁴² [MW < 500, log P < 5, HBA < 10, and HBD < 5] and Jorgensen's rule of three⁴³ [log S > -5.7, Caco-2 permeability > 22 nm/s, number of primary metabolites < 7] were applied to predict oral bioavailability. Default settings were employed for these calculations.

2.1.7.3. (c) Ligand 2D fingerprint calculations. For the 'final set' of ligands based on Simple Sum Rank (<150), 2D fingerprints for the unbound ligands (type: linear with atoms distinguished by ring size, aromaticity, hydrogen bond acceptor/donor (HBA/HBD), ionization potential, whether terminal, whether halogen and bonds distinguished by bond order) were calculated using the related Schrodinger cheminformatics python script. Canvas similarity (Tanimoto coefficient) and clustering of the fingerprints (average linkage method) was then computed.²⁴ The result was grouping of the final 29 compounds into 15 families (Table S3).

2.2. Chemistry

Thin layer chromatography (TLC) was performed on Merck pre-coated 60F254 plates. Reactions were monitored by TLC on silica gel, with detection by UV light (254 nm) or by charring with sulfuric acid. Flash column chromatography was performed using silica gel (240–400 mesh, Merck). ¹H and ¹³C NMR spectra were obtained at room temperature with a Varian 500 spectrometer at 500 and 125 MHz, respectively, using chloroform-*d* (CDCl₃) and dimethylsulfoxide-*d*₆ (DMSO-*d*₆) with internal tetramethylsilane (TMS). The ¹H assignments were based on ¹H–¹H COSY experiments executed using standard Varian software. Chemical shifts (δ) were given in ppm measured downfield from TMS, and spin–spin coupling constants are in Hz. Mass spectra were obtained on a ThermoQuest Finnigan AQA Mass Spectrometer (electrospray ionization). Optical rotations were measured using an Autopol I polarimeter. The IR spectra were obtained with a Thermo Scientific Nicolet IR100 FTIR spectrometer.

All reactions sensitive to oxygen or moisture were carried out under nitrogen atmosphere using oven-dried glassware. DMF and MeOH were stored over 3E molecular sieves. 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl azide (**AcGlc-N₃**) was prepared according to the procedures described in literature and its chemical and physical properties were in agreement with previous data.⁴⁴

2.2.1. General procedure for preparation of the 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosylamine (**AcGlc-NH₂**)

After two vacuum/H₂ cycles to remove air from the reaction tube, the stirred mixture of azide **AcGlc-N₃** (5.00 g, 13.4 mmol) and 10% Pd/C (0.95 g) in ethyl acetate (EtOAc, 184.6 mL) was hydrogenated at ambient pressure (balloon) and temperature (ca. 20 °C) for 24 h. The reaction mixture was filtered and the filtrate was concentrated in vacuum. The residue was purified by flash column chromatography using EtOAc. The spectroscopic properties of amine **AcGlc-NH₂** were in agreement with previous data.⁴⁵

2.2.2. General procedure for preparation of the N-acyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosylamines (**AcS**)

To a stirred mixture of **AcGlc-NH₂** (1.44 mmol) in 3 ml anhydrous DMF and Et₃N (0.96 mmol) the corresponding acylating agent RCOCl (**1**, **2**, **3**, **6**, **20**, **21**) (0.96 mmol) was added in one portion. The reaction mixture was left for 1 h at room temperature, then concentrated and the residue was purified by flash chromatography to give the desired analogues **AcS** as foams.

2.2.2.1. N-(E)-3-(Biphenyl-4-yl)acryloyl-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-amine (**AcS1**).

White foam, 68% yield; R_f = 0.30 (*n*-hexane/EtOAc 1:1); $[\alpha]_D^{22}$ +6 (c 0.20, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.69 (d, 1H, *J* = 15.7 Hz, CH=CH), 7.64–7.37 (m, 9H, ArH), 6.42 (d, 1H, *J* = 9.4 Hz, NH), 6.36 (d, 1H, CH=CH), 5.44–5.33 (2pseudo t, 2H, *J* = 9.4, 9.5 Hz, H-1, H-3), 5.11 (t, 1H, *J* = 9.8 Hz, H-4), 5.01 (t, 1H, *J* = 9.6 Hz, H-2), 4.35 (dd, 1H, *J* = 4.3, 12.6 Hz, H-6a), 4.11 (dd, 1H, *J* = 1.9, 12.6 Hz, H-6b), 3.89 (ddd, 1H, *J* = 2.0, 4.1, 10.2 Hz, H-5), 2.09, 2.06, 2.05, 2.04 (4s, 12H, 4OAc); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 171.3, 170.6, 169.9, 169.6, 165.8 (CO), 143.1, 142.9, 140.1, 133.1, 128.9, 128.6, 127.9, 127.5, 127.0, 119.0 (CH=CH and Ar-C), 78.5, 73.6, 72.7, 70.7, 68.1, 61.6 (C-1–C-6), 20.8, 20.7, 20.6 (OCOCH₃); MS (ESI, *m/z*) calcd for C₂₉H₃₂NO₁₀ 554.20, found 554.21 (MH)⁺. Anal. Calcd for C₂₉H₃₁NO₁₀: C, 62.92; H, 5.64; N, 2.53; Found: C, 63.10; H, 5.52; N, 2.74.

2.2.2.2. N-4-(5,6,7,8-Tetrahydronaphthalen-2-yl)butanoyl-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-amine (**AcS2**).

Yellow foam, 63% yield; R_f = 0.6 (*n*-hexane/EtOAc 1:1); $[\alpha]_D^{22}$ –8 (c 0.20, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 6.99–6.86 (m, 3H, ArH), 6.16 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz, NH), 5.34–5.24 (2pseudo t, 2H, *J* = 9.6, 9.5 Hz, H-1, H-3), 5.06 (t, 1H, *J* = 9.9 Hz, H-4), 4.91 (t, 1H, *J* = 9.6 Hz, H-2), 4.32 (dd, 1H, *J* = 4.3, 12.6 Hz, H-6a), 4.07 (dd, 1H, *J* = 1.9, 12.6 Hz, H-6b), 3.82 (ddd, 1H, *J* = 2.0, 4.1, 10.1 Hz, H-5), 2.73 (m, 4H, tetrahydronaphthalene moiety), 2.53 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, CH₂), 2.22–2.15 (m, 2H, CH₂), 2.07, 2.03, 2.02, 2.01 (4s, 12H, 4OAc), 1.94–1.87 (m, 2H, CH₂), 1.80–1.76 (m, 4H, tetrahydronaphthalene moiety); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 173.1, 171.1, 170.6, 169.9, 169.6 (CO), 138.1, 137.1, 134.8, 129.2, 129.0, 125.5 (Ar-C), 78.0, 73.5, 72.6, 70.5, 68.0, 61.6 (C-1–C-6), 35.8, 34.5, 29.3, 29.0, 26.6, 23.2, 23.1 (3CH₂ and 4CH₂ of tetrahydronaphthalene moiety), 20.7, 20.6, 20.5 (OCOCH₃); MS (ESI, *m/z*) calcd for C₂₈H₃₈NO₁₀ 548.25, found 548.63 (MH)⁺. Anal. Calcd for C₂₈H₃₇NO₁₀: C, 61.41; H, 6.81; N, 2.56; Found: C, 61.75; H, 7.14; N, 2.30.

2.2.2.3. N-2-(Biphenyl-4-yloxy)acetyl-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-amine (**AcS3**).

Yellow foam, 83% yield; R_f = 0.33 (*n*-hexane/EtOAc 1:1); $[\alpha]_D^{22}$ –6 (c 0.20, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.56–7.32 (m, 8H, ArH, NH), 6.98 (d,

2H, *J* = 8.7 Hz, ArH), 5.36–5.25 (2pseudo t, 2H, *J* = 9.5, 9.2 Hz, H-1, H-3), 5.10 (t, 1H, *J* = 9.7 Hz, H-4), 5.03 (t, 1H, *J* = 9.6 Hz, H-2), 4.58, 4.45 (q, AB-system, 2H, *J* = 15.2 Hz, CH₂), 4.35 (dd, 1H, *J* = 4.1, 12.6 Hz, H-6a), 4.10 (dd, 1H, *J* = 1.5, 12.6 Hz, H-6b), 3.86 (ddd, 1H, *J* = 1.8, 3.7, 10.0 Hz, H-5), 2.08, 2.03, 2.02, 1.88 (4s, 12H, 4OAc); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 170.6, 170.5, 169.9, 169.5, 169.2 (CO), 156.4, 140.2, 135.3, 128.8, 128.4, 127.0, 126.7, 114.9 (Ar-C), 77.9, 73.6, 72.5, 70.0, 68.0, 67.1, 61.5 (CH₂ and C-1–C-6), 20.7, 20.5, 20.3 (OCOCH₃); MS (ESI, *m/z*) calcd for C₂₈H₃₂NO₁₁ 558.20, found 558.43 (MH)⁺. Anal. Calcd for C₂₈H₃₁NO₁₁: C, 60.32; H, 5.60; N, 2.51; Found: C, 60.72; H, 5.26; N, 2.40.

2.2.2.4. N-(E)-3-(4-Isopropylphenyl)acryloyl-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-amine (**AcS6**).

White foam, 66% yield; R_f = 0.53 (*n*-hexane/EtOAc 1:1); $[\alpha]_D^{22}$ +10 (c 0.20, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.63 (d, 1H, *J* = 15.7 Hz, CH=CH), 7.44 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, ArH cumenyl), 7.25 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, ArH cumenyl), 6.34–6.26 (m, 2H, NH, CH=CH), 5.42–5.32 (2pseudo t, 2H, *J* = 9.4, 9.5 Hz, H-1, H-3), 5.09 (t, 1H, *J* = 9.4 Hz, H-4), 4.99 (t, 1H, *J* = 9.6 Hz, H-2), 4.33 (dd, 1H, *J* = 4.4, 12.5 Hz, H-6a), 4.10 (dd, 1H, *J* = 1.7, 12.5 Hz, H-6b), 3.88 (ddd, 1H, *J* = 2.0, 4.1, 10.0 Hz, H-5), 2.98–2.88 (m, 1H, CH₃–CH–CH₃), 2.08, 2.04, 2.03 (3s, 12H, 4OAc), 1.28 (d, 6H, *J* = 6.8 Hz, CH₃–CH–CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 171.3, 170.6, 169.9, 169.6, 166.0 (CO), 151.6, 143.3, 131.8, 128.2, 127.0, 118.2 (CH=CH and Ar-C), 78.5, 73.5, 72.7, 70.7, 68.2, 61.6 (C-1–C-6), 34.1, 23.8 (CH₃–CH–CH₃), 20.8, 20.7, 20.6 (OCOCH₃); MS (ESI, *m/z*) calcd for C₂₆H₃₄NO₁₀ 520.22, found 520.58 (MH)⁺. Anal. Calcd for C₂₆H₃₃NO₁₀: C, 60.11; H, 6.40; N, 2.70; Found: C, 60.51; H, 6.15; N, 2.31.

2.2.2.5. N-(R)-3-(4-Ethylphenyl)butanoyl-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-amine (**AcS20**).

Yellow foam, 62% yield; R_f = 0.42 (*n*-hexane/EtOAc 3:2); $[\alpha]_D^{22}$ –2 (c 0.20, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.14–7.11 (m, 4H, ArH), 6.23 (d, 1H, *J* = 9.2 Hz, NH), 5.33–5.17 (2pseudo t, 2H, *J* = 9.4, 9.5 Hz, H-1, H-3), 5.04 (pseudo t, 1H, *J* = 9.8 Hz, H-4), 4.87 (pseudo t, 1H, *J* = 9.6 Hz, H-2), 4.32 (dd, 1H, *J* = 4.3, 12.5 Hz, H-6a), 4.06 (dd, 1H, *J* = 2.0, 12.5 Hz, H-6b), 3.80 (ddd, 1H, *J* = 1.9, 4.0, 10.1 Hz, H-5), 3.29–3.18 (m, 1H, CH), 2.65–2.41 (m, 4H, CH₂, CH₂CH₃), 2.08–2.00 (m, 12H, 4OAc), 1.31–1.19 (m, 6H, CH₃, CH₂CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 176.6, 172.0, 171.0, 170.6, 169.6 (CO), 142.7, 142.2, 128.0, 126.6 (Ar-C), 78.0, 73.5, 72.6, 70.4, 68.0, 61.6 (C-1–C-6), 45.3, 42.4, 35.8 (CH and 2CH₂), 28.3, 21.8, 20.7, 20.6, 15.5 (OCOCH₃, CHCH₃, CH₂CH₃); MS (ESI, *m/z*) calcd for C₂₆H₃₆NO₁₀ 522.23, found 522.62 (MH)⁺. Anal. Calcd for C₂₆H₃₅NO₁₀: C, 59.87; H, 6.76; N, 2.69; Found: C, 60.24; H, 6.48; N, 2.98.

2.2.2.6. N-(S)-3-(4-Isopropylphenyl)-2-methylpropanoyl-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-amine (**AcS21**).

Yellow foam, 63% yield; R_f = 0.47 (*n*-hexane/EtOAc 1:1); $[\alpha]_D^{22}$ +2 (c 0.20, CHCl₃); The ¹H NMR spectrum showed hindered rotation around the amide bond. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.13–7.04 (m, 4H, ArH cumenyl), 6.23 (2d, 1H, *J* = 9.3 Hz, NH), 5.33–5.20 (2pseudo t, 2H, *J* = 9.3, 9.5 Hz, H-1, H-3), 5.05 (pseudo t, 1H, *J* = 9.5 Hz, H-4), 4.88 (t, 1H, *J* = 9.6 Hz, H-2), 4.33 (dd, 1H, *J* = 3.6, 12.5 Hz, H-6a), 4.06 (dd, 1H, *J* = 2.0, 12.5 Hz, H-6b), 3.81 (ddd, 1H, *J* = 1.9, 4.9, 9.8 Hz, H-5), 3.02–2.81 (m, 2H, CH₂), 2.57–2.40 (m, 2H, CH, CH₃–CH–CH₃), 2.08, 2.02, 2.01, 1.99 (4s, 12H, 4OAc), 1.22, 1.20 (2d, 6H, *J* = 6.9 Hz, CH₃–CH–CH₃), 1.12, 1.06 (2d, 3H, *J* = 6.7 Hz, CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 176.3, 170.9, 170.6, 169.9, 169.6 (CO), 146.8, 136.3, 128.9, 126.4 (Ar-C), 78.1, 73.5, 72.5, 70.4, 68.1, 61.6 (C-1–C-6), 43.1, 38.9, 33.6 (2CH and CH₂), 24.0, 20.7, 20.6, 20.5, 17.1 (CH₃–CH–CH₃, OCOCH₃, CHCH₃); MS (ESI, *m/z*) calcd for C₂₇H₃₈NO₁₀ 536.25, found 536.38 (MH)⁺. Anal. Calcd for C₂₇H₃₇NO₁₀: C, 60.55; H, 6.96; N, 2.62; Found: C, 60.67; H, 6.72; N, 2.84.

2.3. General procedure for the preparation of the *N*-acyl- β -D-glucopyranosylamines (S)

The *N*-acyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylamines (**AcS**) (0.18 mmol) were treated with ammonia/MeOH (saturated at 0 °C, 10 mL) overnight at room temperature. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was purified by flash column chromatography (EtOAc/MeOH 4:1) to afford pure **S**.

Alternatively, the protected amides **AcS** (0.18 mmol) were dissolved in dry MeOH (1 mL), 1–2 drops of 1 M methanolic sodium methoxide (NaOMe) solution were added and the reaction mixture was kept at room temperature until completion of the transformation (TLC, EtOAc/MeOH 4:1). Amberlyst 15 (H⁺ form) was then added to remove sodium ions, the resin was filtered off, the solvent was removed and the residue was purified by flash column chromatography (EtOAc/MeOH 4:1) to afford pure **S**.

2.3.1. *N*-(*E*)-3-(Biphenyl-4-yl)acryloyl-(β -D-glucopyranosyl)-amine (S1)

White syrup, 80% yield; R_f = 0.27 (EtOAc/MeOH 4:1); $[\alpha]_D^{22}$ –26 (c 0.20, MeOH); IR (KBr) 3423, 1655 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.68 (d, 1H, *J* = 9.2 Hz, NH), 7.76–7.30 (m, 10H, ArH, CH=CH), 6.72 (d, 1H, *J* = 15.7 Hz, CH=CH), 5.06, 4.97 (2br s, 3H, 3OH), 4.86 (t, 1H, *J* = 8.9 Hz, H-1), 4.56 (br s, 1H, OH), 3.68–3.53 (m, 2H, H-6), 3.23–3.04 (m, 4H, H-2–H-5); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.3 (CO), 141.2, 139.4, 139.2, 134.0, 129.1, 128.3, 127.9, 127.3, 126.7, 122.1 (CH=CH and Ar-C), 79.7, 78.7, 77.6, 72.7, 70.0, 61.0 (C-1–C-6); MS (ESI, *m/z*) calcd for C₂₁H₂₄NO₆ 386.16, found 386.67 (MH)⁺. Anal. Calcd for C₂₁H₂₃NO₆: C, 65.44; H, 6.02; N, 3.63; Found: C, 65.62; H, 5.74; N, 3.99.

2.3.2. *N*-4-(5,6,7,8-Tetrahydronaphthalen-2-yl)butanoyl-(β -D-glucopyranosyl)-amine (S2)

Yellow syrup, 76% yield; R_f = 0.28 (EtOAc/MeOH 4:1); $[\alpha]_D^{22}$ –36 (c 0.20, MeOH); IR (KBr) 3453, 1654 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.29 (d, 1H, *J* = 9.2 Hz, NH), 6.95–6.85 (m, 3H, ArH), 4.97, 4.88 (2br s, 3H, 3OH), 4.70 (t, 1H, *J* = 9.0 Hz, H-1), 4.48 (br s, 1H, OH), 3.61 (dd, 1H, *J* = 3.7, 11.9 Hz, H-6a), 3.19–3.00 (m, 5H, H-2–H-5, H-6b), 2.67 (m, 4H, tetrahydronaphthalene moiety), 2.19–2.07 (m, 2H, CH₂), 1.75–1.70 (m, 8H, 2CH₂ and tetrahydronaphthalene moiety); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.4 (CO), 138.7, 136.3, 133.8, 128.8, 125.6 (Ar-C), 79.5, 78.5, 77.6, 72.5, 70.0, 61.0 (C-1–C-6), 34.9, 34.3, 28.8, 28.4, 26.8, 22.9, 22.6 (3CH₂ and 4CH₂ of tetrahydronaphthalene moiety); MS (ESI, *m/z*) calcd for C₂₀H₃₀NO₆ 380.21, found 380.71 (MH)⁺. Anal. Calcd for C₂₀H₂₉NO₆: C, 63.31; H, 7.70; N, 3.69; Found: C, 63.61; H, 8.01; N, 3.31.

2.3.3. *N*-2-(Biphenyl-4-yloxy)acetyl-(β -D-glucopyranosyl)-amine (S3)

Yellow syrup, 68% yield; R_f = 0.25 (EtOAc/MeOH 4:1); $[\alpha]_D^{22}$ +2 (c 0.20, MeOH); IR (KBr) 3399, 1655 cm⁻¹; The ¹H NMR spectrum showed hindered rotation around the amide bond. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.66 and 8.40 (d, *J* = 9.1 Hz, 0.82H, NH; d, *J* = 9.1 Hz, 0.18H, NH), 7.62–6.99 (m, 9H, ArH), 5.43, 4.80 (pseudo t, *J* = 8.3 Hz, 0.18H, H-1, pseudo t, *J* = 8.8 Hz, 0.82H, H-1), 5.09, 4.97 (2br s, 3H, 3OH), 4.67–4.40 (m, 3H, CH₂, OH), 3.68–3.37 and 3.23–3.04 (2 m, 6H, H-2–H-6); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 168.1 (CO), 157.4, 139.7, 133.2, 128.9, 127.7, 126.8, 126.2, 115.2 (Ar-C), 79.4, 78.8, 77.4, 72.3, 70.0, 66.8, 60.9 (C-1–C-6, CH₂); MS (ESI, *m/z*) calcd for C₂₀H₂₄NO₇ 390.15, found 390.38 (MH)⁺. Anal. Calcd for C₂₀H₂₃NO₇: C, 61.69; H, 5.95; N, 3.60; Found: C, 61.33; H, 6.09; N, 3.77.

2.3.4. *N*-(*E*)-3-(4-Isopropylphenyl)acryloyl-(β -D-glucopyranosyl)-amine (S6)

White syrup, 78% yield; R_f = 0.32 (EtOAc/MeOH 4:1); $[\alpha]_D$ +1 (c 0.20, MeOH); IR (KBr) 3343, 1663 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz,

DMSO-*d*₆): δ 8.55 (d, 1H, *J* = 9.1 Hz, NH), 7.48–7.43 (m, 3H, ArH cumenyl, CH=CH), 7.28 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz, ArH cumenyl), 6.60 (d, 1H, *J* = 15.8 Hz, CH=CH), 4.99, 4.94, 4.89 (3d, *J* = 4.7, 5.5, 5.3 Hz, 3H, 3OH), 4.83 (t, 1H, *J* = 9.0 Hz, H-1), 4.49 (t, 1H, *J* = 5.8 Hz, OH), 3.64 (dd, 1H, *J* = 5.7, 10.4 Hz, H-6a), 3.43–3.48 (m, 1H, H-6b), 3.23–3.03 (m, 4H, H-2–H-5), 2.91–2.85 (m, 1H, CH), 1.18 (d, 6H, *J* = 6.9 Hz, CH₃–CH–CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.4 (CO), 150.3, 139.6, 132.5, 127.7, 127.0, 121.1 (CH=CH and Ar-C), 79.7, 78.6, 77.6, 72.7, 70.0, 61.0 (C-1–C-6), 33.3, 23.7 (CH₃–CH–CH₃); MS (ESI, *m/z*) calcd for C₁₈H₂₆NO₆ 352.18, found 352.51 (MH)⁺. Anal. Calcd for C₁₈H₂₅NO₆: C, 61.52; H, 7.17; N, 3.99; Found: C, 61.69; H, 6.77; N, 4.19.

2.3.5. *N*-(*R*)-3-(4-Ethylphenyl)butanoyl-(β -D-glucopyranosyl)-amine (S20)

Yellow syrup, 66% yield; R_f = 0.5 (EtOAc/MeOH 4:1); $[\alpha]_D^{22}$ –2 (c 0.20, MeOH); IR (KBr) 3436, 1655 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.34 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, NH), 7.15–7.10 (m, 4H, ArH), 4.94, 4.86 (2br s, 3H, 3OH), 4.71 (pseudo t, 1H, *J* = 9.2 Hz, H-1), 4.44–4.42 (m, 1H, OH), 3.65–3.60 (m, 1H, H-6a), 3.18–3.04 (m, 6H, H-2–H-5, H-6b, CH), 2.57–2.53 and 2.41–2.27 (2 m, 4H, CH₂, CH₂CH₃), 1.24–1.14 (m, 6H, CHCH₃, CH₂CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.4 (CO), 144.0, 141.2, 127.7, 126.6 (Ar-C), 79.5, 78.5, 77.6, 72.5, 70.0, 61.0 (C-1–C-6), 43.9, 35.2, 27.8 (CH and 2CH₂), 21.6, 15.7 (CHCH₃, CH₂CH₃); MS (ESI, *m/z*) calcd for C₁₈H₂₈NO₆ 354.19, found 354.36 (MH)⁺. Anal. Calcd for C₁₈H₂₇NO₆: C, 61.17; H, 7.70; N, 3.96; Found: C, 61.57; H, 7.34; N, 3.58.

2.3.6. *N*-(*S*)-3-(4-Isopropylphenyl)-2-methylpropanoyl-(β -D-glucopyranosyl)-amine (S21)

Yellow syrup, 81% yield; R_f = 0.41 (EtOAc/MeOH 4:1); $[\alpha]_D^{22}$ +2 (c 0.20, MeOH); IR (KBr) 3349, 1654 cm⁻¹; The ¹H NMR spectrum showed hindered rotation around the amide bond. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.34 (2d, 1H, *J* = 9.1 Hz, NH), 7.14–7.10 (m, 4H, ArH cumenyl), 4.96–4.40 (m, 5H, H-1 and 4OH), 3.66–3.40 and 3.21–3.03 (2 m, 6H, H-2–H-6), 2.92–2.80 (m, 2H, CH₂), 2.54 and 2.41 (2 m, 2H, CH, CH₃–CH–CH₃), 1.18 (d, 6H, *J* = 6.9 Hz, CH₃–CH–CH₃), 0.92 (2d, 3H, *J* = 6.8 Hz, CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 175.6 (CO), 145.8, 137.2, 128.9, 126.0 (Ar-C), 79.6, 78.5, 77.6, 72.6, 70.0, 60.9 (C-1–C-6), 41.4, 38.7, 33.0 (2CH and CH₂), 24.0, 17.0 (CH₃–CH–CH₃, CHCH₃); MS (ESI, *m/z*) calcd for C₁₉H₃₀NO₆ 368.21, found 368.62 (MH)⁺. Anal. Calcd for C₁₉H₂₉NO₆: C, 62.11; H, 7.96; N, 3.81; Found: C, 62.25; H, 7.67; N, 3.44.

2.4. Protein purification and kinetic measurements

Rabbit skeletal muscle glycogen phosphorylase b was isolated, purified recrystallized and assayed as described previously.⁴⁶ Kinetic studies were performed at 30 °C in the direction of glycogen synthesis by measuring the inorganic phosphate released in the reaction as reported previously.⁴⁶ The enzyme (5 μ g/ml) was assayed in a buffer of 30 mM imidazole/HCl (pH 6.8) containing 60 mM KCl, 0.6 mM EDTA, and 0.6 mM dithiothreitol using constant concentrations of glycogen (0.2% w/v), AMP (1 mM), and various concentrations of Glc-1-P (2, 4, 6, 10 and 20 mM) and inhibitors. Enzyme and glycogen were preincubated for 15 min at 30 °C before initiating the reaction with Glc-1-P. Initial velocities were calculated from the pseudo-first order rate constants. For the calculation and statistical evaluation of the kinetic and binding parameters, the non-linear regression program GRAFIT was used.⁴⁷

2.5. Protein crystallography

Crystallographic binding studies were performed by diffusion of a solution of the *N*-acyl- β -D-glucopyranosylamine in the

Table 2 Statistical results for ranking of training set ligand binding affinities from individual docking algorithms/scoring functions and after consensus scoring with a Simple Sum Rank of Glide-SP and GOLD-ChemPLP^a

Statistical metric	Glide-XP	GOLD-ChemScore	GOLD-ASP	GOLD-ChemPLP	Glide-SP	Simple sum rank SP + ChemPLP
Hit rate (%)	50	60	50	70	80	80
E.F.	2.0	2.4	2.0	2.8	3.2	3.2
AU-ROC	0.67	0.86	0.84	0.92	0.91	0.92
(N)SLR	0.60	0.82	0.81	0.92	0.89	0.91
R ²	0.02	0.20	0.14	0.31	0.28	0.46
Ranking of actives	3,4,5,6,9,14,17,26,29,37	1,3,6,7,8,13,21,22,26,29	1,2,4,5,6,11,13,16,17,18	1,2,3,4,5,7,9,11,14,17	1,2,3,5,7,8,9,10,15,16	1,2,3,5,6,7,8,10,14,17

^a Statistical metrics calculated as described in text. R² represents the correlation between the predicted and actual ranking of training set ligands using the different methods.

Table 3 Docking/consensus scoring and ADME results for the ligands shown in Table 1^a

Ligand	Zinc code (acid chloride)	Rank Glide-SP	Rank GOLD-ChemPLP	Simple sum rank	Votes (4%) ^b	RMSD ^c	Lipinski's Rule of five & violations (V)			Jorgensen's rule of three & violations (V)					
							MW (<500)	Num. H-bond donors (≤5)	Num. H-bond acceptors (≤10)	logP (o/w) (<5)	V	Caco-2 perm. (>22 nm/s)	logS (>-5.7)	Num. prim. metab (<7)	V
S1	33434881	1	1	2	3(3)	0.364	385.4	5	7*	0.851	0	80.2	-3.704	5	0
S2	11631072	10	8	18	1(2)	0.934	379.5	5	7*	0.208	0	95.1	-2.926	9*	1
S3	26470275	18	5	23	3(3)	1.505	389.4	5	8*	-0.082	0	50.9	-2.385	7	1
S6	26470293	17	54	71	1(2)	1.707	351.4	4	7*	0.296	0	98.5	-3.08	6	0
S20	11629161	106	16	122	1(1)	0.910	353.4	5	7*	-0.162	0	89.0	-2.343	8	1
S21	11629207	78	65	143	0(1)	0.654	367.4	5	7*	0.01	0	76.7	-2.168	9*	1
Range 95% Known Drugs ^d	—	—	—	—	—	—	130–725	2.0–20.0	0.0–6.0	-2.0 to 6.5	—	<25 poor; >500 great	-6.5 to 0.5	1–8	—

^a See text for full details. Violations of rules highlighted in italics, while those values outside the range of 95% of known drugs are highlighted with an asterisk (*).

^b Coarse quantile votes (maximum of 3) received by ligands if ranked in the top ~1.5% and 4% (in parentheses) of screened database using the other docking methods/scoring functions (GOLD-ChemScore, -GoldScore and -ASP).

^c RMSD is the difference between Glide-SP and GOLD-ChemPLP ligand poses (heavy atoms) in-place.

^d QikProp 3.3 user manual.

Table 4
Effects of glucose analogues on GP_a depletion in hepatocytes.

Compound	Concentration used	GP _a (% control)
Glucose	25 mM	64.1 ± 4.4**
5-Thiogluucose	9 mM	106.2 ± 4.0
Glucose-5-thiogluucose mixture	25 mM–9 mM	78.7 ± 2.9**
S1	2 μM	89.4 ± 2.1**
S1	20 μM	83.3 ± 2.0**
S2	2 μM	93.0 ± 4.8
S2	20 μM	100 ± 6.6
S3	2 μM	84.5 ± 6.3*
S3	20 μM	80.3 ± 3.1**
S6	2 μM	105 ± 11.5
S6	20 μM	106 ± 7.8

Hepatocytes were incubated in MEM containing 5 mM and the analogues indicated (at 2 or 20 μM) or with 25 mM glucose without or with hexokinase inhibitor (5-thiogluucose). After 30 min, hepatocytes were snap frozen for determination of GP_a in the cell extracts. GP_a is expressed as percentage of the respective controls with 5 mM glucose without or with 9 mM 5-thiogluucose. Means ± SEM (*n* = 5).

* *P* < 0.05.

** *P* < 0.005, effect of analogue or 25 mM glucose relative to the respective control.

crystallization media of preformed GP_b crystals. GP_b crystals were grown in the tetragonal lattice, space group *P*4₃2₁2, under conditions similar to those described previously.⁴⁸ These crystals were soaked in a 5 mM inhibitor solution in a buffer of 10 mM Sodium *N,N*-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonate (pH 6.7) containing 0.1 mM EDTA, and 0.02% w/v sodium azide at room temperature for 2 h prior to data collection. X-ray diffraction data were collected using synchrotron radiation on station ID911-2 at MAX-Lab Synchrotron Radiation Source in Lund, Sweden or for the GP_b-S6 complex on an Oxford Diffraction SuperNova X-ray system using a 135 mm CCD detector at room temperature. Crystal orientation, integration of reflections, inter-frame scaling, partial reflection summation, and data reduction was performed by the program Mosflm.⁴⁹ For scaling and merging of intensities the program SCALA of CCP4 Suite⁵⁰ was used. Crystallographic refinement of the complexes was performed by maximum-likelihood methods using REFMAC.⁵⁰ The starting model employed for the refinement of the complexes was the structure of the native T state GP_b complex determined at 1.9 Å resolution (Leonidas et al., unpublished results). Ligand models were constructed using the PRODRG server⁵¹ and they were fitted to the electron density maps after adjustment of their torsion angles. Alternate cycles of manual rebuilding with the molecular graphic program COOT⁵⁰ and refinement with REFMAC⁵⁰ improved the quality of the models. A summary of the data processing and refinement statistics for the inhibitor complex structures is given in Table 6. The stereochemistry of the protein residues was validated by MolProbity.⁵² Hydrogen bonds and van der Waals interactions were calculated with the program CONTACT as implemented in CCP4⁵⁰ applying a distance cut off 3.3 Å and 4.0 Å, respectively. Figures were prepared with PyMol.⁵³ The coordinates of the new structures have been deposited with the RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>) with codes presented in Table 6.

2.6. Ex vivo experiments

Hepatocytes were isolated from male Wistar rats, 200–300 g body wt (obtained from Harlan UK, Ltd) by collagenase perfusion.⁵⁴ Procedures conformed to Home Office Regulations and were approved by Newcastle University Ethical Committee. Hepatocytes were suspended in Minimum Essential Medium (MEM) with 5% calf serum and seeded in multi-well plates at a density of 6×10^4 cells/cm². After cell attachment the medium was replaced by serum-free MEM containing 5 mM glucose, 10 nM dexamethasone, 1 nM insulin and the hepatocytes were cultured for 24 h. For

determination of the effects of the GP inhibitors on conversion of GP_a to GP_b, the compounds or glucose (to a final concentration of 25 mM) were added to the medium 1 h after the change of medium and the incubations were continued for a further 30 min. Incubations with 5 mM or 25 mM glucose were also done in the additional presence of 5-thiogluucose (9 mM), a hexokinase inhibitor, that prevents the elevation in glucose 6-P at 25 mM glucose.⁵⁵ The monolayers were snap frozen in liquid nitrogen and the activity of GP_a was determined by coupling glycogen phosphorylase to the glucose 6-phosphate dehydrogenase reaction as described previously.⁵⁵ GP_a activity in cells incubated with the GP inhibitors or with 25 mM glucose was expressed as percentage of the corresponding controls containing 5 mM glucose (without or with 5-thiogluucose). Results are Means ± SEM for 5 hepatocyte preparations. Statistical analysis was by the paired *t*-test.

3. Results

3.1. Virtual screening

3.1.1. Training set results

To evaluate the performance of CombiGlide and GOLD with different scoring functions for the task at hand, a training set of ligands was employed with known inhibitory constants, each of these ligands containing a –NHCO– group at the C1 position, but included ligands with extended linkers (e.g., –NHCONHCO–) so as to increase training set size as well as the spread of experimental binding affinities (Table S1). The performances were evaluated with respect to the recovery of active molecules, which we defined as those with *K*_i's < 10 μM (10 ligands within a set of 40) and is reported in Table 2. Statistical performance metrics used were hit-rate, EF, ROC plots and NSLR, as described in the Materials and Methods section. Docking algorithms/scoring functions tested comprised Glide-SP and -XP; GOLD with -ChemScore, -ChemPLP, and -GoldScore and -ASP (two knowledge-based scoring functions). The best scoring functions were combined in a consensus scoring approach to ranking of ligand binding affinities.²⁶ Each of the six scoring functions has strengths and weaknesses. To increase the success rate in virtual screening, it may therefore be beneficial to use several scoring functions and apply 'consensus scoring' for which a considerable reduction of false positives has previously been reported.^{26,40}

Although all scoring methods performed reasonably well, Glide-SP and GOLD-ChemPLP scores were found to be the most robust (Table 2). Hit rates of 70% (GOLD-ChemPLP) and 80% (Glide-SP) for recovery of actives were obtained and enrichment factor (EF) values of 2.8 (GOLD-ChemPLP) and 3.2 (Glide-SP). For both of these methods, AU-ROC values > 0.9 were obtained, while (N)SLR 'early enrichment' values of ~0.9 reflect the excellent early recovery of actives. Combining Glide-SP and GOLD-ChemPLP in consensus scoring using a Simple Sum Rank²⁶ reproduces the best hit rate and EF values (from Glide-SP) of 80% and 3.2, respectively; the best AU-ROC value of 0.92 (from GOLD-ChemPLP); while the (N)SLR value (0.91) is similar to the best value of 0.92 obtained from GOLD-ChemPLP. The method also produces the best correlation (*R*² = 0.46) between the predicted and actual ligand ranking of binding affinities.

3.1.2. Screening set results

The five docking algorithms/scoring functions Glide-SP, GOLD-ChemPLP, -ChemScore, -ASP and -GoldScore were used. Glide-XP was the weakest performer for the training set, and given its computational expense for screening of 1888 ligands, its inclusion was not warranted. Re-ranking of predicted ligand potencies was via consensus scoring involving a Simple Sum Rank of results from

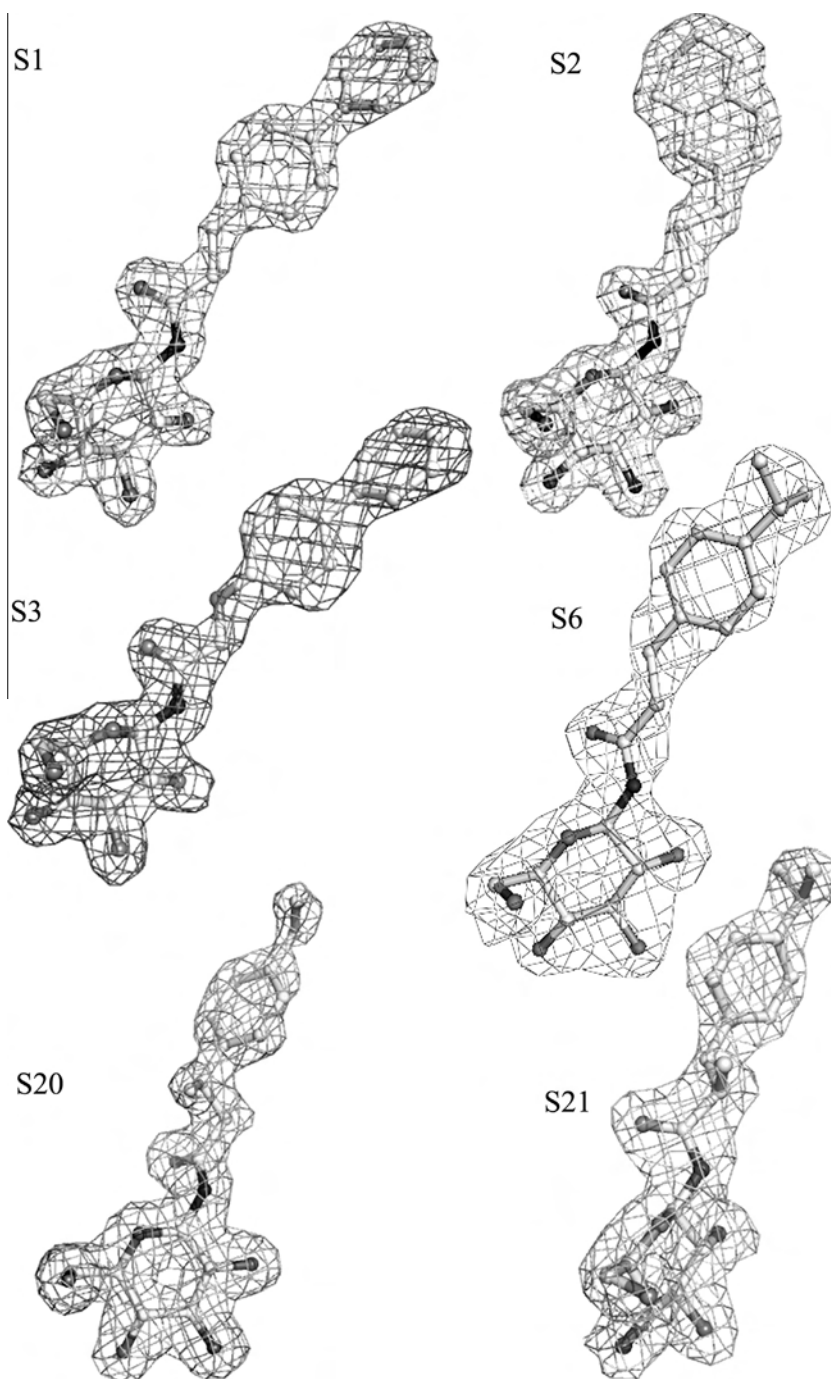


Figure 1. The REFMAC $2F_o - F_c$ electron density maps of bound ligands contoured at 1.0σ before the incorporation of the ligand models in the refinement process. The final refinement models of **S1**, **S2**, **S3**, **S6**, **S20**, and **S21** are shown.

Glide-SP and GOLD-ChemPLP. Ligands with a Simple Sum Rank <150 (29 ligands) were chosen for further evaluation with their structures shown in Table S2. The docking/consensus scoring results are shown in Tables 3 (ligands synthesized) and S3 (all 29 ligands). Ligands are listed as **SN**, where the **S** represents Screening Set ligand and the **N** is the overall rank of the ligand with **S1** having the best (lowest) Simple Sum Rank and **S29** the worst (highest).

3.1.3. Prioritization of ligands for synthesis & biological evaluation

The final set of 29 ligands were clustered into groups based on 2D fingerprints (c.f. Experimental section; Table S3). Criteria used

to select ligands from the clusters were the Simple Sum Rank, coarse quantile votes²⁶ from the other scoring functions, and ADME properties (Tables 3 and S3) considering Lipinski's 'rule of five'⁴² and Jorgensen's 'rule of three'.⁴³ Ultimately, the six ligands shown in Table 1 were chosen due to availability and therefore synthetic viability.

3.2. Chemistry

The direct acylation of 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylamine (**AcGlc-NH₂**), easily prepared from the per-*O*-acetylated β -D-glucopyranosyl azide (**AcGlc-N₃**)⁴⁴ upon catalytic hydrogenation,

Table 5
Potential hydrogen bond interactions of inhibitors with GPb residues in the crystal

Inhibitor atom	Protein atom	Distance (Å)					
		S1	S2	S3	S6	S20	S21
O2'	Tyr573 OH	3.2	3.1	3.1	–	3.1	3.2
	Glu672 OE1	3.2	3.2	3.1	3.1	3.0	3.1
	Water	2.6	2.6	2.7	2.7	3.2	2.8
O3'	Water	–	2.8	2.9	–	2.8	2.7
	Glu672 OE1	2.8	2.8	2.8	2.6	2.8	2.8
	Ala673N	3.3	3.3	3.3	–	3.3	–
O4'	Ser674N	3.0	3.0	3.1	3.1	3.0	2.9
	Gly675N	3.2	3.1	3.3	3.0	3.1	3.0
	Gly675N	2.8	2.9	2.8	2.8	2.9	2.9
O6'	Water	2.7	2.7	2.6	2.6	2.6	2.7
	His377 ND1	2.7	2.7	2.6	2.6	2.7	2.8
O3	Asn484 OD1	2.7	2.8	2.9	2.9	2.8	2.7
	Leu136N	3.0	–	3.0	3.0	3.2	–
N1	Water	–	–	3.2	2.9	–	2.7
	His377 O	–	2.9	–	–	–	3.3
Total	Water	–	–	2.8	–	–	–
		13	14	16	12	14	13

Numbers shown are distances in Å.

with a diverse set of commercially available acyl chlorides RCOCl (**1**, **2**, **3**, **6**, **20**, **21**) (Scheme 2) using Et₃N as base and DMF as solvent, furnished the protected *N*-acyl-β-D-glucopyranosylamines (**AcS**), in good yields (62–83%). Removal of the acetyl groups of the derivatives **AcS**, performed either by saturated methanolic ammonia or by the Zemplén method yielded analogues **S1**, **S2**, **S3**, **S6**, **S20** and **S21**, after flash column chromatography. During spectroscopic characterization, ligands **AcS21**, **S3** and **S21** appeared to consist of two rotamers, judged from their ¹H NMR spectra, which is probably due to the hindered rotation of the amide bond.

3.3. Biochemical assessment

To validate our synthesized compounds we tested their inhibitory potency via kinetics experiments with rabbit muscle glycogen phosphorylase b (GPb) in the direction of glycogen synthesis. Human liver GPb and rabbit muscle GPb active sites are identical in amino-acid sequence and structural architecture and hence active site ligands tested against rabbit muscle GPb are expected to be potent against human liver glycogen phosphorylase as well. The inhibition constants are shown in Table 1. All compounds displayed competitive inhibition with respect to the substrate Glc-1-P, at constant concentrations of glycogen and AMP. The most potent are compounds **S1** ($K_i = 5.14 \mu\text{M}$) and **S6** ($K_i = 4.98 \mu\text{M}$) followed closely by **S3** ($K_i = 8.25 \mu\text{M}$). From the inhibition constant values (Table 1) it seems that compounds **S2**, **S21** and **S20** that have a certain degree of freedom in the linker that connects the Glc-NHCO group to the aromatic rings are worse inhibitors than those that have a linker with a more rigid geometry which directs the position of the phenyl rings.

3.4. Cellular evaluation

GP ligands that stabilise the T-state promote conversion of GPa to GPb in hepatocytes because the T-state is a better substrate for dephosphorylation by phosphorylase phosphatase, whereas compounds that stabilise the R-state, such as DAB which binds to active/inorganic phosphate site, have the converse effect and promote conversion of GPb to GPa.⁵⁶ We compared the effects of **S1**, **S2**, **S3** and **S6** with 25 mM glucose on depletion of GPa during a 30 min incubation of the hepatocytes (Table 4). Glucose represents

the physiological inhibitor of the active site.¹ It is noteworthy however, that incubation of hepatocytes with elevated glucose concentration (25 mM vs 5 mM) is associated with an approximately 3-fold elevation in hepatocellular glucose 6-P concentration,^{55,57} and the conversion of GPa to GPb in these conditions, is the combined effect of the glucose at the active site and the elevated glucose 6-P,^{55,57,58} which competes at the AMP-site.⁵⁹ Inhibitors of glucokinase, such as 5-thiogluco, prevent the rise in glucose 6-P at high glucose^{55,58} and attenuate the inactivation of GPa by approximately 50% indicating that the cellular effect of 25 mM glucose is the combined effect of glucose (at the active site) and the raised glucose 6-P (acting at the AMP site).^{55,57,58} In order to compare the effects of the new inhibitors with the glucose inactivation that is mediated specifically by the active site, we used elevated glucose (25 mM) without or with 5-thiogluco. Treatment with 25 mM glucose alone, represents the inactivation of GPa through the synergistic effects of 25 mM glucose and the 3-fold elevation in glucose 6-P.^{55,57} In contrast, treatment with 25 mM glucose in conjunction with the hexokinase inhibitor which prevents the elevation in cellular glucose 6-P⁵⁵ represents the glucose component that is due to a direct effect of glucose. Glucose (25 mM) lowered GPa by 36% in the absence of inhibitor and by 21% in the presence of the hexokinase inhibitor, in agreement with previous findings that glucose inactivates GPa through the combined effects of glucose and the elevated glucose 6-P.⁵⁵ **S1** and **S3** caused significant lowering of GPa at concentrations of 2 μM (11–15%) and at 20 μM (17–20%), showing that these compounds mimic the effect of elevated glucose at low micromolar concentrations, and also that their effect is comparable to the inhibition caused by glucose in the presence of the hexokinase inhibitor. **S2** and **S6** had no significant effect (Table 4).

3.5. Structural studies

Towards elucidating the structural basis of inhibition and most importantly the differences in the inhibition constants, we have determined the crystal structures of the six selected inhibitors in complex with GPb. All inhibitors were found bound at the active site with their atoms well defined within the electron density maps (Fig. 1). The anchor point for each of the inhibitors appears to be the glucose moiety which is engaged in hydrogen bond (Table 5) and van der Waals interactions almost identical to those that have observed for glucose and in other glucose containing inhibitors.^{1,2,19,60} Inhibitors **S1** and **S3** (the most potent) bind very similar with the R group in the β-pocket participating in van der Waals interactions with residues Glu88, Asn133, Tyr280, Asn282, Asp283, Phe286, Arg292, His341, and Glu385 (Fig 2). The introduction of a CH₂-O moiety in the linker (**S3**) instead of the C=C double bond (**S1**) did not seem to affect the binding as this oxygen is not involved in any hydrogen bond interactions with protein residues in the vicinity (Fig. 2). Meanwhile the van der Waals interactions of this oxygen in the **S3** complex are similar to those of the corresponding carbon in the **S1** complex. Inhibitors **S6**, **S20** and **S21** bind similar to each other, within the β-pocket, but remarkably different from **S1** and **S3**. Their R groups are closer to the location of the 280 s loop in the free GPb structure than **S1** and **S3**. The distance between the phenyl rings of **S6**, **S20**, and **S21** are those of **S1** and **S3** is approximately 1.6, 1.8 and 2.6 Å in the respective complexes. However, the isopropyl groups of **S6**, and **S21**, and the ethyl group of **S20** on the phenyl group are all in the same location (within a radius of 0.5 Å) involved in similar van der Waals interactions with residues Tyr280, Asn282, Phe285, His341, and Ala383 (Fig. 2). The methyl group in the linkers of **S20** and **S21** point towards the same direction and participates in van der Waals interactions with side chain atoms of Leu136 and Asp339. Inhibitor **S2** binds similarly

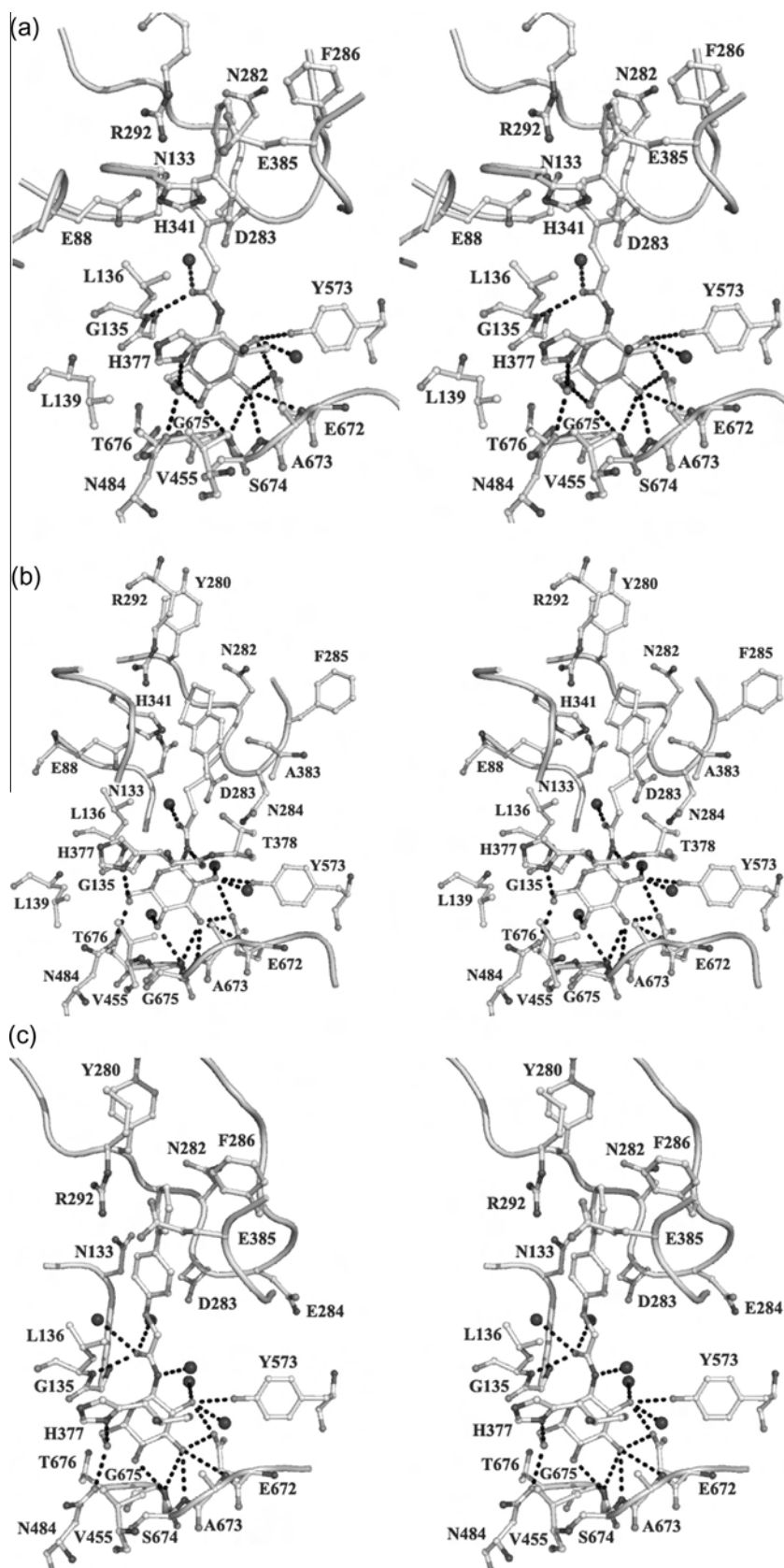


Figure 2. Stereo diagrams of the binding of S1 (a), S2 (b), S3 (c), S6 (d), S20 (e), and S21 (f) at the active site of GPb. Hydrogen bonds are shown as dashed lines and water molecules as black spheres labeled W.

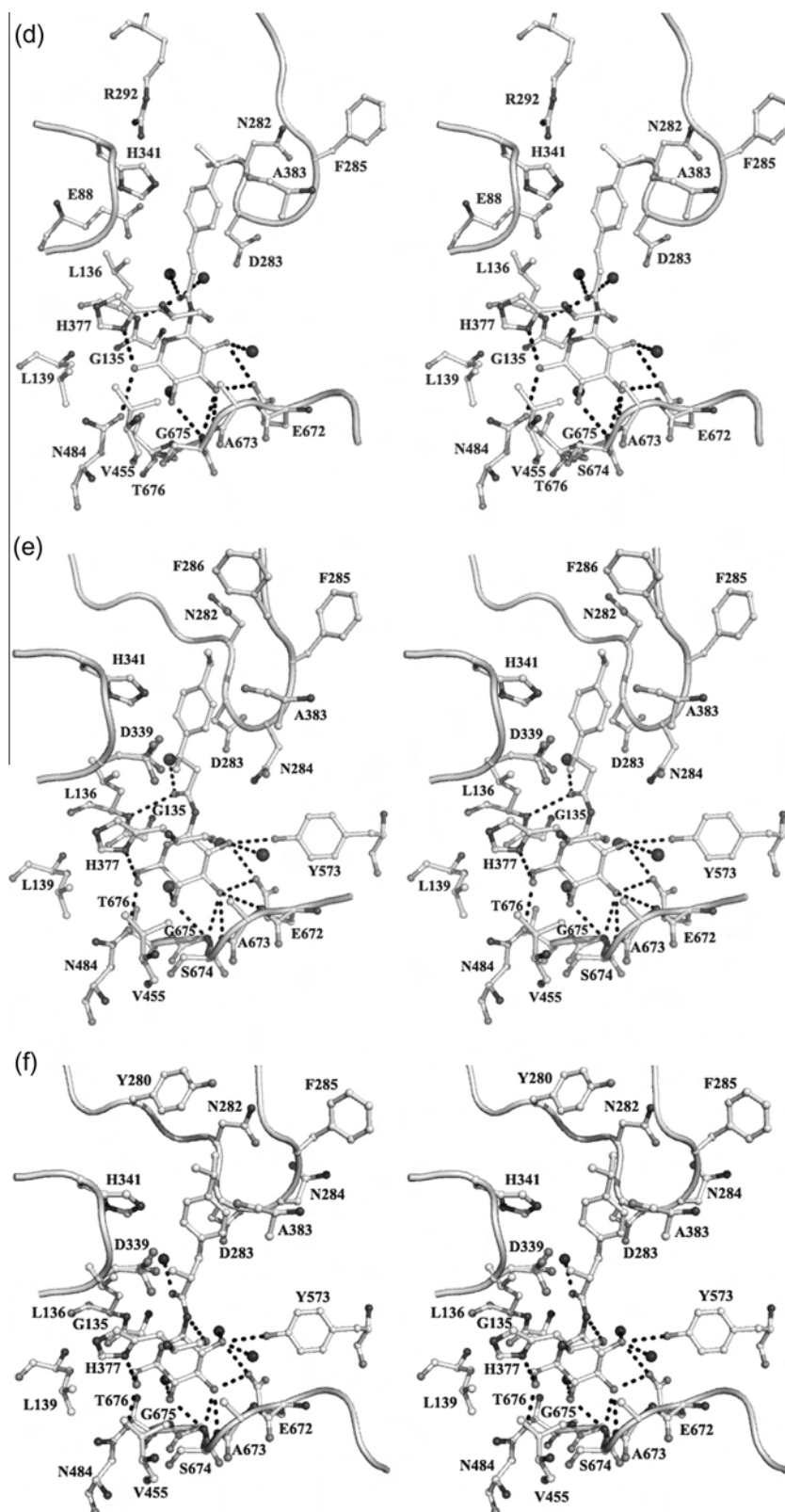


Fig. 2 (continued)

to **S1** but the linker follows a different route to place the tetrahydronaphthalene group in the place where the two phenyl rings of **S1** and **S3** bind, participating in similar van der Waals interactions with protein residues. Thus, it seems that the linker is flexible enough to adopt a conformation that will place the R group at

the most complementary with respect to hydrophobicity space within the β -pocket (Fig. 3).

All six inhibitors upon binding induce a significant conformational change of the 280 s loop (residues 280–288) when comparing the complex structures to the unliganded (Fig. 3). Thus, it

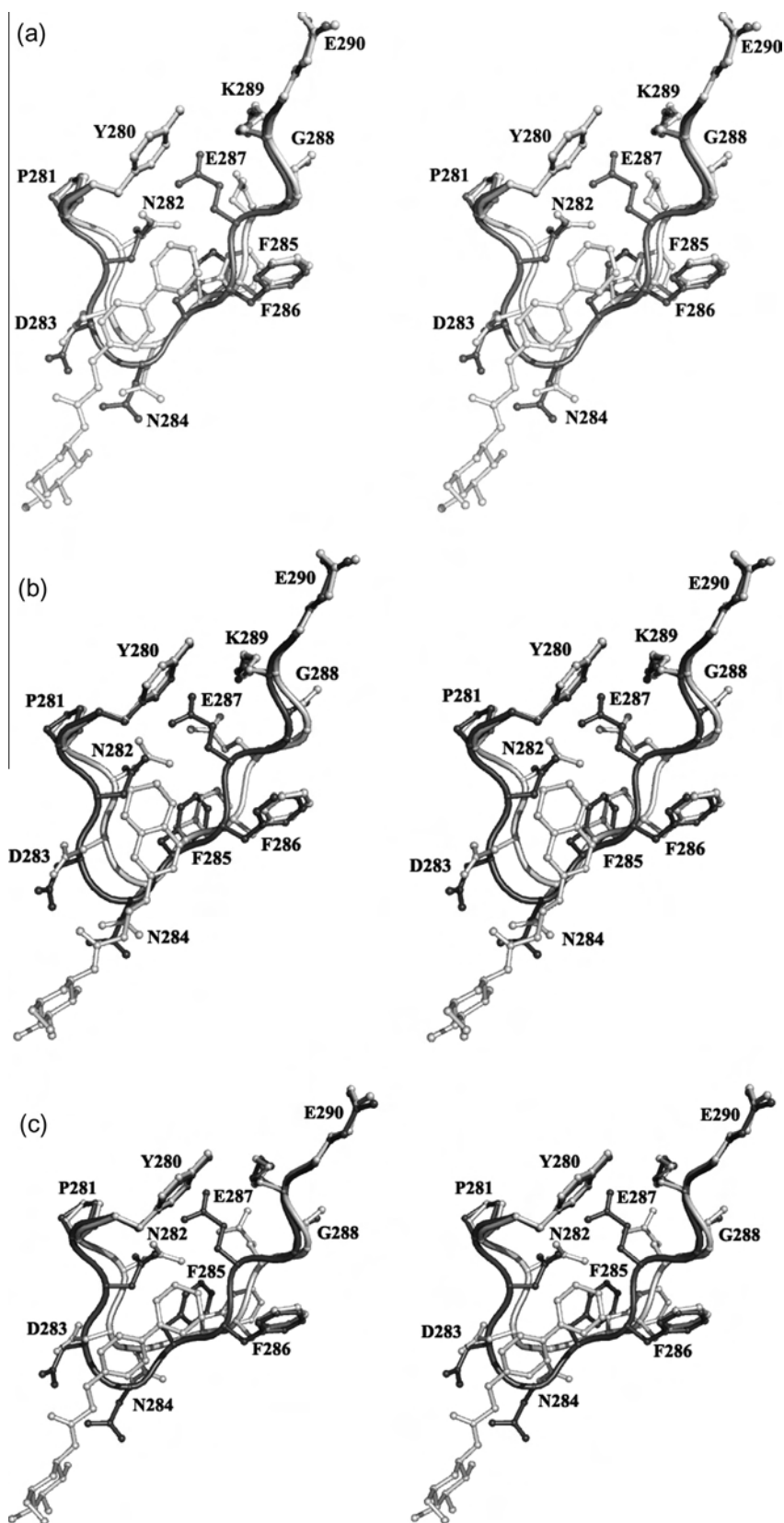


Figure 3. Stereo diagram of the superposition of the six GPb ligand complexes (white) at the active site of the free GPb (black). **S1** (a), **S2** (b), **S3** (c), **S6** (d), **S20** (e), and **S21** (f).

seems that the presence of the R group of the inhibitors induces the movement of this loop away from the active site making space for the inhibitor. Thus, the atoms from residues 282–287 upon

superposition onto the corresponding ones of the unliganded GPb structure show an rms displacement of 1.5, 1.2, 2.0, 2.2, 1.2 and 2.2 Å for the **S1**, **S2**, **S3**, **S6**, **S20** and **S21** complexes, respectively.

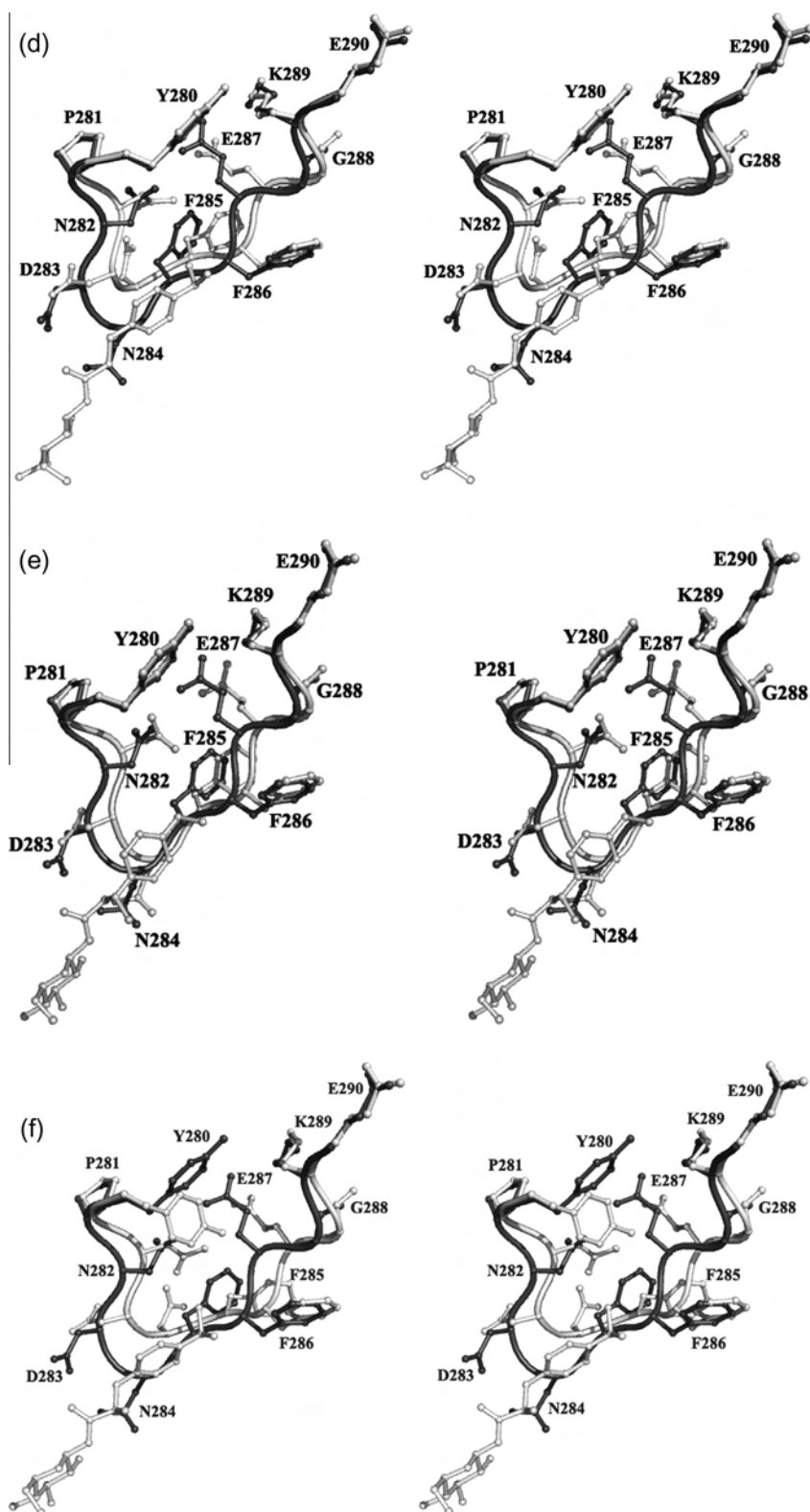


Fig. 3 (continued)

From the above values it is evident that **S2** and **S20** cause the smaller disturbance to the 280 s loop. Comparing the conformational change of the 280 s loop induced by the binding of the inhibitors it seems that **S1**, **S2** and **S20** trigger a mere displacement of the 280 s loop while the rest of the inhibitors cause also more significant conformational changes. Briefly, in the **S3**, **S6**, and **S21**

complexes Asp283 and Asn284 shift away from the ligand to avoid clashes with the R group, with concomitant shifts of the other residues of the 280 s loop. More specifically, Asn284 flips 180° and is positioned between the phenyl rings of Phe285 and Tyr613, two residues that constitute the inhibitor site at the entrance of the catalytic site in GPb, resulting in its disruption.

Table 6
Summary of the diffraction data processing and refinement statistics for the GPb complexes

GPb complex	S1	S2	S3	S6	S20	S21
<i>Data collection and processing statistics</i>						
Resolution (Å)	28.83–1.99	23.94–1.90	23.94–2.00	18.23–2.45	23.82–1.85	23.89–2.15
Outermost shell (Å)	2.10–1.99	2.00–1.90	2.11–2.00	2.58–2.45	1.95–1.85	2.27–2.15
Reflections measured	169449 (17599)	254758 (36440)	104316 (15051)	72136 (10932)	216184 (30152)	242135 (33396)
Unique reflections ^a	63559 (6924)	75897 (10836)	52566 (7918)	33056 (4997)	82325 (11899)	52824 (7533)
Multiplicity	2.7 (2.5)	3.4 (3.4)	2.0 (1.9)	2.2 (2.2)	2.6 (2.5)	4.6 (4.4)
R _{sym} ^a	0.094 (0.451)	0.055 (0.365)	0.073 (0.347)	0.099 (0.531)	0.056 (0.414)	0.103 (0.452)
Completeness (%) ^a	94.2 (71.3)	98.1 (97.1)	79.7 (83.1)	91.4 (95.6)	98.5 (98.8)	98.4 (97.3)
<I/σI> ^a	6.2 (2.2)	13.2 (3.2)	7.6 (2.7)	6.3 (1.8)	10.2 (2.3)	8.8 (3.3)
<i>Refinement statistics</i>						
R _{cryst} ^a	0.165 (0.264)	0.161 (0.242)	0.162 (0.241)	0.187 (0.256)	0.161 (0.271)	0.163 (0.237)
R _{free} ^a	0.189 (0.307)	0.188 (0.254)	0.200 (0.289)	0.234 (0.271)	0.190 (0.286)	0.203 (0.298)
No of solvent molecules	223	265	295	113	301	208
<i>r.m.s. deviation from ideality</i>						
In bond lengths (Å)	0.008	0.007	0.009	0.005	0.009	0.009
In angles (°)	1.2	1.2	1.2	1.0	1.3	1.3
<i>Average B factor (Å²)</i>						
Protein atoms	36.3	31.3	31.0	36.7	32.8	38.9
Solvent molecules	37.4	34.8	36.2	28.7	37.4	37.7
Ligand atoms	38.3	23.6	23.1	27.1	29.6	32.6
PDB entry	4MHS	4MI6	4MHO	4MIC	4MI9	4MI3

^a Values in parentheses are for the outermost shell.

This rearrangement of the 280 s loop is in the direction of the R to T allosteric conversion and has been also observed in other GPb ligand complexes with bulky benzoyl moieties.^{30,61,62}

4. Discussion and conclusions

The present work constitutes the first integrated structure-based drug design with high-throughput screening of commercially available small molecule libraries for glycogen phosphorylase inhibitors (GPIs). Three of the best *N*-acyl-β-D-glucopyranosylamines GPIs have been identified in this work (<10 μM activity), have also revealed promising activity in the cell in agreement with ADME predictions.

Structural studies offer an explanation for the differences in the inhibitory potency of the six inhibitors. Thus, since all six inhibitors are involved in the same hydrogen bond interactions (direct and water mediated interactions) our attention shifted to the van der Waals interactions of the ligands. The virtual screening was performed with the goal to maximize the non-polar interactions of the R group within the β-pocket of the active site. The two most potent inhibitors **S1** and **S6** that display similar potency form the same number of van der Waals interactions with the protein (100) while the third best (**S3**) participates in slightly fewer (91) and thus has a slight increased *K_i* value. This pattern is repeated with the other two inhibitors, **S2** and **S21** that engage in 78 and 71 van der Waals interactions with the protein and have *K_i* values of 48.7 and 75.3 μM, respectively. The only exception to this pattern is **S20** that forms 71 non-polar interactions like **S21** but has a *K_i* value five times bigger than **S21** (Table 1). The main difference in the binding of these two inhibitors is the conformational change they induce on the 280s loop. Thus, the binding of **S20** causes a more severe rearrangement of the loop than the one caused by the binding of **S21**. This is pronounced by the shifts of Asp283 and Asn284 described above, and this probably has energy cost that increases the *K_i* value of **S20** with respect to that of **S21**.

A structural comparison with the GPb–*N*-4-phenylbenzoyl-2-*N*'-β-D-glucopyranosyl urea complex³⁰ (PDB ID: 2QLN), the inhibitor (*K_i* = 3.7 μM) used as a scaffold for modeling reveals that **S1** and **S3** bind very similar with this compound. However, both **S1** and **S3** lack the second carbonyl oxygen in the linker of the scaffold

compound and thus are not involved in any of the additional water-mediated of the scaffold compound and Gly134, Gly135, Gly137, and Asp283. These interactions probably are responsible for the slightly better inhibitory potency of the scaffold compound with respect to **S1** and **S3**. Thus far, the most potent analogous compound is β-D-Glcp-NHCO-2-naphthyl²¹ (**F**) with a *K_i* value of 3.5 μM (Table 1). Since, a crystal structure of GP in complex with **F** is not available thus far a structural comparison to the complex structures presented herein is not possible. However, it seems that a common motif can emerge, that is, the presence of a C=C double bond next to the –NHCO– linker and a 2-naphthyl group lead to increased inhibitory potency for GPb.

In terms of the virtual screening performance, 50% of the six molecules synthesized were found to be actives (*K_i*s <10 μM as defined for our initial training set). Although the **S1**, **S3** and **S6** inhibitors had potencies on a similar level to the best β-D-Glcp-NHCO-R previously discovered (low μM), none of the tested inhibitors reached into the sub μM range. Considering the active site residue rearrangements observed from our X-ray crystallographic studies, the limitations of the rigid receptor approximation in the docking calculations could be considered a factor if more potent analogues among the 1888 ligands screened were not detected. Only six of our final set of 29 ligand candidates (Table S3) was tested. The least potent inhibitors **S20** (*K_i* = 387.87 μM) and **S21** (*K_i* = 75.29 μM) had much higher Simple Sum Ranks (>120) and fewer coarse quantile votes (≤1) than the other ligands tested. Accordingly, if further ligands from Table S3 are to be synthesized, greater attention to the consensus scoring voting is advised. Further, we note that the less potent ligands (**S2**, **S20** and **S21**) all are more flexible than the low μM **S1**, **S3** and **S6** inhibitors, so that the loss of conformational entropy may be under-penalized in the scoring functions.

Compounds **S1** and **S3** are effective at causing inactivation of GPb in hepatocytes at low micromolar concentrations. The magnitude of the inhibition is smaller than for 25 mM glucose in the absence of the hexokinase inhibitor, which is mediated in part through the raised concentration of glucose 6-P.⁵⁵ However, it is comparable to the effect of 25 mM glucose in the presence of the hexokinase inhibitor which blocks glucose phosphorylation and the elevation in glucose 6-P. This reinforces the conclusion that

whilst glucose is the physiological regulator of GP, its effects are mediated by a dual mechanism, involving both the direct effect of glucose on the active site and the effect of the elevated glucose-6-P that acts synergistically with glucose.^{6,55}

The current synthetic scheme/combinatorial protocols were for glucose-NHCO-R ligands, where by default the -R group was connected to the -NHCO- via a carbon. We now plan to extend our screening approach to glucose analogues with a more extended linker such as -NHCONH- since compounds with this linker have shown high potency.³⁰ In conclusion, the results of the present work, which is the first high-throughput structure-guided screening of commercially available small chemical entities databases for GPIs reported, show that this approach can generate potent drug-like GPIs that are effective both *in vitro* and *ex vivo*.

Acknowledgments

This Project was implemented under the "ARISTEIA" Action of the 'Operational Programme Education and Lifelong Learning' and is co-funded by the European Social Fund (ESF) and National Resources. This work was supported in part by the Postgraduate Programmes 'Biotechnology-Quality assessment in Nutrition and the Environment', 'Application of Molecular Biology-Molecular Genetics-Molecular Markers', Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly. Work at the Synchrotron Radiation Sources, MAX-lab, Lund, Sweden and EMBL Hamburg Outstation, Germany, was supported from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under BioStruct-X (Grant agreement N°283570).

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2014.06.058>.

References and notes

- Oikonomakos, N. G. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2002**, *3*, 561.
- Somsak, L.; Czifrak, K.; Toth, M.; Bokor, E.; Chrysin, E. D.; Alexacou, K. M.; Hayes, J. M.; Tiraidis, C.; Lazoura, E.; Leonidas, D. D.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 2933.
- Oikonomakos, N. G.; Somsak, L. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2008**, *9*, 379.
- Hayes, J. M.; Leonidas, D. D. *Mini Rev. Med. Chem.* **2010**, *10*, 1156.
- Hayes, J. M.; Kantsadi, A. L.; Leonidas, D. D. *Phytochem. Rev.* **2014**, *13*, 471.
- Agius, L. *Mini Rev. Med. Chem.* **2010**, *10*, 1175.
- Treadway, J. L.; Mendys, P.; Hoover, D. J. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2001**, *10*, 439.
- Agius, L. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2007**, *21*, 587.
- Kurukulasuriya, R.; Link, J. T.; Madar, D. J.; Pei, Z.; Richards, S. J.; Rohde, J. J.; Souers, A. J.; Szczepankiewicz, B. G. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 123.
- Kurukulasuriya, R.; Link, J. T.; Madar, D. J.; Pei, Z.; Rohde, J. J.; Richards, S. J.; Souers, A. J.; Szczepankiewicz, B. G. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 99.
- Hampson, L. J.; Arden, C.; Agius, L.; Ganotidis, M.; Kosmopoulou, M. N.; Tiraidis, C.; Eleme, Y.; Sakarellos, C.; Leonidas, D. D.; Oikonomakos, N. G. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 7835.
- Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G.; Tsitsanou, K. E.; Leonidas, D. D.; Chrysin, E. D.; Skamnaki, V. T.; Bischoff, H.; Goldmann, S.; Watson, K. A.; Johnson, L. N. *Structure* **1997**, *5*, 1413.
- Pinotsis, N.; Leonidas, D. D.; Chrysin, E. D.; Oikonomakos, N. G.; Mavridis, I. M. *Protein Sci.* **1914**, *2003*, 12.
- Rath, V. L.; Ammirati, M.; Danley, D. E.; Ekstrom, J. L.; Gibbs, E. M.; Hynes, T. R.; Mathiowetz, A. M.; McPherson, R. K.; Olson, T. V.; Treadway, J. L.; Hoover, D. J. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 677.
- Jakobs, S.; Fridrich, D.; Hofem, S.; Pahlke, G.; Eisenbrand, G. *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, *50*, 52.
- Kantsadi, A. L.; Apostolou, A.; Theofanous, S.; Stravodimos, G. A.; Kyriakis, E.; Gorgogietas, V. A.; Chatzileontiadou, D. S.; Pegiou, K.; Skamnaki, V. T.; Stagos, D.; Kouretas, D.; Psarra, A. M.; Haroutounian, S. A.; Leonidas, D. D. *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *67*, 35.
- 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. *Biochem. (USA)* **1991**, *30*, 10101.
- Papageorgiou, A. C.; Oikonomakos, N. G.; Leonidas, D. D. *Arch. Biochem. Biophys.* **1989**, *272*, 376.
- Somsak, L. *C. R. Chim.* **2011**, *14*, 211.
- Watson, K. A.; Mitchell, E. P.; Johnson, L. N.; Cruciani, G.; Son, J. C.; Bichard, C. J. F.; Fleet, G. W. J.; Oikonomakos, N. G.; Kontou, M.; Zographos, S. E. *Acta Crystallogr.* **1995**, *D51*, 458.
- Gyorgydeak, Z.; Hadady, Z.; Felfoldi, N.; Krakomperger, A.; Nagy, V.; Toth, M.; Brunyanski, A.; Docsa, T.; Gergely, P.; Somsak, L. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 4861.
- Konya, B.; Docsa, T.; Gergely, P.; Somsak, L. *Carbohydr. Res.* **2012**, *351*, 56.
- Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shelley, M.; Perry, J. K.; Shaw, D. E.; Francis, P.; Shenkin, P. S. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1739.
- Schrodinger, L. L. C.: New York, 2011.
- Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C. *J. Mol. Biol.* **1995**, *245*, 43.
- Feher, M. *Drug Discovery Today* **2006**, *11*, 421.
- Irwin, J. J.; Shoichet, B. K. *J. Chem. Inf. Model.* **2005**, *45*, 177.
- Van de Waterbeemd, H. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2005**, *1*, 1.
- Thompson, T. N. *Curr. Drug Metab.* **2000**, *1*, 215.
- Nagy, V.; Felfoldi, N.; Konya, B.; Praly, J. P.; Docsa, T.; Gergely, P.; Chrysin, E. D.; Tiraidis, C.; Kosmopoulou, M. N.; Alexacou, K. M.; Konstantakaki, M.; Leonidas, D. D.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G.; Kozmon, S.; Tvaroska, I.; Somsak, L. *Bioorg. Med. Chem.* **1801**, *2012*, 20.
- Kaminski, G. A.; Friesner, R. A.; Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W. L. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 6474.
- Somsak, L.; Kovacs, L.; Toth, M.; Osz, E.; Szilagy, L.; Gyorgydeak, Z.; Dinya, Z.; Docsa, T.; Toth, B.; Gergely, P. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2843.
- Bentifa, M.; Hayes, J. M.; Vidal, S.; Gueyraud, D.; Goekjian, P. G.; Praly, J.-P.; Kizilis, G.; Tiraidis, C.; Alexacou, K. M.; Chrysin, E. D.; Zographos, S. E.; Leonidas, D. D.; Archontis, G.; Oikonomakos, N. G. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 7368.
- Truchon, J. F.; Bayly, C. I. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 488.
- Zhao, W.; Hevener, K. E.; White, S. W.; Lee, R. E.; Boyett, J. M. *BMC Bioinformatics* **2009**, *10*.
- Sheridan, R. P. *J. Chem. Inf. Model.* **2008**, *48*, 426.
- Swamidass, S. J.; Azencott, C. A.; Daily, K.; Baldi, P. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 1348.
- Mackey, M. D.; Melville, J. L. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 1154.
- Fawcett, T. *Pattern Recogn. Lett.* **2006**, *27*, 861.
- Charifson, P. S.; Corkery, J. J.; Murcko, M. A.; Walters, W. P. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 5100.
- Clark, R. D.; Strizhev, A.; Leonard, J. M.; Blake, J. F.; Matthew, J. B. *J. Mol. Graph. Model.* **2002**, *20*, 281.
- Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 3.
- Jorgensen, W. L.; Duffy, E. M. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 355.
- Tropper, F. D.; Andersson, F. O.; Braun, S.; Roy, R. *Synth. Stuttgart* **1992**, 618.
- Jarrahpour, A.; Alvand, P. *Iran. J. Sci. Technol. Trans. A-Sci.* **2007**, *31*, 17.
- Sirkone, V. G.; Tsoukala, E.; Lamprakis, C.; Manta, S.; Hayes, J. M.; Skamnaki, V. T.; Drakou, C.; Zographos, S. E.; Komiotis, D.; Leonidas, D. D. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 3413.
- Leatherbarrow, R. J. Erithacus Software Ltd Staines, U.K. 1998
- Alexacou, K. M.; Tenchiu Deleanu, A. C.; Chrysin, E. D.; Charavgi, M. D.; Kostas, I. D.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G.; Leonidas, D. D. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7911.
- Leslie, A. G. W.; Powell, H. R. In *Evolving Methods for Macromolecular Crystallography*; Read, R. J., Sussman, J. I., Eds.; Springer, 2007; vol. 245, p 41.
- CCP4. *Acta Crystallogr.* **1994**, *D 50*, 760.
- Schuttelkopf, A. W.; van Aalten, D. M. F. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2004**, *60*, 1355.
- Chen, V. B.; Arendall, W. B., 3rd; Headd, J. J.; Keedy, D. A.; Immormino, R. M.; Kapral, G. J.; Murray, L. W.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 12.
- DeLano, W. L. *The PyMol Molecular Visualization System*; DeLano Scientific: San Carlos, CA, USA, 2002.
- Tudhope, S. J.; Wang, C. C.; Petrie, J. L.; Potts, L.; Malcomson, F.; Kieswich, J.; Yaqoob, M. M.; Arden, C.; Hampson, L. J.; Agius, L. *Diabetes* **2012**, *61*, 49.
- Aiston, S.; Green, A.; Mukhtar, M.; Agius, L. *Biochem. J.* **2004**, *377*, 195.
- Aiston, S.; Hampson, L.; Gomez-Foix, A. M.; Guinovart, J. J.; Agius, L. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 23858.
- Harndahl, L.; Schmoll, D.; Herling, A. W.; Agius, L. *FEBS J.* **2006**, *273*, 336.
- Aiston, S.; Andersen, B.; Agius, L. *Diabetes* **2003**, *52*, 1333.
- Johnson, L. N.; Snape, P.; Martin, J. L.; Acharya, K. R.; Barford, D.; Oikonomakos, N. G. *J. Mol. Biol.* **1993**, *232*, 253.
- Kantsadi, A. L.; Hayes, J. M.; Manta, S.; Skamnaki, V. T.; Kiritsis, C.; Psarra, A. M.; Koutsogiannis, Z.; Dimopoulou, A.; Theofanous, S.; Nikoleousakos, N.; Zoumpoulakis, P.; Kontou, M.; Papadopoulos, G.; Zographos, S. E.; Komiotis, D.; Leonidas, D. D. *ChemMedChem* **2012**, *7*, 722.
- Oikonomakos, N. G.; Kosmopoulou, M.; Zographos, S. E.; Leonidas, D. D.; Chrysin, E. D.; Somsak, L.; Nagy, V.; Praly, J. P.; Docsa, T.; Toth, B.; Gergely, P. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 1684.
- Kantsadi, A. L.; Manta, S.; Psarra, A. M.; Dimopoulou, A.; Kiritsis, C.; Parmenopoulou, V.; Skamnaki, V. T.; Zoumpoulakis, P.; Zographos, S. E.; Leonidas, D. D.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *54*, 740.

Glycogen Phosphorylase as a Target for Type 2 Diabetes: Synthetic, Biochemical, Structural and Computational Evaluation of Novel *N*-acyl-*N'*-(β -D-glucopyranosyl) Urea Inhibitors

Anastassia L. Kantsadi¹, Vanessa Parmenopoulou¹, Dimitar N. Bakalov², Laura Snelgrove², George A. Stravodimos¹, Demetra S.M. Chatzileontiadiou¹, Stella Manta¹, Angeliki Panagiotopoulou³, Joseph M. Hayes^{2,*}, Dimitri Komiotis^{1,*} and Demetres D. Leonidas^{1,*}

¹Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Larissa, Greece; ²Centre for Materials Science, Division of Chemistry, University of Central Lancashire, Preston PR1 2HE, U.K., ³Institute of Biosciences & Applications, National Centre for Scientific Research "Demokritos", 15310 Athens, Greece

Please provide
corresponding author(s)
photograph
size should be 4" x 4" inches

Abstract: Glycogen phosphorylase (GP), a validated target for the development of anti-hyperglycaemic agents, has been targeted for the design of novel glucopyranosylamine inhibitors. Exploiting the two most potent inhibitors from our previous study of *N*-acyl- β -D-glucopyranosylamines (Parmenopoulou *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 22, 4810), we have extended the linking group to –NHCONHCO– between the glucose moiety and the aliphatic/aromatic substituent in the GP catalytic site β -cavity. The *N*-acyl-*N'*-(β -D-glucopyranosyl) urea inhibitors were synthesized and their efficiency assessed by biochemical methods, revealing inhibition constant values of 4.95 μ M and 2.53 μ M. Crystal structures of GP in complex with these inhibitors were determined and analyzed, providing data for further structure based design efforts. A novel Linear Response – Molecular Mechanics Coulomb Surface Area (LR-MM-CBSA) method has been developed which relates predicted and experimental binding free energies for a training set of *N*-acyl-*N'*-(β -D-glucopyranosyl) urea ligands with a correlation coefficient R^2 of 0.89 and leave-one-out cross-validation (LOO-cv) Q^2 statistic of 0.79. The method has significant applications to direct future lead optimization studies, where ligand entropy loss on binding is revealed as a key factor to be considered. ADMET property predictions revealed that apart from potential permeability issues, the synthesized *N*-acyl-*N'*-(β -D-glucopyranosyl) urea inhibitors have drug-like potential without any toxicity warnings.

Keywords: Glycogen phosphorylase; X-ray crystallography; Diabetes type 2; *N*-acyl- β -D-glucopyranosyl ureas; binding free energy; linear response methods.

1. INTRODUCTION

Glycogen phosphorylase (GP; EC 2.4.1.1) is a key enzyme in the glycogen metabolism catalyzing the first step of the intracellular glycogen breakdown to glucose-1-phosphate (Glc-1-P) [1]. In the last decade, GP has been validated as a promising target for the design of anti-hyperglycemic agents [1-4] for the treatment of type 2 diabetes (T2D), and the efficacy of GP inhibitors has been confirmed in animal models [5-9]. The biologically active enzyme is a homodimer composed of two identical subunits, each 842 residues long. Apart from the enzyme active site where the substrate binds and its cofactor pyridoxal-5-phosphate (PLP) resides, GP has at least six other distinct ligand binding sites as revealed by X-ray crystallography studies. These include the allosteric

site, inhibitor site, new allosteric site, glycogen storage site, benzimidazole site and the quercetin binding site [4]. The enzyme activity is regulated allosterically by phosphorylation and follows the MWC model [10]. Thus, it exists in two interconvertible forms: a phosphorylated form (GP_a, R state; high activity and substrate specificity) and an unphosphorylated (GP_b, T state; low activity and substrate specificity). Extensive conformational changes occur upon the T to R conversion by phosphorylation or activation by binding of AMP to the allosteric binding site as revealed by X-ray crystallography studies [11,12]. These mainly involve the structural rearrangement of a flexible loop (residues 282 – 287) named 280s, from a conformation that blocks access to the catalytic site (T state) to the one that allows substrate binding (R state) [11]. This conformational change has been observed consistently upon binding of ligands that promote the R state, while its conformation that blocks the active site is observed upon binding of ligands that stabilize the inactive T conformation [4].

Although the binding of a large number of ligands to the various GP sites have been investigated by biochemical and structural studies, the vast majority refers to

*Address correspondence to these authors at the Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Ploutonos 26, Larissa, Greece; Tel: ++31-2410-565278; Fax: +31-2410-565291; E-mails: dkom@bio.uth.gr; ddleonidas@bio.uth.gr; and Centre for Materials Science, Division of Chemistry, University of Central Lancashire, Preston PR1 2HE, U.K.; Tel: +44-1772-894334; Fax: +44-1772-894981; E-mail: jhayes@uclan.ac.uk

ligands that bind at the catalytic site and are glucose derivatives [13-17]. α -D-glucose is the physiological inhibitor of GP, albeit weak, with an inhibition constant (K_i) of 1.7 mM [18]. However, inhibitor design efforts have focused on glucose derivatives since glucose displays a coordinated regulation of both GP (negatively) and glycogen synthase (positively), and therefore can have an enhanced effect on inhibiting glucose production. Furthermore, the GP α -glucose complex is a better substrate for inactivation by dephosphorylation with phosphorylase phosphatase than free GP α [1]. The most potent glucose inhibitor thus far, is a 2-naphthyl substituted glucopyranosylidene-spirooxathiazole [19] with a K_i value of 160 nM. C-glucopyranosyl-1,2,4-triazoles have also recently been unravelled as a novel skeleton for nanomolar inhibition of GP [20,21]. The efficiency of glucose analogues has been attributed to the exploitation of an extensive network of polar and non-polar interactions with residues that form the β -cavity within the catalytic site, so called because only β -substituents at the anomeric C1 atom of glucose can bind there. Glucose derivatives have proven to be efficient *in vivo* lowering blood sugar levels in normal and obese rats [5], and in mice under normal and hyperglycemic conditions [9].

Critical to the inhibitory potential of glucose analogues is the linker group connecting the glucose moiety with different groups that bind in the β -cavity. The scaffold –NHCONHCO– (*N*-substituted-*N'*- β -D-glucopyranosyl ureas) has to date proved very effective, since compounds bearing this linker are some of the most potent GPb catalytic site inhibitors [4]. Shorter linkers (-NHCO-) are less efficient while longer ones also lead to poorer inhibitors. Variations of this type of linker have been studied and are reviewed in [4,15-17]. Recently we have performed a virtual screening of the ZINC database [22] to discover new C1 substituents for the –NHCO- linker [23]. Six selected compounds from the screening were synthesized and tested both *in vitro* and *ex vivo*, while their structural mode of binding was analyzed by X-ray crystallography [23]. This study resulted in the discovery of two potent inhibitors from this series (**S**) with K_i values of 5.14 μ M (**S1**) and 4.98 μ M (**S6**) (Table 1). The first one was also effective at causing inactivation of GP in rat hepatocytes at low (2 μ M) concentrations [23]. Based on these results and exploiting knowledge about the length of the linker mentioned above, we have now performed a new study and synthesized (Scheme 1) the aforementioned two compounds with the shorter linker –NHCO- replaced by –NHCONHCO- (**4a** and **4b**, Scheme 1). Kinetics experiments are used to reveal the effect of the longer linker on inhibitor potency and X-ray crystallography have revealed the structural basis of their activity against GPb. Exploiting Glide docking poses, computational prediction of binding free energies for *N*-substituted-*N'*- β -D-glucopyranosyl ureas using a novel Linear Response – Molecular Mechanics – Coulomb Surface Area (LR-MM-CBSA) method is revealed as a promising approach for optimizing activity of GPb catalytic site inhibitors. In this regard, entropy contributions are unraveled as crucial. Absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADMET) properties of our new inhibitors were also considered using computation.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Synthesis

Thin layer chromatography (TLC) was performed on Merck precoated 60F254 plates. Reactions were monitored by TLC on silica gel, with detection by UV light (254 nm) or by charring with sulfuric acid. Flash chromatography was performed using silica gel (240-400 mesh, Merck). ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra were obtained at room temperature with a Bruker 300 spectrometer at 300 and 75.5 MHz, respectively using chloroform-*d* (CDCl_3) and methanol-*d*₄ (CD_3OD) with internal tetramethylsilane (TMS). The ^1H assignments were based on ^1H - ^1H COSY experiments executed using standard Varian software. Chemical shifts (δ) were given in ppm measured downfield from TMS, and spin-spin coupling constants are in Hz. Chemical shifts (δ) were given in ppm measured downfield from TMS, and spin-spin coupling constants are in Hz. Mass spectra were obtained on a ThermoQuest Finnigan AQA Mass Spectrometer (electrospray ionization). Optical rotations were measured using an Autopol I polarimeter.

All reactions sensitive to oxygen or moisture were carried out under nitrogen atmosphere using oven-dried glassware. Chloroform (CHCl_3) was distilled from phosphorus pentoxide and stored over 4E molecular sieves. Methanol (MeOH) was stored over 3E molecular sieves. 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl azide (**1**) [24] as well as 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl urea (**2**) [25] were prepared according to the procedures described in literature and their chemical and physical properties were in agreement with previous data.

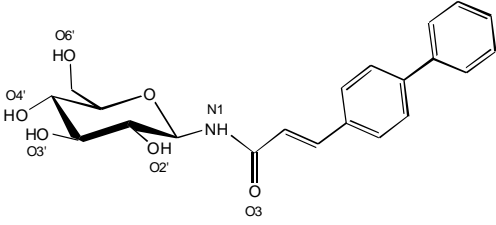
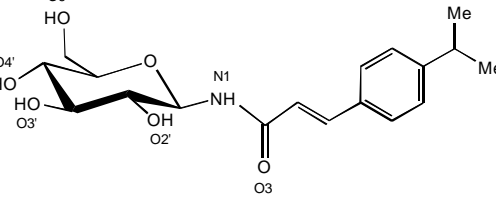
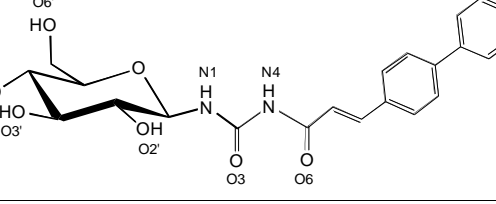
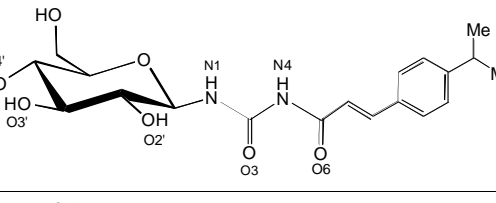
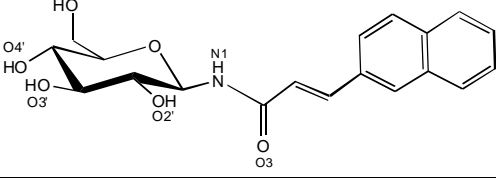
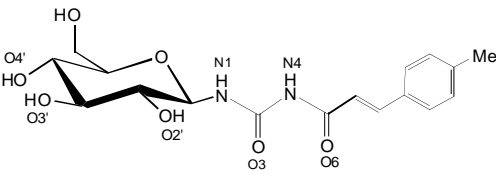
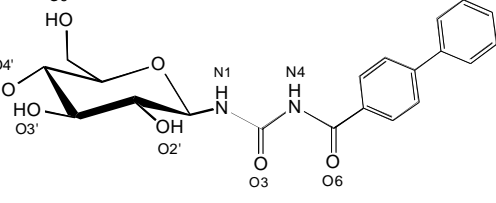
2.1.1. General Procedure for Preparation of the *N*-acyl-*N'*-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylureas (**3a,b**) [26]

To a solution of an acyl chloride (18 mmol) in 20 mL of dry CHCl_3 , anhydrous ZnCl_2 (0.59 mmol) and 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl urea (**2**) (2.56 mmol) were added with stirring. The reaction mixture was refluxed until TLC showed the complete transformation of the urea. Then the reaction mixture was poured into ice-water and was extracted with chloroform (2x). The organic phases were collected and washed with sat. aq. NaHCO_3 solution and water. After drying the solvent was evaporated under vacuo and the residue was purified by flash chromatography (*n*-hexane/EtOAc 1:1).

2.1.2. *N*-(*E*)-3-(Biphenyl-4-yl)acryloyl-*N'*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-urea (**3a**)

White foam, Yield 44%; Rf = 0.28 (*n*-hexane/EtOAc 1:1); $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +4$ ($c = 0.20$, CHCl_3); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 9.37 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, NH), 9.10 (s, 1H, NH), 7.86 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, CH=CH), 7.68-7.38 (m, 9H, ArH), 6.51 (d, 1H, CH=CH), 6.39-5.29 (2pseudo t, 2H, $J = 9.6$, 9.4 Hz, H-1, H-3), 5.17-5.08 (2pseudo t, 2H, $J = 9.4$, 9.5 Hz, H-4, H-2), 4.25 (dd, 1H, $J = 4.3$, 12.5 Hz, H-6b), 4.10 (dd, 1H, $J = 1.9$, 12.5 Hz, H-6c), 3.83 (ddd, 1H, $J = 2.1$, 4.1, 10.0 Hz, H-5), 2.06, 2.05, 2.03, 2.01 (4s, 12H, 4OAc); ^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3) δ 170.6, 170.1, 169.8, 169.4, 166.4, 154.8 (CO), 145.4, 143.7, 139.9, 132.8, 128.9, 128.8, 128.0, 127.7, 127.0, 118.3 (CH=CH and Ar-C), 79.0, 73.6, 73.0, 70.0, 68.2, 61.6 (C-1-C-6), 20.7, 20.6, 20.5 (OCOCH₃);

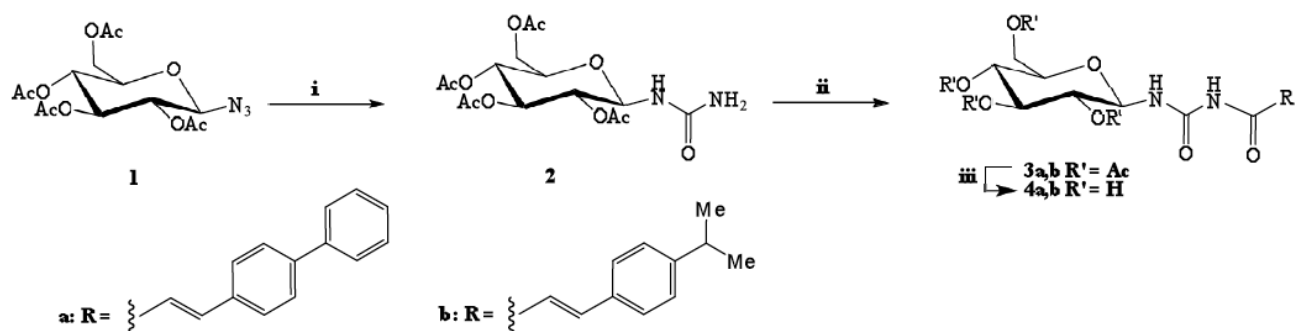
Table 1. The chemical structures together with their inhibition constants (K_i 's) of the most potent N-acyl- β -D-glucopyranosylamines inhibitors S1 and S6 designed in previous work [23], their -NHCONHCO- linker analogues (4a and 4b) studied here, related compounds (5, 6a-c), and three "test set" ligands 7a-c with no experimental inhibition (N.I.) for the modelling calculations.

Compound	Chemical Structure	K_i (μ M)
S1		5.14 ± 0.77 [23]
S6		4.98 ± 0.58 [23]
4a		4.95 ± 0.29
4b		2.53 ± 0.07
5		3.5 [61]
6a		16 [17]
6b		3.7 ± 0.06 [39]

(Table 1) contd....

Compound	Chemical Structure	K_i (μM)
6c		2.3 ± 0.03 [39]
7a		N.I. ^a [17]
7b		N.I. ^a [17]
7c		N.I. ^a [17]

^a No inhibition ($\text{IC}_{50} \geq 5000 \mu\text{M}$).



Scheme 1. (i) NH_3 , CO_2 , THF, Ph_3P , 24 h; (ii) CHCl_3 , RCOCl , ZnCl_2 , reflux; (iii) MeOH, methanolic NaOMe (1M), Amberlyst 15 (H^+ form), 0°C , 20 min

ESI-MS: m/z , 597.24 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Anal. calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_{11}$: C, 60.40; H, 5.41; N, 4.70; Found: C, 60.17; H, 5.59; N, 4.83.

2.1.3. *N*-(*E*)-3-(4-Isopropylphenyl)acryloyl-*N'*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-urea (3b)

White foam, Yield 67%; $R_f = 0.36$ (*n*-hexane/EtOAc 1:1); $[\alpha]_D^{22} = -4$ ($c = 0.20$, CHCl_3); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 9.32 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, NH), 8.59 (s, 1H, NH),

7.80 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}$), 7.47 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, ArH cumenyl), 7.28 (d, 2H, $J = 10.1$ Hz, ArH cumenyl), 6.39 (d, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$), 5.37-5.27 (2pseudo t, 2H, $J = 9.4, 9.8$ Hz, H-1, H-3), 5.15-5.08 (2pseudo t, 2H, $J = 9.4, 9.6$ Hz, H-4, H-2), 4.26 (dd, 1H, $J = 4.4, 12.4$ Hz, H-6b), 4.15-4.08 (dd, 1H, $J = 1.6, 12.4$ Hz, H-6c), 3.83 (ddd, 1H, $J = 2.1, 4.1, 10.0$ Hz, H-5), 2.99-2.90 (m, 1H, $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$), 2.05, 2.03 (2s, 12H, 4OAc), 1.27 (d, 6H, $J = 6.9$ Hz, $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_3$); ^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3) δ 170.7, 170.1, 169.9, 169.4,

166.3, 154.4 (CO), 152.5, 146.1, 131.4, 128.5, 127.2, 117.3 (CH=CH and Ar-C), 79.0, 73.6, 73.0, 70.1, 68.1, 61.6 (C-1–C-6), 34.2, 23.7 (CH₃-CH-CH₃), 20.7, 20.6, 20.5 (OCOCH₃); ESI-MS: m/z, 563.21 [M+H]⁺. Anal. calcd for C₂₇H₃₄N₂O₁₁: C, 57.64; H, 6.09; N, 4.98; Found: C, 57.46; H, 6.34; N, 5.29.

2.1.4. General Procedure for the Preparation of the *N*-acyl-*N'*-β-D-glucopyranosylureas 4a,b

The protected ureas **3a,b** (0.18 mmol) were dissolved in dry MeOH (1 mL), 1-2 drops of 1 M methanolic sodium methoxide (NaOMe) solution were added and the reaction mixture was kept at 0 °C until completion of the transformation (20 min, TLC, EtOAc/MeOH 4:1). Amberlyst 15 (H⁺ form) was then added to remove sodium ions, the resin was filtered off, the solvent was removed and the residue was purified by flash chromatography (EtOAc/MeOH 4:1) to afford pure **4a,b**.

2.1.5. *N*-(*E*)-3-(*Biphenyl-4-yl*)acryloyl-*N'*-(β-D-glucopyranosyl)-urea (4a)

White syrup, Yield 72%; Rf = 0.22 (EtOAc/MeOH 4:1); [α]_D²² = +2 (c = 0.20, MeOH); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 7.83 (d, 1H, *J* = 15.7 Hz, CH=CH), 7.71-7.65 (m, 6H, ArH), 7.51-7.36 (m, 3H, ArH), 6.76 (d, 1H, CH=CH), 4.98 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz, H-1), 3.88 (dd, 1H, *J* = 1.5, 11.8 Hz, H-6c), 3.71 (dd, 1H, *J* = 4.4, 11.8 Hz, H-6b), 3.50-3.37 (m, 4H, H-2–H-5); ¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD) δ 168.8, 156.3 (CO), 145.6, 144.9, 141.4, 134.7, 130.0, 129.9, 129.0, 128.6, 128.0, 120.2 (CH=CH and Ar-C), 82.2, 79.8, 79.1, 74.6, 71.6, 62.9 (C-1–C-6); ESI-MS: m/z, 429.17 [M+H]⁺. Anal. calcd for C₂₂H₂₄N₂O₇: C, 61.67; H, 5.65; N, 6.54; Found: C, 61.39; H, 5.48; N, 6.65.

2.1.6. *N*-(*E*)-3-(4-Isopropylphenyl)acryloyl-*N'*-(β-D-glucopyranosyl)-urea (4b)

White syrup, Yield 76%; Rf = 0.29 (EtOAc/MeOH 4:1); [α]_D²² = +20 (c = 0.20, MeOH); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 7.74 (d, 1H, *J* = 15.7 Hz, CH=CH), 7.53, 7.29 (2d, 4H, *J* = 8.2 Hz ArH cumenyl), 6.64 (d, 1H, CH=CH), 4.94 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, H-1), 3.85 (dd, 1H, *J* = 1.8, 11.6 Hz, H-6c), 3.67 (dd, 1H, *J* = 4.4, 11.6 Hz, H-6b), 3.46-3.34 (m, 4H, H-2–H-5), 2.97-2.88 (m, 1H, CH), 1.25 (d, 6H, *J* = 6.9 Hz, CH₃-CH-CH₃); ¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD) δ 168.9, 156.4 (CO), 153.5, 146.2, 133.4, 129.6, 128.2, 119.3 (CH=CH and Ar-C), 82.2, 79.8, 79.1, 74.6, 71.6, 62.9 (C-1–C-6), 35.4, 24.1 (CH₃-CH-CH₃); ESI-MS: m/z, 395.20 [M+H]⁺. Anal. calcd for C₁₉H₂₆N₂O₇: C, 57.86; H, 6.64; N, 7.10; Found: C, 57.69; H, 6.29; N, 7.23.

2.2. Enzyme Kinetics

Rabbit skeletal muscle glycogen phosphorylase b was isolated, and purified by recrystallization as described previously [27]. Kinetic studies were performed at 30 °C in the direction of glycogen synthesis by measuring the inorganic phosphate released in the reaction by a method reported previously [27]. Briefly, the enzyme (5 μg/ml) was assayed in a 30 mM imidazole/HCl buffer (pH 6.8) containing 60 mM KCl, 0.6 mM EDTA, and 0.6 mM dithiothreitol using constant concentrations of glycogen (0.2% w/v), AMP (1 mM), and various concentrations of Glc-1-P (2, 4, 6, 10 and 20

mM) and inhibitors. Enzyme and glycogen were preincubated for 15 min at 30 °C before initiating the reaction with Glc-1-P. Initial velocities were calculated from the pseudo-first order rate constants. For the calculation and statistical evaluation of the kinetic and binding parameters, the non-linear regression program GRAFIT was used [28].

2.3. X-Ray Crystallography

X-ray crystallographic binding studies were performed by diffusion of a 10 mM solution of the inhibitors in the crystallization media supplemented with DMSO (15%, v/v) in preformed GPb crystals at room temperature for 12 hours prior to data collection. GPb crystals were grown in the tetragonal lattice, space group *P*₄₃₂₁₂, as described previously [29]. X-ray diffraction data were collected using synchrotron radiation on station ID911-2 at MAX-Lab Synchrotron Radiation Source in Lund, Sweden at 100 K. Crystal orientation, integration of reflections, inter-frame scaling, partial reflection summation, and data reduction was performed by the program Mosflm [30] while scaling and merging of intensities were performed by SCALA [31]. Crystallographic refinement of the complexes was performed by maximum-likelihood methods using REFMAC [31]. The starting model employed for the refinement of the complexes was the structure of the native T state GPb complex determined at 1.9 Å resolution (Leonidas *et al.*, unpublished results). Ligand molecule coordinates and topologies were constructed using PRODRG [32] and they were fitted to the electron density maps after adjustment of their torsion angles. Alternate cycles of manual rebuilding with the molecular graphic program COOT [31] and refinement with REFMAC [33] improved the quality of the models. A summary of the data processing and refinement statistics for the inhibitor complex structures is given in Table 2. The stereochemistry of the protein residues was validated by MolProbity [34]. Hydrogen bonds and van der Waals interactions were calculated with the program CONTACT as implemented in CCP4 [31] applying a distance cut off 3.3 Å and 4.0 Å, respectively. Figures were prepared with PyMol [35]. The coordinates of the new structures have been deposited with the RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>) with codes presented in Table 2.

2.4. Computer Modelling

2.4.1. Protein Preparation

The GPb receptor structure was prepared for modelling calculations using its complex with *N*-(4-*tert*-Butylbenzoyl)-*N'*-(β-D-glucopyranosyl)urea [17]. This enzyme conformation was chosen based on the co-crystallized ligand possessing the structural scaffold (–NHCONHCO–) of interest and due to its performance in previous docking studies, with the bulkier substituent opening up the β-cavity in regions complementary to binding of other ligands [36]. Schrödinger's 'Protein Preparation Wizard' [37] was used for the preparation with all crystallographic water molecules deleted except four cavity waters common to *N*-acyl-*N'*-(β-D-glucopyranosyl) ureas complexes co-crystallised with GPb [17]. Three of these waters help to orientate the –NHCONHCO– moiety in its correct crystallographic position, while the other forms a hydrogen bond to the glucose

Table 2. Summary of the diffraction data processing and refinement statistics for the GPb complexes

GPb Complex	4a	4b
<i>Data collection and processing statistics</i>		
Resolution (Å)	38.36 – 1.80	38.88 – 1.80
Outermost shell (Å)	1.85 – 1.80	1.85 – 1.80
Reflections measured	412305 (58512)	231307 (33365)
Unique reflections ^[a]	90140 (6609)	81770 (12263)
Multiplicity ^[a]	4.6 (4.5)	2.8 (2.7)
R_{symm} ^[a]	0.078 (0.324)	0.130 (0.347)
Completeness (%) ^[a]	99.7 (99.9)	91.5 (94.6)
$\langle I/\sigma I \rangle$ ^[a]	11.6 (4.2)	5.5 (1.8)
<i>Refinement statistics</i>		
R_{cryst} ^[a]	0.174 (0.256)	0.194 (0.261)
R_{free} ^[a]	0.198 (0.295)	0.230 (0.296)
No of solvent molecules	364	384
<i>r.m.s. deviation from ideality</i>		
in bond lengths (Å)	0.009	0.009
in angles (°)	1.3	1.4
<i>Average B factor (Å²)</i>		
Protein atoms	29.4	32.6
Solvent molecules	37.9	40.3
Inhibitor atoms	22.9	22.5
PDB entry	4YI3	4YI5

moiety O2' (numbering scheme shown in Table 1). Bond orders were assigned and hydrogen atoms added, with protonation states for basic and acidic residues based on residue pKa's at normal pH (7.0). However, subsequent optimization of hydroxyl groups, histidine C/N atom "flips" and protonation states, and side chain O/N atom "flips" of Asn and Gln residues was based on optimizing hydrogen bonding patterns, so that the final assignments were checked on visual inspection of the protein. In particular, all final His residues were assigned as neutral, either in a HIE or HID state. The PLP co-factor was used in its mono-anion form. Finally, the system was softly minimized using Impref and the OPLS-AA(2005) forcefield [38] with the root-mean-square deviation (RMSD) of heavy atoms kept within 0.3 Å of the crystallographic positions.

2.4.2. Ligand Preparation

For our binding predictions, a training set of 14 *N*-substituted-*N'*- β -D-glucopyranosyl ureas (Table 3) was selected from previous studies [17,39,40] with K_i values ranging from 0.35 – 305 μ M. Both the training set ligands, and a test set consisting of new ligands **4a** and **4b**, and three

ligands with no experimental inhibition (**7a-c**; Table 1) [17] were prepared for calculations using Schrödinger's Maestro and the LigPrep 2.5 program [37]. The test set, therefore, probes the potential of models to correctly predict activities of both active and inactive ligands.

2.4.3. Docking Calculations

In the docking calculations with Glide 5.8 [37], the shape and properties of the catalytic binding site were mapped onto grids with dimensions of 27.3 Å x 27.3 Å x 27.3 Å centred on the native *N*-(4-*tert*-Butylbenzoyl)-*N'*-(β -D-glucopyranosyl) urea ligand. Standard parameters were applied including default OPLS-AA atomic charges and van der Waals scaling for non-polar atoms (by 0.8) to include modest "induced-fit" effects. Both core constraints (1 Å) on the six glucose ring atoms and positional constraints on the hydroxyl (-OH) groups of glucose were applied to retain the moiety close to its known crystallographic position [41]. Amide conformation of ligands were restrained to "trans only" to reflect the observed crystallographic binding conformations for this class of ligands. Glide in standard-precision (SP) rather than extra-precision (XP) mode was used due to its better performance with respect to ranking in preliminary tests. Post-docking minimization of the ligand poses was performed (with strain correction) and a maximum of 5 poses per ligand saved. Poses were considered conformationally distinct for RMSDs (heavy atoms) > 0.5 Å. For comparison, docking calculations were performed on the GPb receptor *with* and *without* the four crystallographic cavity waters retained.

2.4.4. Post-docking Calculations

The top-ranked docking poses were minimized (500 steps, TNCG algorithm) using the Multi-Ligand Biomolecular Association with Energetics (Embrace) module of MacroModel v9.9 in "interaction energy" mode. The OPLS-AA(2005) forcefield [38] together with a distance dependent dielectric (4r) for electrostatics (accounting for water solvent charge screening) was employed, together with an extended cutoff for non-bond interactions (8 Å van der Waals; 20 Å electrostatics). The GPb (and four cavity waters) were held rigid in these calculations, with just the ligand relaxed. The Embrace ΔE_{bind} was then calculated from the interaction energies using the following equation:

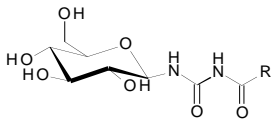
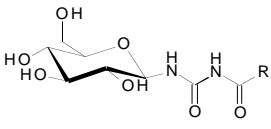
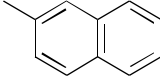
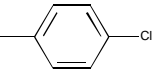
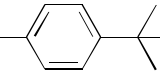
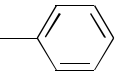
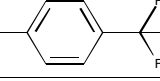
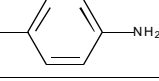
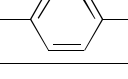
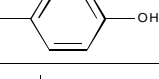
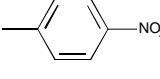
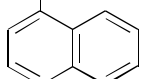
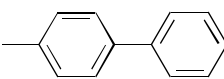
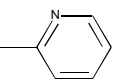
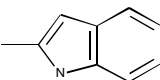
$$\Delta E_{\text{bind}} = E_{\text{complex}} - E_{\text{receptor}} - E_{\text{ligand}} \text{ Eq. (1)}$$

This calculation considers terms that can be considered pair-wise additive. Surface energy terms related to solvation energies is not included, so that we then investigated a more rigorous approach for the estimation of the binding free energies using the following equation:

$$\Delta G_{\text{bind}} = \alpha \Delta E^{\text{vdW}} + \beta \Delta E^{\text{ele}} + \gamma \Delta S_{\text{ASA}} \text{ Eq. (2)}$$

where the Embrace interaction energies were further broken down into their van der Waals (ΔE^{vdW}) and electrostatic (ΔE^{ele}) components, and a term for the change in solvent accessible surfaces areas (ΔS_{ASA}) of receptor and ligand on binding was added. The ΔS_{ASA} term was calculated using the Schrödinger python script binding_sasa.py (all waters deleted) considering the bound and separated states of protein-ligand complexes, while the α , β and γ parameters were

Table 3. The chemical structures of the training set of *N*-acyl-*N'*-(β -D-glucopyranosyl) urea inhibitors employed in our computational studies, together with their K_i values for RMGPb inhibition (listed in order of decreasing potency).

Entry	Structure  R group	K_i [μ M]	Structure  R group	K_i [μ M]	
8a		0.35 ^a	8h		4.40 ^b
8b		0.70 ^a	8i		4.60 ^c
8c		1.80 ^a	8j		6.0 ^b
8d		2.30 ^b	8k		6.3 ^b
8e		3.30 ^b	8l		15 ^a
8f		3.70 ^b	8m		68 ^a
8g		4.00 ^a	8n	—	305 ^c

^a Reference [17], ^b Reference [39], ^c Reference [40].

determined using multiple linear regression with the program Strike v2.1 [37]. Additionally including a term for loss of ligand vibrational, rotational and translational (VRT) entropy (at 300 K) estimated using the rigid rotor harmonic oscillator (RRHO) approximation (rrho_entropy.py v3.3) with Macromodel v9.9 [37] and the OPLS-AA(2005) forcefield [38] yields Eq. (3). The default radius of 5 Å (ligand to receptor atoms) was used in the bound state calculations.

$$\Delta G_{bind} = \alpha \Delta E^{vdW} + \beta \Delta E^{ele} + \gamma \Delta SASA + \delta T \Delta S \text{ Eq. (3)}$$

Equations (2) and (3) are the “general” form of the equations considered in this work for predicting ΔG_{bind} . For example, $\Delta SASA$ was further broken down into hydrophobic and hydrophilic constituents, as described in the results. The approach can be considered a LR-MM-CBSA (Coulomb SA) type method and is in line with the evolution of the original Linear Interaction Energy (LIE) approach of Aqvist *et al.* which estimates the binding free energy as scaled estimates of the change in the van der Waals and electrostatic interactions of the ligands and its environment on binding to a protein [42–44]. The more recent Linear Interaction Energy in Continuum Electrostatics (LIECE) and particularly the Linear Response – Molecular Mechanics – Poisson Boltzmann Surface Area (LR-MM-PBSA) (Eq. (4)) approaches [45]

bears similarity to the LR-MM-CBSA approach employed here:

$$\Delta G_{bind} = \alpha \Delta E^{vdW} + \beta \Delta G^{ele-sol} + \beta_2 \Delta G^{non-ele-sol} + \gamma \text{ Eq. (4)}$$

where the solvation free energy (ΔG^{Sol}) is the summation of $\Delta G^{Ele-Sol}$ and $\Delta G^{non-ele-sol}$. In the case where a common ligand scaffold is being studied, as in the current case, protein flexibility can be ignored in calculations of this type and single minimizations employed rather than computationally expensive MD simulations, averaging over snapshots [45].

2.4.5 Pharmacokinetics Predictions

ADME properties for the ligands **4a** and **4b** were calculated using QikProp 3.5, and results compared with those for **S1** and **S6** with the shorter -NHCO- linker [37]. Specifically, Lipinski's rules of five [46] [MW < 500, log P < 5, HBA < 10, and HBD < 5] and Jorgensen's rule of three [47] [log S > -5.7, Caco-2 cell permeability > 22 nm/s, number of Primary Metabolites < 7] were applied to predict oral bioavailability. Other properties calculated were polar surface area (PSA), logBB (the logarithm value of brain to plasma concentration ratio) and binding to human serum albumin (log K_{hsa}). Default QikProp settings were employed for these calculations,

while the presence of any toxicity warnings from the FAF-Drugs2 server was also investigated [48].

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Synthesis

For the synthesis (Scheme 1) of the target *N*-acyl-*N'*-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylureas (3a,b), the per-*O*-acetylated β -D-glucopyranosyl urea (2), easily prepared via its corresponding phosphinimine derivative [25] seemed a suitable precursor. Therefore, acylation of compound 2 [25], by zinc chloride (ZnCl₂) catalyzed reaction of the corresponding acyl chlorides RCOCl (a,b), was attempted to give derivatives 3a,b. After aqueous workup and extraction into CHCl₃ followed by purification with column chromatography, only the β -anomers 3a,b were isolated in acceptable to moderate yields (44 and 67%, respectively), as determined by their ¹H NMR spectra ($J_{1,2} \geq 9.4$ Hz) [26]. Subsequent deacetylation of analogues 3a,b under Zemplén conditions at 0 °C for 20 min, closely controlled by TLC in order to avoid loss of the *N*-acyl group, afforded the fully deprotected derivatives 4a,b after flash chromatography, in good yields (72 and 76%, respectively).

All compounds were well characterized by ¹H and ¹³C NMR, mass spectrometry and elemental analysis and gave satisfactory analytical and spectroscopic data, which were in full accordance with their depicted structure.

3.2. Biochemical Analysis

To assess the newly synthesized compounds we tested their inhibitory potency via kinetics experiments with rabbit muscle glycogen phosphorylase b (GPb) in the direction of glycogen synthesis. Although the pharmaceutical target is human liver GPb, we use rabbit muscle GPb due to its availability and its propensity to produce good quality crystals. The active sites of both isoenzymes are identical in amino-acid sequence and structural architecture and hence ligands that bind at the rabbit muscle GPb catalytic site are expected to be potent against human liver glycogen phosphorylase as well. The validity of this assumption has been successfully tested and inhibitors of the muscle enzyme display equal and in some cases stronger potency against the liver enzyme [1,4,14,16,17]. The inhibition constants are shown in Table 1. Both compounds are potent inhibitors with K_i values in the low μ M range and displayed competitive inhibition with respect to the substrate Glc-1-P, at constant concentrations of glycogen and AMP. It seems that the longer linker did not improve the potency of **4a** with respect to that of **S1** since their K_i values are similar (4.95 and 5.14 μ M, respectively). Moreover, **4b** and **S6** also display similar potencies with K_i values of 2.53 and 4.98 μ M, respectively. The most structurally similar GPb inhibitor to **4a** and **4b** reported is compound **6a** (Table 1) with a K_i value of 16 μ M [17]. The lower values K_i of **4b** and **4b** with respect to that of **6a** could be attributed to the bulkier more hydrophobic substituents biphenyl of **4a** and isopropyl-phenyl of **4b** compared to the methyl-phenyl of **6a**. From the inhibition constant values (Table 1) it seems that the linker preferentially improved the potency of the compound with the isopropyl-phenyl substituent.

3.3. Structural Analysis

Towards elucidating the structural basis of inhibition and most importantly the differences in the inhibition constants, we have determined the crystal structures of the two inhibitors in complex with GPb (Table 2). Both inhibitors were found bound at the active site with their atoms well defined within the electron density maps (Fig. 1). The anchor point for each of the inhibitors appears to be the glucose moiety which is engaged in a hydrogen bond (Table 4) and van der Waals interactions network almost identical to those that have been observed for glucose and in other glucose containing inhibitors. [1,13,16,17]. Inhibitors **4a** and **4b** bind very similar with their large hydrocarbon substituent in the β -pocket participating in van der Waals interactions with residues Glu88, Asn133, Tyr280, Asn282, Asp283, Phe286, Arg292, His341, and Glu385 while in addition to these, **4a** forms van der Waals interactions with Glu287 (Fig. 2). Both inhibitors upon binding induce a significant conformational change of the 280s loop in comparison to the free structure. The presence of the large hydrocarbon group induces a displacement of this loop away from the active site making space for binding of the inhibitor. Thus, upon superposition of the residues comprising the 280s loop onto their corresponding ones in the free GPb a RMSD value of 3.2 Å is calculated for both the **4a** and **4b** complexes. Comparing this value with the value that derived from the conformational change of the 280s loop in the **S1** and **S6** complexes (1.5 and 2.2 Å) it seems that the new inhibitors trigger a more extended displacement of the 280s loop than their parental ones (Fig. 3). Briefly, in both complexes Asn284 shifts away from its position in the β -pocket (180° rotation and 3.8 Å on the C α position). By this movement Asn284 is placed between the phenyl rings of Phe285 and Tyr613, two residues that constitute the inhibitor site at the entrance of the catalytic site in GPb, resulting in the obstruction of the entrance a

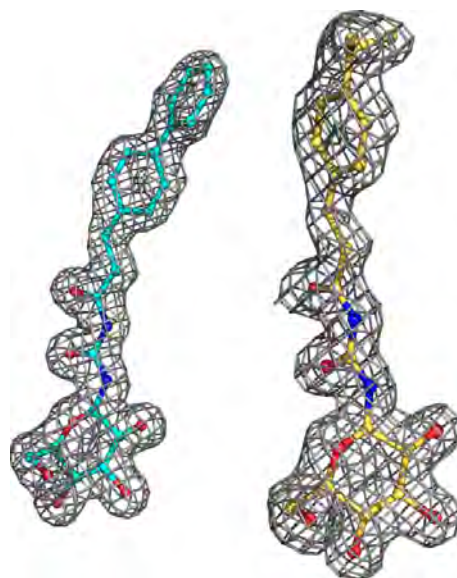


Fig. (1). The REFMAC 2F_o-F_c electron density maps of bound ligands contoured at 1.0 σ before the incorporation of the ligand models in the refinement process. The final refinement models of **4a** (left), and **4b** (right) are shown.

Table 4 Potential hydrogen bond interactions of inhibitors with GPb residues in the crystal. Data for S1 and S6 complexes are from [23].

Inhibitor Atom	Protein Atom	Distance (Å)			
		S1	S6	4a	4b
O2'	Tyr573 OH	3.2	-	3.1	3.1
	Glu672 OE1	3.2	3.1	3.2	3.2
	Water	2.6	2.7	2.8	2.8
O3'	Water	-	-	2.7	2.9
	Glu672 OE1	2.8	2.6	2.8	2.9
	Ala673 N	3.3	-	3.3	3.3
	Ser674 N	3.0	3.1	3.0	3.1
O4'	Gly675 N	3.2	3.0	3.3	3.3
	Gly675 N	2.8	2.8	2.8	2.9
	Water	2.7	2.6	2.7	2.6
O6'	His377 ND1	2.7	2.6	2.7	2.7
	Asn484 OD1	2.7	2.9	2.8	2.9
N1	Water	-	-	-	2.9
O3	Leu136 N	3.0	3.0	3.0	3.0
	Water	2.8	3.1	3.2	3.2
	Water	-	2.9	-	3.2
	Water	-	-	-	3.3
N4	Water	-	-	2.7	3.2
O6	Water	-	-	2.9	2.8
	Water	-	-	2.8	2.7
Total		13	12	17	20

long channel that leads to the active site. The Asn284 conformational change drifts the rest of the residues of the 280s loop away from the β -pocket. This conformational change of the 280s loop has been also observed in other GPb ligand complexes with bulky benzoyl moieties and promotes the R to T allosteric conversion of the enzyme [39,40,49].

A structural comparison of the binding of inhibitors **4a** and **4b** to that of **S1** and **S6** [23] reveals the structural basis of the similarity (**4a** and **S1**) or improvement (**4b** and **S6**) in their inhibitory potency. Thus, while both **4a** and **S1** engage in a similar hydrogen bond interactions network (Table 4) with protein residues, the addition of the additional -NHCO-group in the linker allows **4a** to be involved in water mediated hydrogen bond interactions with the side chain atoms of Asp283 and Asp339, and the main chain amides of Gly134, Leu136, and Gly137; interactions that do not exist in the **S1** complex [23]. Despite the fact that the longer linker drives the biphenyl group of **4a** deeper in the β -pocket, **4a** and **S1** engage in the same number of van der Waals interactions [23]. Another significant difference in the structural mode of binding of these two inhibitors is the extent of the conforma-

tional change of the 280s loop. While the binding of **S1** causes a mere displacement of the 280s loop, the binding of **4a** triggers a significant conformational change (RMSD of 1.72 Å upon superposition of residues 282-287 in the two complexes). It seems that this conformational change is triggered by the placement of the biphenyl group of **4a** deeper in the β -pocket than **S1**, as a result of the elongated linker group. In conclusion, it seems that compared to binding of **S1**, the additional water mediated hydrogen bond interactions of **4a** with protein residues counteract the energy cost for the additional conformational change of the 280s loop, and therefore the inhibitory potency of the two inhibitors is very similar.

The comparison of the structural mode of binding of **4b** and **S6** reveals that both inhibitors form a similar hydrogen bonding (Table 4) and van der Waals interactions network with protein residues. The difference again lies with the water mediated ones which in the case of **4b** include interactions with the chain atoms of residues Glu88 and Asp283 and the main chain atoms of Gly134 and Leu136. Furthermore, the conformational change imposed by the binding of

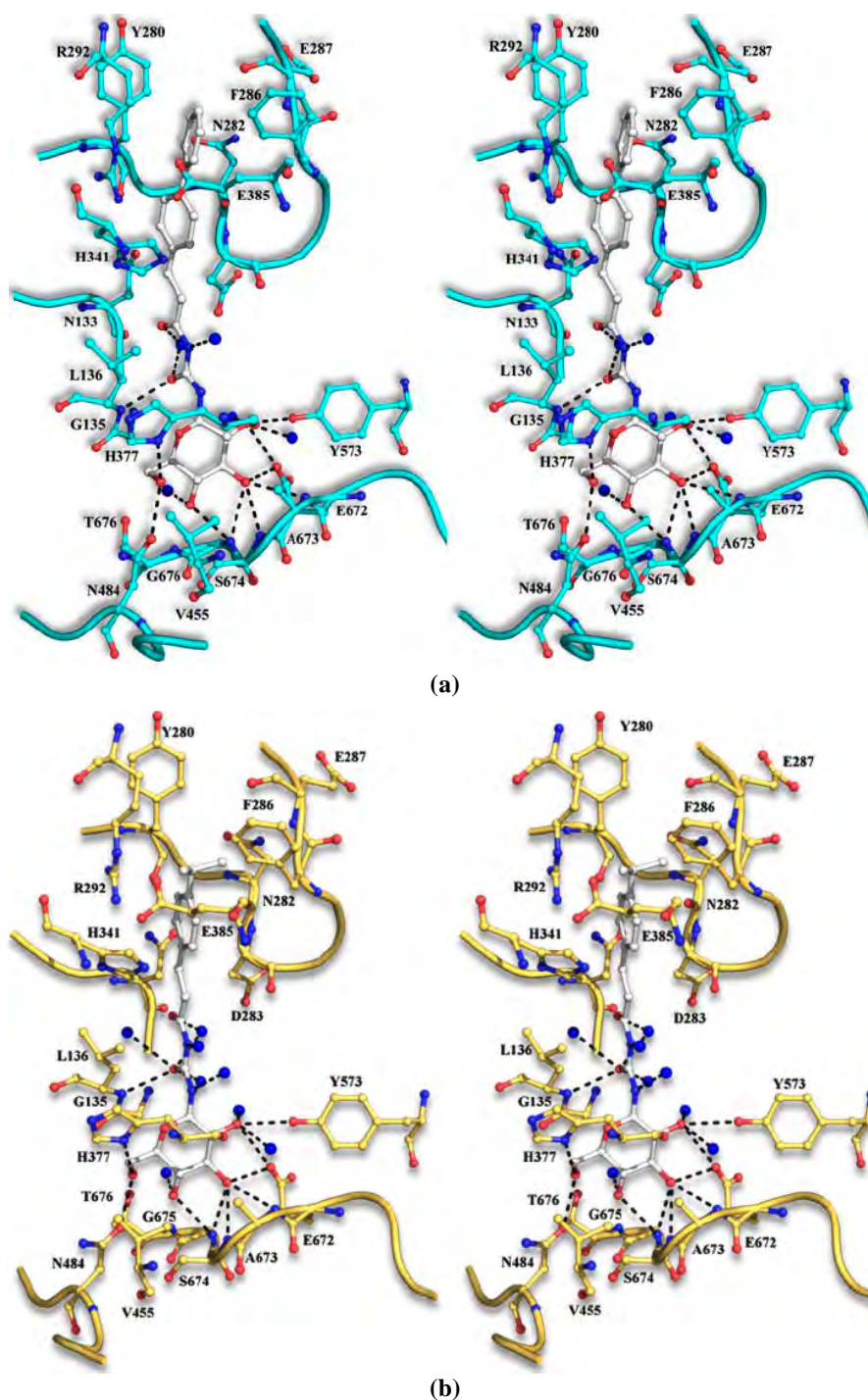


Fig. (2). Stereo diagrams of the binding of **4a** (a), and **4b** (b), at the active site of GPb. Hydrogen bonds are shown as dashed lines and water molecules as black spheres labeled W.

the two inhibitors on the 280s loop is similar and the 280s loop has a similar conformation in both complexes (RMSD value of 0.98 Å upon superposition of residues 282-287 in the two complexes). Therefore, it seems that the improvement of the inhibitory potency of **4b** with respect to that of **S6** can be attributed to the additional water mediated interactions.

A structural comparison of the **S1** and **S6** GPb complexes with the GPb - *N*-4-methylbenzoyl-2-*N'*- β -D-

glycopyranosyl urea complex [39] (Table 1, 5), the inhibitor ($K_i=2.3 \mu\text{M}$) whose scaffold was used for modelling **S1** and **S6**, revealed that the lack of the second carbonyl oxygen in the linker and its water-mediated interactions were responsible for the slightly better inhibitory potency of the scaffold compound [23]. These interactions exist with **4b** and lead to an inhibitor with similar potency ($K_i=2.5 \mu\text{M}$) to that of **F** ($K_i=2.3 \mu\text{M}$).

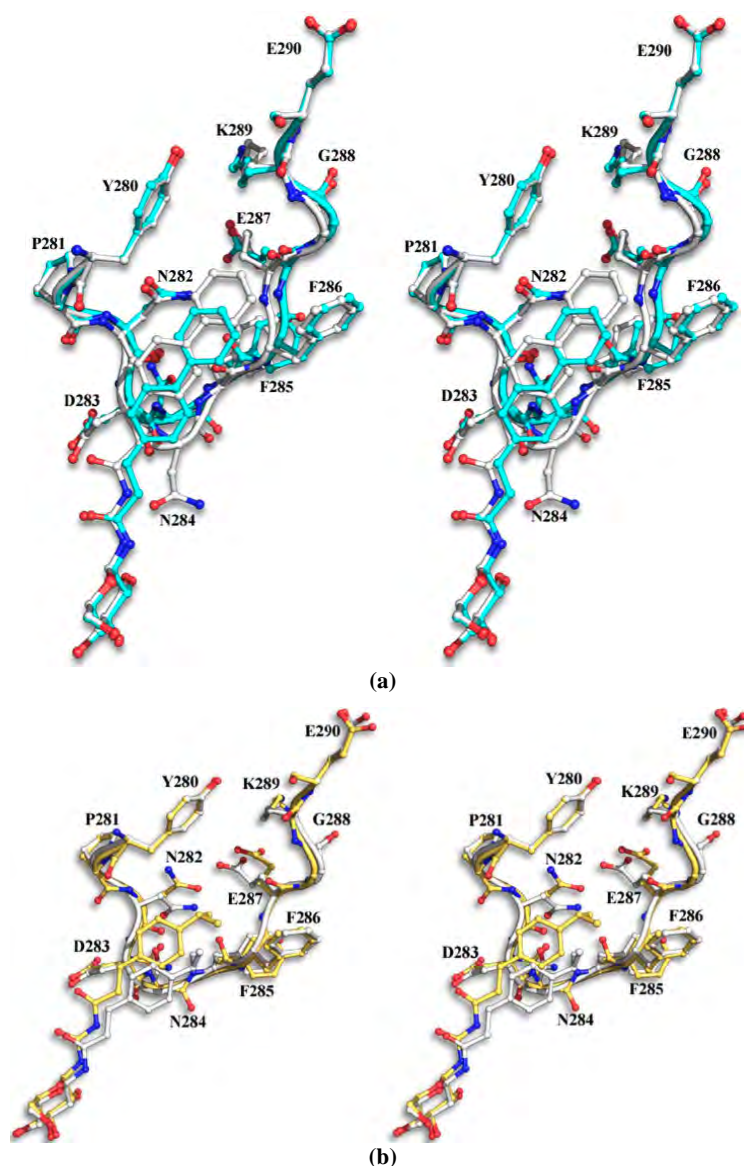


Fig. (3). Stereo diagram of the superposition of the **4a** (black) and **S1** (white) (a) and **4b** (black) and **S6** (white) (b) GPb ligand complexes at the active site.

The most similar compounds to **4a** and **4b** studied for binding to GPb are **6b** and **6c** respectively (Table 1) [39]. A comparative structural analysis showed that **4a** and **6b** bind with similar conformation with the exception of the biphenyl ring which is inclined by 37°. Only minor structural differences exist in the β -pocket architecture between the two complexes. These include the displacement of a water molecule by the second phenyl group of **4a** and a slight movement of the 286-287 segment (0.2 -0.5 Å) away from the cavity to allow the binding of **4a**. The presence of the C=C double bond next to the -NHCO- linker which positions the isopropylphenyl group deeper in the β -cavity leads to a small difference in the number of van de Waals interactions of **4a** in comparison to **6b** (125 and 113 respectively). Inhibitors **4b** and **6c** bind with a similar conformation to GPb, and the isopropylphenyl ring of **4b** is inclined by 34° to the conformation of methylphenyl ring of **6c**. Upon binding, **4b** displaces three conserved water molecules in addition to those

displaced by **6c** [39]; it also forms two additional hydrogen bonds to water molecules and nine additional van der Waals interactions with respect to those of the **6c** complex. The conformation of the β -cavity does not change and easily accommodates both the methylphenyl and the isopropylphenyl groups of **4b** and **6c**, respectively. Despite the additional interactions formed by inhibitors **4a** and **4b** their inhibitory potencies are similar to those of **6b** and **6c**, respectively (Table 1). Our computational results make a valuable contribution towards understanding the energetics of binding at the GPb catalytic site.

3.4. Computational

3.4.1. Docking Results

As mentioned in Section 2.3, to evaluate the performance of Glide 5.8 with respect to scoring and ranking of a congeneric series of ligands binding at the GPb catalytic site, a

training set of 14 *N*-substituted-*N'*- β -D-glucopyranosyl ureas ligands was employed (Table 3). Current docking methods have applications in the recovery/identification of active ligands in virtual screening studies, but generally not in the relative ranking of activities which require more accurate methods [50,51]. We have previously noted, however, the potential of the Glide docking program to correctly rank potencies of a series of glucopyranosylidene-spiroisoxazolines ligands binding at GPb [41].

For the training set ligands, the correlation between the Glide-SP docking scores and experimental binding free energies (calculated using $\Delta G_{bind} = -RT \ln K_i$) was significant for both docking to GPb with no cavity waters, $R^2 = 0.70$, and with the four cavity waters retained, $R^2 = 0.75$ (Fig. 4). However, quickly testing the latter linear regression model to estimate the ΔG_{bind} values of experimentally inactive test set ligands 7a-c gives values of $-7.21 - -6.74$ (K_i 's of 6-12 μ M). The estimates for 4a and 4b are almost the same, with ΔG_{bind} values of -7.41 and -7.18 kcal/mol, respectively (K_i 's \sim 4-6 μ M). Clearly, therefore, the docking fails to distinguish the actives from inactives. The RMSDs in-place (heavy atoms) between the top-ranked docking poses and crystallographic ligand positions did transpire to be close to experiment at 0.827 Å (0.647 Å) and 0.954 Å (0.976 Å) for 4a and 4b, respectively (values with no cavity waters included in docking are given in parentheses).

3.4.2. Embrace & LR-MM-CBSA Results

Following minimization of the best docking poses using Embrace in interaction energy mode, the RMSDs between predicted and crystallographic atomic positions were similar to those obtained from docking at 0.859 Å (0.816 Å) and 0.956 Å (0.926 Å) for 4a and 4b, respectively (values with no cavity waters retained are given in parentheses). The effect of the retention of the four crystallographic waters in the binding site was therefore negligible with respect to the RMSDs. With respect to scoring, the correlation between the Embrace ΔE_{bind} (interaction energy) values (Eq. (1)) and experimental ΔG_{bind} values for the training set of ligands was slightly less than with the docking scores (by \sim 0.05), with R^2 values of 0.64 (no cavity waters) and 0.71

(four cavity waters). Hence, given the consistently better predictions of relative activities when retaining these water molecules, our LR-MM-CBSA models were then derived using this system.

The results of the multiple linear regression for the training set of 14 ligands using LR-MM-CBSA and the general equations (2) and (3) are shown in Table 5. Equations were derived (and modified) stepwise so as to achieve better predictive models. In this regard, a comprehensive statistical evaluation of the relationship between predicted and experimental activities (ΔG_{bind}) was obtained using the program Strike [37]. This included the correlation coefficient R^2 , leave-one-out cross-validation (LOO-cv) Q^2 , F and p-values, as well as the root mean square error (RMSE) in kcal/mol between predicted and experimental binding free energies.

From Table 5, we see that for *model 1* (Eq. (2)), similar agreement between predicted and experimental ΔG_{bind} values was obtained ($R^2 = 0.69$) compared to using Embrace (Eq. (1)) in interaction energy mode ($R^2 = 0.71$). However, the LOO-cv Q^2 value was poor (0.27) and the derived α , β and γ coefficients were not statistically significant, considering the T values (coefficient/standard error) and corresponding p-values (> 0.05).

Further including a term for ligand entropy loss, Eq. (3) and *model 2*, had a considerable effect on the R^2 correlation (0.85) and LOO-cv Q^2 (0.61), but in this case the α coefficient of the ΔE^{vdW} term was not statistically significant. In an attempt to resolve this, we divided the ΔS_{ASA} into its hydrophobic and hydrophilic constituents, where separating the ΔS_{ASA} into polar and non-polar parts has previously proved effective in linear response QM/MM methods for estimating binding affinities [52]. This approach yielded *model 3* (modified Eq. (3)) and the best R^2 value of 0.90 with LOO-cv Q^2 at 0.66. *Model 3*, however, revealed through the γ_2 coefficient T value, that $\Delta S_{ASA}(\text{hydrophilic})$ does not make a significant contribution to the dependent variable, ΔG_{bind} . Omitting this from the equation, yielded the statistically significant *model 4* (modified Eq. (3)) with all coefficients having p values < 0.05 , and R^2 and LOO-cv Q^2 values of 0.89 and 0.79, respectively (Fig. 5; Table 6). With *model 4*,

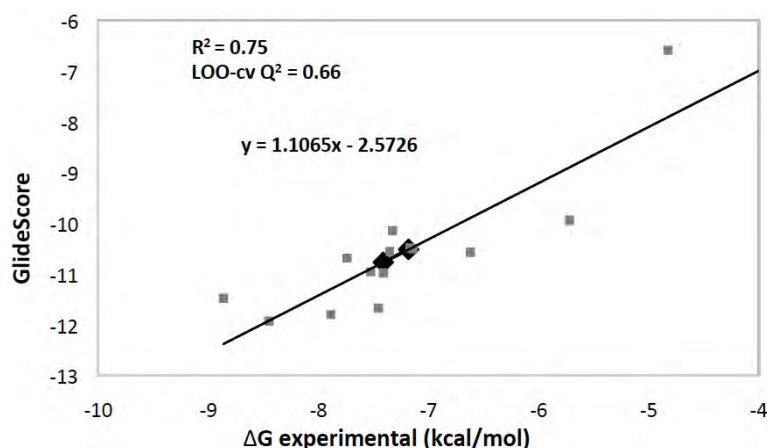


Fig. (4). For the training set of 14 ligands (Table 3), correlation between the Glide-SP docking scores and corresponding experimental binding free energies ($\Delta G_{bind} = -RT \ln K_i$). Using the linear regression equation, the predicted " $\Delta G_{experimental}$ " of the test set ligands **4a** and **4b** are shown in black diamonds.

Table 5. Results of the LR-MM-CBSA calculations as described in the text.^a

Model	Equation (ΔG_{bind})	α	β	γ or γ_1	γ_2	δ	R^2	LOO ^b cv Q ²	RMSE ^c	F[df ₁ ,df ₂] ^d	p-value ^e
1	$\alpha\Delta E^{vdw} + \beta\Delta E^{ele} + \gamma\Delta SASA$	0.0518 ± 0.0366	-0.0099 ± 0.0246	-0.0026 ± 0.0089	-	-	0.69	0.27	0.55	7.4[3,10]	6.6e-03
2	$\alpha\Delta E^{vdw} + \beta\Delta E^{ele} + \gamma\Delta SASA + \Delta T\Delta S$ $\alpha\Delta E^{vdw} + \beta\Delta E^{ele} + \gamma_1\Delta SASA(hydrophobic)$	0.0064 ± 0.0300	0.0888 ± 0.0357	0.0198 ± 0.0095	-	-0.8784 ± 0.2751	0.85	0.61	0.37	13.3[4,9]	8.2e-04
3	$+ \gamma_2\Delta SASA(hydrophobic) + \delta T\Delta S$	0.0339 ± 0.0297	0.0926 ± 0.0312	0.0159 ± 0.0086	0.0087 ± 0.0101	-0.7412 ± 0.2505	0.90	0.66	0.31	14.7[5,8]	7.5e-04
4	$\alpha\Delta E^{vdw} + \beta\Delta E^{ele} + \gamma_1\Delta SASA(hydrophobic) + \delta T\Delta S$	0.0579 ± 0.0099	0.0818 ± 0.0281	0.0090 ± 0.0030	-	-0.5820 ± 0.1654	0.89	0.79	0.32	18.7[4,9]	2.2e-04

^a Coefficients α , β , γ , γ_1 , γ_2 and δ are given with their standard errors. ^b Leave-one-out cross validated Q². ^c Root mean square of the error in kcal/mol when predicting ΔG_{bind} ; ^d F statistic; df = degrees of freedom. ^e p-value for corresponding F value.

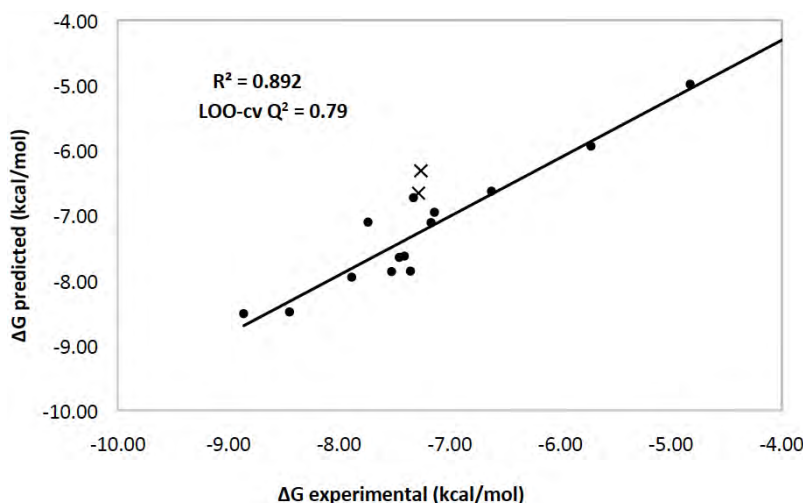


Fig. (5). Using LR-MM-CBSA model 4 (Table 5), correlation plot of predicted versus binding free energies for the training set of 14 ligands (Table 3) and two of the test set ligands 4a and 4b (highlighted by × symbols).

although the K_i 's of 4a and 4b were slightly over-estimated at 24.9 and 13.8 μ M, respectively, unlike the docking results there was now a better distinction between actives and inactives, with the predicted K_i 's for the inactive test set ligands 7a-c of ~ 114 , 58 and 2682 μ M, respectively.

In summary, therefore, entropy considerations have been revealed as a significant factor towards ligand potency at the GPb catalytic site. This is in contrast to a number of other studies with different targets, where the presence of an entropic term did not improve the prediction accuracy (c.f. reference [44] and references within). For our best model 4, $\Delta SASA$ was not a significant contributor to ΔG_{bind} . The non-electrostatic free energy of solvation is included in the $\Delta SASA$ term, with this term also including solvent entropy contributions. The entropic terms are less important for polar atoms, where energy contributions dominate; these are included in the ΔE^{ele} term. The dependence of ΔG_{bind} on $\Delta SASA(hydrophobic)$ could be suggestive of the importance of a “hydrophobic effect” and freeing water molecules from hydrophobic regions of the receptor and ligand surfaces. In support of this, the $\Delta SASA(hydrophobic)$ term in model 4 with a coefficient of 0.0090 is similar to,

for example, the “hydrophobic” term employed in reference [53], a MM-PBSA proposed rescoring approach for docking poses:

$$T\Delta S_{Hvob} = (\text{surface area buried upon complex formation}) \times 0.0060 \text{ kcal/mol}\text{\AA}^2 \quad \text{Eq. (5)}$$

The 0.006 kcal/(mol \AA^2) coefficient accounts for the partitioning of solute molecules between water and organic phases, where ΔG_{bind} was modelled as:

$$\Delta G_{bind} = \Delta G_{Ele}^{Sol} + \Delta H_{vdw} - T\Delta S_{Hvob} - T\Delta S_{TRotB} \quad \text{Eq. (6)}$$

ΔG_{Ele}^{Sol} and ΔH_{vdw} terms represent the Poisson-Boltzmann electrostatic and van der Waals energy, and $T\Delta S_{TRotB}$ is a ligand entropy term accounting for freezing “rotatable bonds” on binding. There is much debate about the exact origins of the hydrophobic effect [54], but model 4 which considers $\Delta SASA(hydrophobic)$ only, potentially suggests that it reflects the release of structured (entropically unfavorable) waters from hydrophobic surfaces when the ligand and surface of the binding pocket come into contact, at least in the case of the ligands and system studied here.

Table 6. For the best LR-MM-CBSA model (model 4, Table 5), data for each ligand (training and test set) used to calculate the binding free energies, ΔG_{bind} .^a

Ligand	ΔG_{bind}		Linear Response Terms (Unscaled)			
	Experimental	Predicted	ΔE^{vdw}	ΔE^{ele}	TAS	$\Delta \text{SASA}^{\text{hyd}}(\text{\AA}^2)$
<i>Training Set</i>						
8a	-8.86	-8.52	-214.37	-74.14	-19.92	-182.03
8b	-8.45	-8.49	-231.67	-75.54	-21.12	-133.03
8c	-7.89	-7.96	-200.68	-75.28	-20.49	-234.22
8d	-7.74	-7.11	-193.56	-74.82	-19.69	-138.32
8e	-7.53	-7.87	-205.08	-75.62	-19.56	-133.03
8f	-7.46	-7.65	-217.63	-78.13	-22.38	-187.50
8g	-7.41	-7.63	-202.58	-76.84	-20.07	-144.89
8h	-7.35	-7.86	-193.78	-75.44	-19.41	-196.66
8i	-7.33	-6.74	-182.88	-75.11	-19.33	-139.73
8j	-7.17	-7.12	-189.48	-75.53	-19.32	-135.31
8k	-7.14	-6.96	-187.92	-75.60	-19.45	-135.50
8l	-6.62	-6.63	-199.01	-68.21	-20.81	-182.92
8m	-5.72	-5.94	-182.74	-72.99	-19.34	-72.65
8n	-4.83	-4.99	-149.16	-76.54	-17.88	-55.65
<i>Test Set</i>						
7a	N.I. ^b	-5.42	-183.73	-75.21	-20.76	-79.22
7b	N.I. ^b	-5.82	-190.61	-73.43	-21.43	-139.09
7c	N.I. ^b	-3.53	-176.00	-71.54	-24.47	-192.18
S1	-7.26	-6.32	-209.82	-82.17	-24.42	-185.55
S6	-7.28	-6.67	-218.52	-79.86	-23.58	-134.45

^a Energies in kcal/mol. ^b No inhibition.

3.4.3. Pharmacokinetic Predictions

The results of the ADME predictions are shown in Table 7. An orally active drug should have no more than one violation of Lipinski's 'rule of five' [55] and more drug-like molecules have fewer violations of Jorgensen's 'rule of three' [47,56]. The newly synthesized 4a and 4b ligands have only one violation of each, while their -NHCO- analogues S1 and S6 have no violations. The Lipinski violation is in each case due to too many hydrogen bond donors (HBDs), 6 instead of ≤ 5 , but this is still within the range for 95% of known drugs and consistent with some recently reported 'beyond rule of five' studies [57,58]. For Jorgensen's rules, the Caco-2 cell permeability ($> 22 \text{ nm s}^{-1}$) rule is violated by 4a and 4b (values $\sim 17 \text{ nm s}^{-1}$), a potential problem we have noted previously for otherwise promising glucose analogue inhibitors [59]. This is also reflected in their PSA's ($\sim 170 \text{ \AA}^2$), greater than Veber's recommended value of $< 140 \text{ \AA}^2$ [60]. The log K_{hsa} values (degree of human serum albumin affecting bioavailability) are similar for ligands 4a,

4b, S1 and S6 $\sim -0.6 - -0.9$ and well within the range for 95% of known drugs ($-1.5 - 1.5$). For logBB (blood-brain barrier coefficients), values were revealed as lower values for 4a-b (~ -3.0) compared to S1 and S6 (-2.4), an artefact of the increased polarity. Finally, the FAF-Drugs2 server revealed all ligands (4a-b, S1 and S6) to be devoid of any potential toxicity structural warnings.

CONCLUSION

N-acyl-*N'*-(β -D-glucopyranosyl) urea ligands **4a** and **4b** have been synthesized and revealed to have strong inhibitory potency of GPb, with K_i values of 4.9 and 2.5 μM , respectively, only eight sub- μM catalytic site inhibitors reported to date [4]. The new inhibitors, however, do not display a significantly increased inhibitory potency compared to their parental **S1** and **S6** compounds despite additional interactions with the protein, as determined using X-ray crystallography. We have defined a novel LR-MM-CBSA approach to model ligand binding at the GP catalytic site [36] which has

Table 7. Results of ADME property predictions for the *N*-acyl- β -D-glucopyranosylamines inhibitors S1 and S6 and their –NHCONHCO- linker analogues 4a and 4b, respectively.^[a]

Ligand	Lipinski's Rule of Five and Violations (V) ^[b]				V	Jorgensen's Rule of Three and Violations (V) ^[b]			V	PSA [\AA^2] ^[c]	$\log K_{\text{hsa}}$ ^[d]	$\log BB$ ^[e]	TSW ^[f]
	<i>M_r</i> [Da]	HBD ^[g]	HBA ^[h]	$\log P_{(o/w)}$		Caco-2 [nm s^{-1}] ^[i]	$\log S$	NMP ^[j]					
	(<500)	(≤ 5)	(≤ 10)	(<5)		(>22)	(>5.7)	(<7)		(<140 \AA^2)			
S1	385.4	5	7	0.9	0	79.8	-3.6	5	0	131.8	-0.60	-2.4	-
4a	428.4	6	9	0.4	1	16.9*	-3.7	5	1	169.7	-0.75	-3.1	-
S6	351.4	5	7	0.3	0	79.8	-3.2	6	0	131.8	-0.71	-2.4	-
4b	394.4	6	9	-0.2	1	16.9*	-3.2	6	1	169.7	-0.87	-3.0	-
Range ^[k]	130-725	0-6	02-20	-2-6.5'	-	<25 poor; >500 great	-6.5-0.5	1-8	-	7-200	-1.5-1.5	-3.0-1.2	-

[a] ADME data were calculated as described in the text using Qikprop 3.5; predicted properties outside the range for 95% of known drugs are indicated with an asterisk (*). [b] Rules as listed in the columns, with any violations of the rules highlighted in italics. [c] PSA represents the van der Waals (polar) surface areas of N and O atoms; recommended PSA <140 \AA^2 according to Veber *et al.* [60]. [d] $\log K_{\text{hsa}}$: predicted binding to human serum albumin. [e] $\log BB$: the predicted blood-brain barrier coefficient. [f] Toxicity structural warnings from FAF-Drugs2. [g] Number of hydrogen bond donors. [h] Number of hydrogen bond acceptors. [i] Caco-2 cell permeability. [j] Number of primary metabolites. [k] Range for 95% of known drugs - reference: QikProp version 3.5 User's Manual [37].

significant potential for application in future inhibitor design efforts. Using this method, the predicted energetic breakdown for the binding of *N*-acyl-*N'*-(β -D-glucopyranosyl) urea ligands to GPb revealed ligand entropy changes on binding as a key factor to potency. It is not surprising, therefore, that the most potent GPb catalytic site inhibitor discovered to date (2-naphthyl substituted glucopyranosylidene-spiro-oxathiazole) is a rigid glucose analogue [19,41], where the buried cavity of the GP catalytic site may accentuate ligand entropy losses on binding. The "hydrophobic effect" appears to also play a role, although less important, based on the LR-MM-CBSA calculations. With respect to the pharmacokinetics of **4a** and **4b**, only ligand permeability is highlighted as a potential issue from our ADMET predictions. However, glucose analogues have already demonstrated blood glucose lowering effects *in vivo* [5,9].

LIST OF ABBREVIATIONS

ADMET	= Administration distribution metabolism excretion and toxicity
AMP	= Adenosine monophosphate
Glc-1-P	= Glucose-1-phosphate
GP	= Glycogen phosphorylase
GP _a (R state)	= Phosphorylated form of GP
GP _b (T state)	= Unphosphorylated form of GP
HBA	= Hydrogen bond acceptor
HBD	= Hydrogen bond donor
LIE	= Linear interaction energy
LIECE	= Linear interaction energy in continuum electrostatics
LOO-cv	= Leave-one-out cross-validation

LR-MM-CBSA	= Linear response – molecular mechanics coulomb surface area
LR-MM-PBSA	= Linear response - molecular mechanics – Poisson-Boltzmann surface area
MD	= Molecular dynamics
PSA	= Polar surface area
QM/MM	= Quantum mechanics/molecular mechanics
RMSD	= Root-mean square deviation
RMSE	= Root mean square error
Δ SASA	= Change in solvent accessible surfaces area
SP	= Standard precision
T2D	= Type 2 diabetes
TNCG	= Truncated Newton Conjugate Gradient
VRT	= Vibrational rotational and translational entropy
XP	= Extra-precision

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This project was implemented under the "ARISTEIA" Action of the "Operational Programme Education and Lifelong Learning" and is co-funded by the European Social Fund (ESF) and National Resources. This work was supported in part by the Postgraduate Programmes "Biotechnology-Quality assessment in Nutrition and the Environ-

ment”, “Application of Molecular Biology-Molecular Genetics-Molecular Markers”, Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly. Work at the Synchrotron Radiation Sources, MAX-lab, Lund, Sweden and EMBL Hamburg Outstation, Germany, was supported from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under BioStruct-X (grant agreement N°283570). D.B. and J.M.H. acknowledge funding from the University of Central Lancashire under the URIS scheme. We are grateful to George Archontis and Colin Moffatt for useful discussions regarding this manuscript.

REFERENCES

- Oikonomakos, N. G., Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. *Curr. Protein. Pept. Sci.* **2002**, *3*(6), 561-86.
- Skamnaki, V. T.; Kantsadi, A. L.; Chatzileontiadiou, D. S. M.; Stravodimos, G.; Leonidas, D. D., Glycogen metabolism enzymes as molecular targets for drug development. In *Glycogen Structure, Functions in the body and role in disease*, Weiss, P. L.; Faulkner, B. D., Eds. Nova Science Publishers, Inc.: New York, 2013; pp 109-135.
- Treadway, J. L.; Mendys, P.; Hoover, D. J., Glycogen phosphorylase inhibitors for treatment of type 2 diabetes mellitus. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2001**, *10*(3), 439-54.
- Hayes, J. M.; Kantsadi, A. L.; Leonidas, D. D., Natural products and their derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase: potential treatment for type 2 diabetes. *Phytochemistry Reviews* **2014**, *13*(2), 471-498.
- Docsa, T.; Czifrak, K.; Huse, C.; Somsak, L.; Gergely, P., Effect of glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin on glycogen metabolism in liver tissues of streptozotocin-induced and obese diabetic rats. *Mol Med Report* **2011**, *4*(3), 477-81.
- 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. (Tokyo)* **2005**, *58*(8), 503-6.
- Hoover, D. J.; Lefkowitz-Snow, S.; Burgess-Henry, J. L.; Martin, W. H.; Armento, S. J.; Stock, I. A.; McPherson, R. K.; Genereux, P. E.; Gibbs, E. M.; Treadway, J. L., Indole-2-carboxamide inhibitors of human liver glycogen phosphorylase. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2934-2938.
- Martin, W. H.; Hoover, D. J.; Armento, S. J.; Stock, I. A.; McPherson, R. K.; Danley, D. E.; Stevenson, R. W.; Barrett, E. J.; Treadway, J. L., Discovery of a human liver glycogen phosphorylase inhibitor that lowers blood glucose *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 1776-1781.
- Nagy, L.; Docsa, T.; Szanto, M.; Brunyanszki, A.; Hegedus, C.; Marton, J.; Konya, B.; Virag, L.; Somsak, L.; Gergely, P.; Bai, P., Glycogen Phosphorylase Inhibitor N-(3,5-Dimethyl-Benzoyl)-N¹-(beta-D-Glucopyranosyl)Urea Improves Glucose Tolerance under Normoglycemic and Diabetic Conditions and Rearranges Hepatic Metabolism. *Plos One* **2013**, *8*(7).
- Monod, J.; Wyman, J.; Changeux, J. P., On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model. *J. Mol. Biol.* **1965**, *12*, 88-118.
- Barford, D.; Johnson, L. N., The allosteric transition of glycogen phosphorylase. *Nature* **1989**, *340*, 609-616.
- Barford, D.; Hu, S. H.; Johnson, L. N., Structural mechanism for glycogen phosphorylase control by phosphorylation and AMP. *J. Mol. Biol.* **1991**, *218*, 233-260.
- Kantsadi, A. L.; Hayes, J. M.; Manta, S.; Skamnaki, V. T.; Kiritsis, C.; Psarra, A. M.; Koutsogiannis, Z.; Dimopoulou, A.; Theofanous, S.; Nikoleousakos, N.; Zoumpoulakis, P.; Kontou, M.; Papadopoulos, G.; Zographos, S. E.; Komiotis, D.; Leonidas, D. D., The sigma-hole phenomenon of halogen atoms forms the structural basis of the strong inhibitory potency of C5 halogen substituted glucopyranosyl nucleosides towards glycogen phosphorylase b. *ChemMedChem* **2012**, *7*(4), 722-32.
- Oikonomakos, N. G.; Somsak, L., Advances in glycogen phosphorylase inhibitor design. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2008**, *9*(4), 379-395.
- Praly, J.-P.; Vidal, S., Inhibition of glycogen phosphorylase in the context of type 2 diabetes, with focus on recent inhibitors bound at the active site. *Mini Rev. Med. Chem.* **2010**, *10*(12), 1102-26.
- Somsak, L., Glucose derived inhibitors of glycogen phosphorylase. *Comptes Rendus Chimie* **2011**, *14*(2-3), 211-223.
- 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., New inhibitors of glycogen phosphorylase as potential antidiabetic agents. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*(28), 2933-83.
- 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. *Biochemistry (USA)* **1991**, *30*(42), 10101-10116.
- Nagy, V.; Benlifa, M.; Vidal, S.; Berzsenyi, E.; Teilhet, C.; Czifrak, K.; Batta, G.; Docsa, T.; Gergely, P.; Somsak, L.; Praly, J.-P., Glucose-based spiro-heterocycles as potent inhibitors of glycogen phosphorylase. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*(15), 5696-5707.
- Kun, S.; Bokor, E.; Varga, G.; Szocs, B.; Pahi, A.; Czifrak, K.; Toth, M.; Juhasz, L.; Docsa, T.; Gergely, P.; Somsak, L., New synthesis of 3-(beta-D-glucopyranosyl)-5-substituted-1,2,4-triazoles, nanomolar inhibitors of glycogen phosphorylase. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *76*, 567-79.
- Bokor, E.; Docsa, T.; Gergely, P.; Somsak, L., C-Glucopyranosyl-1,2,4-triazoles As New Potent Inhibitors of Glycogen Phosphorylase. *ACS Med Chem Lett* **2013**, *4*(7), 47-50.
- Irwin, J. J.; Sterling, T.; Mysinger, M. M.; Bolstad, E. S.; Coleman, R. G., ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. *J Chem Inf Model* **2012**.
- Parmenopoulou, V.; Kantsadi, A. L.; Tsirkone, V. G.; Chatzileontiadiou, D. S.; Manta, S.; Zographos, S. E.; Molfeta, C.; Archontis, G.; Agius, L.; Hayes, J. M.; Leonidas, D. D.; Komiotis, D., Structure based inhibitor design targeting glycogen phosphorylase b. Virtual screening, synthesis, biochemical and biological assessment of novel N-acyl-beta-d-glucopyranosylamines. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*(17), 4810-25.
- Tropper, F. D.; Andersson, F. O.; Braun, S.; Roy, R., Phase-Transfer Catalysis as a General and Stereoselective Entry into Glycosyl Azides from Glycosyl Halides. *Synthesis-Stuttgart* **1992**, (7), 618-620.
- Pinter, I.; Kovacs, J.; Toth, G., Synthesis of Sugar Ureas Via Phosphinimines. *Carbohydr. Res.* **1995**, *273*(1), 99-108.
- Somsak, L.; Felfoldi, N.; Konya, B.; Huse, C.; Telepo, K.; Bokor, E.; Czifrak, K., Assessment of synthetic methods for the preparation of N-beta-D-glucopyranosyl-N¹-substituted ureas, -thioureas and related compounds. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*(12), 2083-2093.
- Tsirkone, V. G.; Tsoukala, E.; Lamprakis, C.; Manta, S.; Hayes, J. M.; Skamnaki, V. T.; Drakou, C.; Zographos, S. E.; Komiotis, D.; Leonidas, D. D., 1-(3-Deoxy-3-fluoro-beta-d-glucopyranosyl) pyrimidine derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase b: Kinetic, crystallographic and modelling studies. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*(10), 3413-25.
- Leatherbarrow, R. J., GraFit version 4.06. *Erithacus Software Ltd. Staines, U.K.* **1998**.
- Alexacou, K. M.; Tenchiu Deleanu, A. C.; Chrysina, E. D.; Charavgi, M. D.; Kostas, I. D.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G.; Leonidas, D. D., The binding of beta-d-glucopyranosyl-thiosemicarbazone derivatives to glycogen phosphorylase: A new class of inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*(22), 7911-22.
- Leslie, A. G. W.; Powell, H. R., Processing Diffraction Data with Mosflm. In *Evolving Methods for Macromolecular Crystallography*, Read, R. J.; Sussman, J. L., Eds. Springer: 2007; Vol. 245, pp 41-51.
- CCP4, The CCP4 suite : programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr.* **1994**, *D 50*, 760-763.
- Schuttelkopf, A. W.; van Aalten, D. M. F., PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2004**, *60*, 1355-1363.
- Murshudov, G. N.; Skubak, P.; Lebedev, A. A.; Pannu, N. S.; Steiner, R. A.; Nicholls, R. A.; Winn, M. D.; Long, F.; Vagin, A. A., REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2011**, *67*(Pt 4), 355-67.

- [34] Chen, V. B.; Arendall, W. B., 3rd; Headd, J. J.; Keedy, D. A.; Immormino, R. M.; Kapral, G. J.; Murray, L. W.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C., MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*(Pt 1), 12-21.
- [35] DeLano, W. L. *The PyMol Molecular Visualization System*, Sa Carlos, CA, USA, 2002.
- [36] Hayes, J. M.; Leonidas, D. D., Computation as a tool for glycogen phosphorylase inhibitor design. *Mini Rev. Med. Chem.* **2010**, *10*(12), 1156-74.
- [37] Schrodinger, L. L. C. *Schrodinger Software Suite*, New York, 2015.
- [38] Kaminski, G. A.; Friesner, R. A.; Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W. L., Evaluation and reparametrization of the OPLS-AA force field for proteins via comparison with accurate quantum chemical calculations on peptides. *J Phys Chem B* **2001**, *105*(28), 6474-6487.
- [39] Nagy, V.; Felfoldi, N.; Konya, B.; Praly, J. P.; Docsa, T.; Gergely, P.; Chrysina, E. D.; Tiraidis, C.; Kosmopoulou, M. N.; Alexacou, K. M.; Konstantakaki, M.; Leonidas, D. D.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G.; Kozmon, S.; Tvaroska, I.; Somsak, L., N-(4-Substituted-benzoyl)-N'-(beta-D-glucopyranosyl)ureas as inhibitors of glycogen phosphorylase: Synthesis and evaluation by kinetic, crystallographic, and molecular modelling methods. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*(5), 1801-1816.
- [40] Oikonomakos, N. G.; Kosmopoulou, M.; Zographos, S. E.; Leonidas, D. D.; Chrysina, E. D.; Somsak, L.; Nagy, V.; Praly, J. P.; Docsa, T.; Toth, B.; Gergely, P., Binding of N-acetyl-N'-(beta-D-glucopyranosyl) urea and N-benzoyl-N'-(beta-D-glucopyranosyl) urea to glycogen phosphorylase b. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*(6), 1684-96.
- [41] Bentlifa, 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*(20), 7368-80.
- [42] Aqvist, J.; Marelus, J., The linear interaction energy method for predicting ligand binding free energies. *Comb Chem High T Scr* **2001**, *4*(8), 613-626.
- [43] Carlsson, J.; Boukharta, L.; Aqvist, J., Combining docking, molecular dynamics and the linear interaction energy method to predict binding modes and affinities for non-nucleoside inhibitors to HIV-1 reverse transcriptase. *J Med Chem* **2008**, *51*(9), 2648-56.
- [44] Nicolotti, O.; Convertino, M.; Leonetti, F.; Catto, M.; Cellamare, S.; Carotti, A., Estimation of the binding free energy by Linear Interaction Energy models. *Mini Rev. Med. Chem.* **2012**, *12*(6), 551-61.
- [45] Wichapong, K.; Lawson, M.; Pianwanit, S.; Kokpol, S.; Sippl, W., Postprocessing of Protein-Ligand Docking Poses Using Linear Response MM-PB/SA: Application to Wee1 Kinase Inhibitors. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50*(9), 1574-1588.
- [46] Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *46*(1-3), 3-26.
- [47] Jorgensen, W. L.; Duffy, E. M., Prediction of drug solubility from structure. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54*(3), 355-366.
- [48] Lagorce, D.; Maupetit, J.; Baell, J.; Sperandio, O.; Tuffery, P.; Miteva, M. A.; Galons, H.; Villoutreix, B. O., The FAF-Drugs2 server: a multistep engine to prepare electronic chemical compound collections. *Bioinformatics* **2011**, *27*(14), 2018-20.
- [49] Kantsadi, A. L.; Manta, S.; Psarra, A. M.; Dimopoulou, A.; Kiritis, C.; Parmenopoulou, V.; Skamnaki, V. T.; Zoumpoulakis, P.; Zographos, S. E.; Leonidas, D. D.; Komiotis, D., The binding of C5-alkynyl and alkylfurano[2,3-d]pyrimidine glucopyranonucleosides to glycogen phosphorylase b: synthesis, biochemical and biological assessment. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *54*, 740-9.
- [50] Reddy, M. R.; Reddy, C. R.; Rathore, R. S.; Erion, M. D.; Aparoy, P.; Reddy, R. N.; Reddanna, P., Free energy calculations to estimate ligand-binding affinities in structure-based drug design. *Curr. Pharm. Des.* **2014**, *20*(20), 3323-37.
- [51] Hayes, J. M.; Archontis, G., MM-GB(PB)SA Calculations of Protein-Ligand Binding Free Energies. In *Molecular Dynamics: Studies of Synthetic and Biological Macromolecules*, Wang, L., Ed. Published Intech Open: 2012.
- [52] Khandelwal, A.; Balaz, S., Improved estimation of ligand-macromolecule binding affinities by linear response approach using a combination of multi-mode MD simulation and QM/MM methods. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2007**, *21*(1-3), 131-137.
- [53] Thompson, D. C.; Humblet, C.; Joseph-McCarthy, D., Investigation of MM-PBSA rescoring of docking poses. *J Chem Inf Model* **2008**, *48*(5), 1081-91.
- [54] Lockett, M. R.; Lange, H.; Breiten, B.; Heroux, A.; Sherman, W.; Rappoport, D.; Yau, P. O.; Snyder, P. W.; Whitesides, G. M., The Binding of Benzoarylsulfonamide Ligands to Human Carbonic Anhydrase is Insensitive to Formal Fluorination of the Ligand. *Angew. Chem.* **2013**, *125*(30), 7868-7871.
- [55] Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1997**, *23*(1-3), 3-25.
- [56] Jorgensen, W. L.; Duffy, E. M., Prediction of drug solubility from Monte Carlo simulations. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*(11), 1155-8.
- [57] Alex, A.; Millan, D. S.; Perez, M.; Wakenhut, F.; Whitlock, G. A., Intramolecular hydrogen bonding to improve membrane permeability and absorption in beyond rule of five chemical space. *Medchemcomm* **2011**, *2*(7), 669-674.
- [58] Paolini, G. V.; Shapland, R. H. B.; van Hoorn, W. P.; Mason, J. S.; Hopkins, A. L., Global mapping of pharmacological space. *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*(7), 805-815.
- [59] Begum, J.; Varga, G.; Docsa, T.; Gergely, P.; Hayes, J. M.; Juhasz, L.; Somsak, L., Computationally motivated synthesis and enzyme kinetic evaluation of N-(small beta)-d-glucopyranosyl)-1,2,4-triazolecarboxamides as glycogen phosphorylase inhibitors. *Medchemcomm* **2015**, *6*(1), 80-89.
- [60] Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H. Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D., Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem* **2002**, *45*(12), 2615-23.
- [61] Gyorgydeak, Z.; Hadady, Z.; Felfoldi, N.; Krakomperger, A.; Nagy, V.; Toth, M.; Brunyanszki, A.; Docsa, T.; Gergely, P.; Somsak, L., Synthesis of N-(beta-D-glucopyranosyl)- and N-(2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranosyl) amides as inhibitors of glycogen phosphorylase. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*(18), 4861-70.

Received: ?????????????? Revised: ?????????????? Accepted: ??????????????



Triazole double-headed ribonucleosides as inhibitors of eosinophil derived neurotoxin



Demetra S.M. Chatzileontiadou^{a,1}, Vanessa Parmenopoulou^{a,1}, Stella Manta^a, Anastassia L. Kantsadi^a, Paroula Kylindri^a, Marianna Griniezaki^a, Filitsa Kontopoulou^a, Aikaterini Telopoulou^a, Helena Prokova^a, Dimitrios Panagopoulos^a, Ester Boix^b, Nikolaos A.A. Balatsos^a, Dimitri Komiotis^{a,*}, Demetres D. Leonidas^{a,*}

^a Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, 26 Ploutonos Str., 41221 Larissa, Greece

^b Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biosciences, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 September 2015

Revised 26 October 2015

Accepted 30 October 2015

Available online 31 October 2015

Keywords:

Eosinophil derived neurotoxin

Ribonuclease A

Inhibition

X-ray crystallography

Triazole derivatives

Double-headed nucleosides

Structure-assisted inhibitor design

ABSTRACT

Eosinophil derived neurotoxin (EDN) is an eosinophil secretion protein and a member of the Ribonuclease A (RNase A) superfamily involved in the immune response system and inflammatory disorders. The pathological actions of EDN are strongly dependent on the enzymatic activity and therefore, it is of significant interest to discover potent and specific inhibitors of EDN. In this framework we have assessed the inhibitory potency of triazole double-headed ribonucleosides. We present here an efficient method for the heterologous production and purification of EDN together with the synthesis of nucleosides and their biochemical evaluation in RNase A and EDN. Two groups of double-headed nucleosides were synthesized by the attachment of a purine or a pyrimidine base, through a triazole group at the 3'-C position of a pyrimidine or a purine ribonucleoside, respectively. Based on previous data with mononucleosides these compounds were expected to improve the inhibitory potency for RNase A and specificity for EDN. Kinetics data revealed that despite the rational, all but one, double-headed ribonucleosides were less potent than the respective mononucleosides while they were also more specific for ribonuclease A than for EDN. Compound **11c** (9-[3'-[4-[(cytosine-1-yl)methyl]-1,2,3-triazol-1-yl]-β-D-ribofuranosyl]adenine) displayed a stronger preference for EDN than for ribonuclease A and a K_i value of 58 μM. This is the first time that an inhibitor is reported to have a better potency for EDN than for RNase A. The crystal structure of EDN–**11c** complex reveals the structural basis of its potency and selectivity providing important guidelines for future structure-based inhibitor design efforts.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Eosinophil derived neurotoxin (EDN) [1] is an eosinophil secretion protein stored in the matrix of the secondary granules. EDN is a member of the RNase A superfamily (also known as RNase 2) involved in the immune response system and inflammatory disorders [2,3]. EDN is one of the most abundant RNases in humans and apart from eosinophils it has been found in a variety of tissues and excretions like placenta, liver and urine. EDN was initially

Abbreviations: RNase A, bovine pancreatic ribonuclease A; PEG, poly(ethylene glycol); TLR2, toll-like receptor 2; EDN, eosinophil derived neurotoxin.

* Corresponding authors.

E-mail addresses: dkom@bio.uth.gr (D. Komiotis), ddleonidas@bio.uth.gr (D.D. Leonidas).

¹ Authors contributed equally to this work.

identified by its ability to selectively kill cerebellar Purkinje cells when injected into rabbits, a syndrome called the Gordon phenomenon [4,5] and hence it was classified as a neurotoxin. EDN displays limited cytotoxicity against helminths and respiratory epithelial cells [6,7]. EDN is a chemoattractant for human dendritic cells since it activates them inducing maturation [8] and acts as an alarmin to activate the TLR2-MyD88 signal pathway enhancing their Th2 immune responses [9]. EDN, being an RNase, displays strong activity against single stranded RNA viruses like respiratory syncytial virus (RSV) and HIV in cell culture, playing thus, a role in antiviral host defence [3,10]. The *in vivo* damage of the host tissues by EDN could be involved in the secondary effects associated with inflammatory disorders and hypereosinophilic syndromes.

EDN shares only 36% amino acid sequence identity with RNase A and its ribonucleolytic activity is ~3–30-fold lower than that of

RNase A [11]. Ablation of the catalytic activity of recombinant EDN through site directed mutagenesis indicated that its cytotoxic, neurotoxic and antiviral activities are all dependent on its ribonuclease activity [10–12]. The relationship between the enzymatic activity of EDN and its physiological functions has yet to be established [3]. However, it seems that there are evolutionary constraints that force EDN to display all the structural characteristics (EDN and RNase A are structurally conserved [13]) necessary for ribonucleolytic activity and hence it is has been suggested that possibly EDN has a specific endogenous substrate [3]. Nevertheless, the linkage of EDN's biological activity to ribonucleolytic activity makes it an attractive target for the rational design of specific inhibitors to suppress its activity and hence modulate its pathological actions.

The active site of all RNases is highly conserved in terms of sequence and structural architecture. The three central sites are P₁, where P-O5' bond cleavage occurs; B₁, which interacts with the base whose ribose contributes its 3'-oxygen to the scissile phosphodiester bond; and B₂, which binds the base whose ribose provides the 5'-oxygen [14]. However, specific differences in their peripheral RNA binding sites give rise to variations in their specificity towards different substrates and may provide clues for the rational design of specific ligands for each RNase. A plausible strategy for the development of EDN inhibitors is to test RNase A inhibitors and explore chemical modifications on their structure that will give rise to their specificity for EDN. In the past, we initiated inhibitor design studies using RNase A as a template. Thus, we studied a variety of substrate analogs, including mono and diphosphate (di)nucleotides with adenine at the 5'-position, and cytosine or uridine at the 3'-position of the scissile bond [15–19], aminonucleosides [20], and morpholino, piperidino, or pyrrolidinouridine and thymidine analogs [21]. Recently, we have investigated the binding of a series of ribofuranosyl pyrimidine nucleosides and their corresponding 1,2,3-triazole derivatives to RNase A. The most potent of them was 1-[(β-D-ribofuranosyl)-1,2,3-triazol-4-yl]uracil displaying a K_i value of 1.6 μM. [22]. To improve the potency of these inhibitors we took into consideration (i) studies showing that nucleoside-dibasic acids, nucleoside-amino acid conjugates [23,24] and dinucleosides [16,25] are more potent inhibitors than mononucleosides for RNase A (K_i values in the areas of mid-μM range) [25] as well as the importance of double-headed nucleosides [26–28] and, (ii) our previous work [22] where the insertion of a triazole group between the pyrimidine base and the ribose of a ribonucleoside led to the production of potent inhibitors with K_i values in the areas of low-μM range. We now present the synthesis of a novel series of double-headed ribonucleosides with an additional purine or pyrimidine base connected at the 3'-C-position of the sugar ring via a 1,2,3-triazole linker. The inhibitory potency of these compounds was evaluated against RNase A and EDN. Furthermore, we report the crystal structure of EDN in complex with the most potent compound of this series. Comparison of the inhibitory potencies for the two enzymes provides also data to validate the approach of using inhibitors designed for RNase A, to inhibit other superfamily members like EDN.

2. Results and discussion

2.1. Chemistry

The main goals of the current study were: (1) the attachment of an additional adenine at the 3'-C-position of uracil, thymine and fluorouracil ribonucleosides via a 1,2,3-triazole linker and (2) the introduction of an additional uracil or thymine at the 3'-C-position of adenine and N⁶-benzoyladenine ribonucleosides through a 1,2,3-triazole linker. The synthesis of the desired

1,2,3-triazole double-headed nucleoside analogs **5a–c**, **11a–c** and **12a,b** is outlined in Scheme 1.

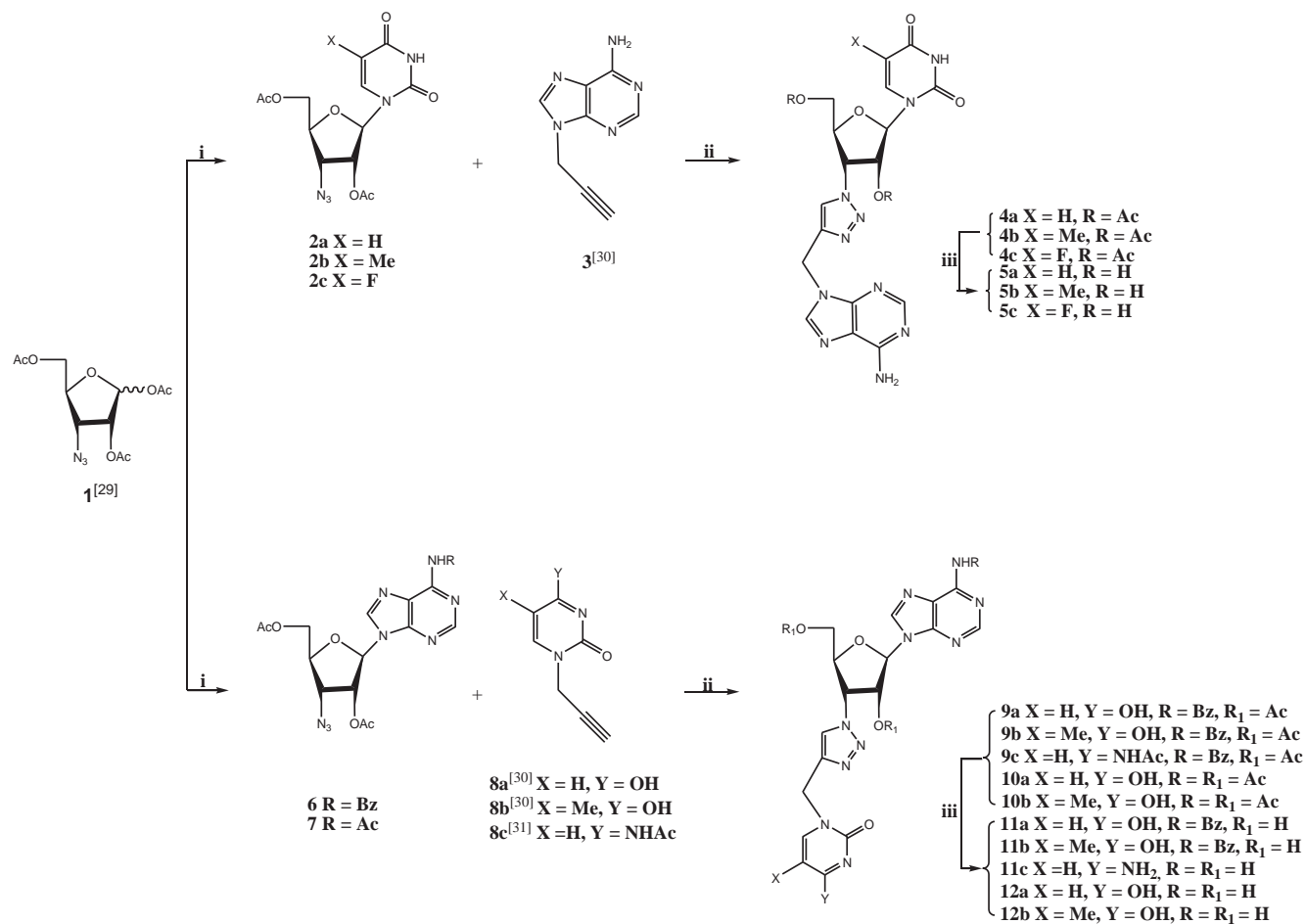
As our first example of this class of double-headed nucleosides, analogs **5** with the additional adenine connected at the 3'-C-position of deoxyribonucleosides via a 1,2,3-triazole linker were synthesized. Condensation of the known azido ribofuranose **1** [29] with silyl-protected uracil, thymine and 5-fluorouracil in the presence of trimethylsilyltrifluoromethane-sulfonate (Me₃SiOSO₂CF₃) as the catalyst in acetonitrile (CH₃CN) gave exclusively, due to the participation of the 2'-acetoxy group, the corresponding 3'-azido-3'-deoxy-β-D-ribofuranosides **2a–c**, in good yields (60–71%). Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC) between key intermediates **2a–c** and propargyl adenine (**3**) [30], performed with catalytic amounts of copper(II) sulfate pentahydrate (CuSO₄·5H₂O) and sodium ascorbate in refluxing tetrahydrofuran/water (THF/H₂O, 1:1), afforded the protected 3'-C substituted double-headed ribofuranonucleosides **4a–c**. Finally, removal of all O-acetyl groups of **4a–c** with saturated methanolic ammonia furnished the target derivatives **5a–c**, in good yields (61–78%).

Alternatively, the synthetic efforts were focused on the preparation of compounds **11** and **12** containing an adenine at 1'-C-position of the deoxyribose unit and a pyrimidine base at 3'-C-position connected through a 1,2,3-triazole linker. By the same manner, reaction of the azido sugar **1** [29] with silylated N⁶-benzoyladenine via the Vorbrüggen coupling method gave ribonucleoside **6**, which was then “clicked” with propargyl uracil (**8a**), [30], thymine (**8b**) [30] and N⁴-acetylcytosine (**8c**) [31] until formation of the protected bisheaded analogs **9a–c**. Treatment of **9a–c** with ammonia/MeOH (saturated at 0 °C), afforded only the fully deprotected derivative **11c** as well as the benzoylated **11a,b**, while attempts to further remove the benzoyl group either with sodium methoxide [32] or guanidine [33] resulted in a mixture of intractable and inseparable materials. In order to access all fully deprotected nucleosides **12a,b**, N⁶-benzoyladenine was originally replaced by the non-commercially available N⁶-acetyladenine [34]. Thus, conjugation of silyl-protected N⁶-acetyladenine with anomeric sugar **1** [29] led to ribonucleoside **7**, which upon “click” chemistry reaction with propargyl uracil (**8a**) [30] and thymine (**8b**) [30] was readily converted to the corresponding bisheaded nucleosides **10a,b**. Finally, deacetylation with ammonia solution in methanol, yielded the desired free nucleosides **12a,b**.

The newly synthesized triazole cycloadducts were well characterized by NMR, UV spectroscopies, mass spectrometry and elemental analysis. According to ¹H NMR spectra of the “click” products (**4**, **5**, **9**, **10**, **11** and **12**) the newly formed triazole proton was observed at 8.08–8.25 ppm. It should also be mentioned that in all cases, the transformation into the triazole cycloadducts was quantitative and occurred with full regioselectivity, resulting in the formation of the corresponding 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles (**4**, **9** and **10**) as the sole products, since their triazole proton appeared at low field [35].

2.2. EDN production and purification

The recombinant EDN was expressed in *Escherichia coli* and purified by a method similar to the one reported for ECP [36]. A synthetic gene for human EDN was cloned into the pET11c expression vector and the protein was purified from inclusion bodies. This method has been reported previously in crystallography studies [13,37,38]. However, a detailed protocol including purification yield has not been described yet. We report here a step-by-step method for the efficient expression and production of EDN. This procedure produces 2.5 mg per liter of bacterial culture of pure EDN as judged from SDS-PAGE.



Scheme 1. (i) Nucleobase, HMDS, Me₃SiOSO₂CF₃, saccharine, CH₃CN; (ii) propargyl base, THF, H₂O, CuSO₄·5H₂O, sodium ascorbate; (iii) methanolic ammonia.

2.3. Enzyme activity

All compounds were found to be competitive inhibitors with respect to tRNA for RNase A as revealed by the Lineweaver-Burk plots that intersect at the same point on the y-axis. For EDN, only IC₅₀ values were determined due to low availability of the compounds together with the low inhibitory potency (and thus large K_i values) displayed by the inhibitors (i.e. large amounts of compounds had to be used for the determination of the K_i values). The K_i values derived from the Dixon plots (1/v₀ vs [I]) for RNase A (Fig. 1) are displayed in Table 1 together with K_i values calculated from their IC₅₀ values for EDN, for comparison reasons.

Two groups of double-headed nucleosides were synthesized by the attachment of a purine or a pyrimidine base through a triazole group, at the 3'-C position to a pyrimidine or a purine ribonucleoside, respectively. They were expected to display stronger inhibitory potency for RNase A than the respective mononucleosides. Despite the rational design predictions for the triazole linked double-headed nucleosides, none has surpassed **I** in potency (Table 1) which is still the most potent inhibitor of RNase A, from this series of triazole bearing compounds. Kinetic analysis of the inhibitory potencies of compounds **5a-c**, **11a-c** and **12a,b** against RNase A revealed that their K_i values were higher than that of the most potent compound of this study (**I**; K_i = 1.6 μM). Their K_i values, range between 55.5 and 265.0 μM, while 80 μM of **5b** produced 30% inhibition of the enzymatic activity (Table 1). The inhibition constants for RNase A of the bisheaded nucleosides having an additional adenine connected through a triazole linker to a

pyrimidine ribonucleoside (compounds **5a-c**) are weak inhibitors of RNase A with K_i values in the range of low mM. These compounds were not tested further with EDN. Compounds bearing adenine or N⁶-benzoyladenine at 1'-C-position of a ribofuranosyl ring as well as an additional uracil, thymine or cytosine connected at the 3'-C-position through a triazole linker are potent inhibitors of RNase A with K_i values in the range of mid μM. Comparison of their K_i values reveals that double-headed nucleosides that have a pyrimidine linked to the triazole ring (**11a-c**, **12a,b**) appear to be more potent than those that have a purine (**5a-c**). This is in agreement with our previous studies [22] where pyrimidine triazole nucleosides were potent inhibitors with K_i values in the range of μM (Table 1). However, this observation is somehow in contrast to previous studies with phosphonucleotides where the ones with purines were more potent than those with pyrimidines [15,17–19,21]. Thus, it appears that the presence of the triazole ring in the place of a phosphoryl group affects significantly the selectivity of RNase A for these inhibitors. This difference also reveals the dominant role of the phosphoryl groups towards the specificity of RNase A for nucleoside inhibitors. With respect to the modifications of the 5-position of the pyrimidine base of the dinucleosides it seems that any substitution at the 5-pyrimidine proton with fluorine or a methyl group partially released the inhibitory effect of the novel dinucleosides like in mononucleosides [22]. In conclusion, it appears that RNase A has a preference for adenine at the 1'-position of the ribose and a triazolo-linked pyrimidine at the 3'-position. Nevertheless, none of the double-headed nucleosides tested is a better inhibitor than the mononucleoside **I** (Table 1).

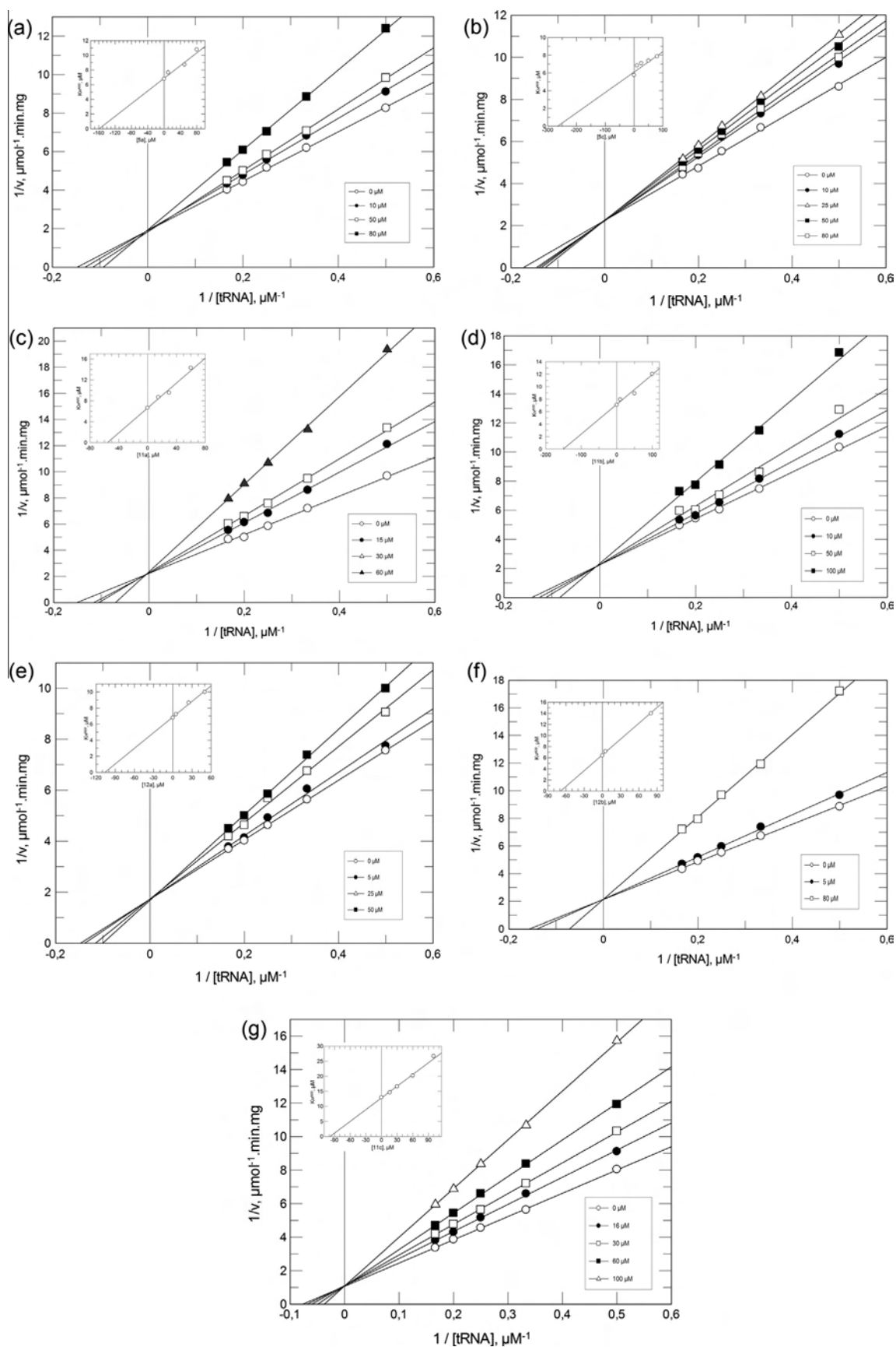


Fig. 1. Triazole linked double-headed nucleosides are competitive inhibitors of RNase A. Double reciprocal plots of enzyme assays are shown for inhibitors **5a** (A), **5c** (B), **11a** (C), **11b** (D), **12a** (E), **12b** (F), and **11c** (G). The nucleoside concentrations are shown in each diagram. RNase A concentration is 10 nM and substrate tRNA concentrations vary from 2 to 6 μM . K_{app} versus $[I]$ plots for the calculation of K_i values are shown at the inset.

Table 1
Kinetic parameters and structures of the inhibitors.

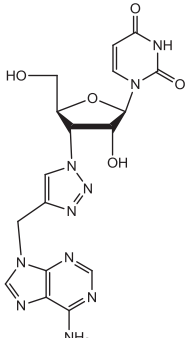
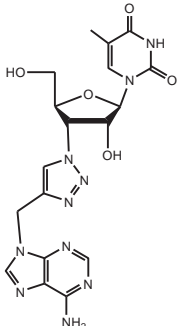
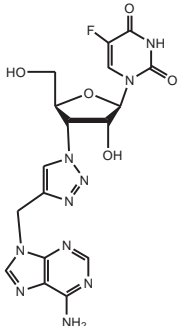
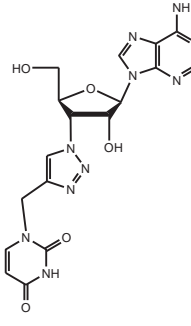
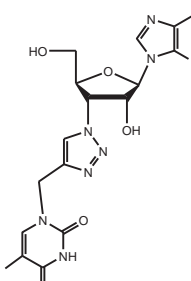
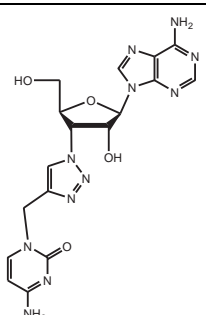
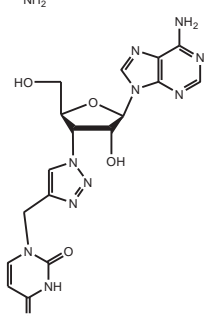
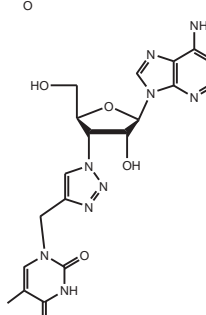
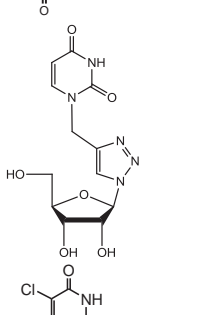
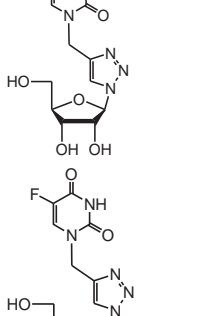
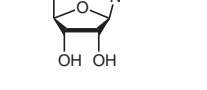
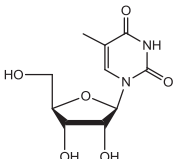
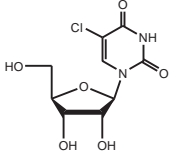
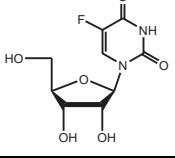
Name	Structure	K_i (μM)		
		IC_{50} (μM) EDN	EDN	RNase A
5a		–	–	159.1 \pm 26.9
5b		–	–	Less than 30% inhibition at 80 μM
5c		–	–	265.0 \pm 49.7
11a		409.3 \pm 11.4	267.3 \pm 33.4	55.5 \pm 7.4
11b		379.1 \pm 2.5	247.5 \pm 30.1	150.4 \pm 22.7

Table 1 (continued)

Name	Structure	K_i (μM)		
		IC_{50} (μM) EDN	EDN	RNase A
11c		88.6 ± 0.6	57.8 ± 7.1	98.5 ± 5.3
12a		651.9 ± 3.4	425.7 ± 51.8	106.1 ± 6.9
12b		559.1 ± 13.4	365.1 ± 45.3	68.8 ± 6.8
I		178.5 ± 4.9	116.4 ± 14.6	1.6 ± 0.2 [22]
II		534.7 ± 16.4	454.3 ± 62.8	94.8 ± 8.7 [22]
III		63.7 ± 5.9	44.2 ± 6.9	30.8 ± 4.4 [22]

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Name	Structure	IC_{50} (μ M)	K_i (μ M)	
		EDN	EDN	RNase A
IV		33.1 \pm 0.5	26.1 \pm 3.4	44.1 \pm 6.4 [22]
V		1462.8 \pm 109.8	1080.1 \pm 160.0	44.5 \pm 4.6 [22]
VI		282.1 \pm 4.7	208.3 \pm 26.8	33.6 \pm 2.6 [22]

Interestingly, the potency pattern of triazole nucleosides for RNase A does also apply for EDN. Thus, the distance between the sugar and the heterocyclic base seems to be as significant as it was in the case of RNase A since the insertion of a triazole group ameliorated the inhibitory effect (**II** vs **V** and **III** vs **VI**). This result is in agreement to the effect of the triazole insertion on the potency of these inhibitors for RNase A where it clearly ameliorated their potency [22].

A comparison of the inhibitory potency on RNase A and EDN activity reveals some more interesting differences with respect to the specificity of the two enzymes. Thus, **I** displays a K_i value \sim 70 fold higher for EDN than for RNase A (Table 1). This difference is smaller for the 5-halogen pyrimidine nucleosides **II** (\sim 5 fold), and for **III**, and **IV** which is almost similar. Dinucleosides bearing a triazole linker all display similar inhibitory potency for EDN with K_i values significant higher than for RNase A and in the range of low mM (Table 1). Furthermore, it seems that there is a small preference for N^6 -benzoyladenine over adenine.

Apart from the triazole linker we also examined the effect on the potency for EDN of substitutions at the 5-position of the base moiety. This position is important for activity modulation and the substitution with halogens has been widely used in modern medicinal chemistry [39]. We therefore examined Cl, F or Me substitutions of the proton at 5-position (Table 1). Inhibition constants for the mononucleosides lacking the triazole ring (compounds **IV**, **V**, and **VI**) reveal that although all three compounds could efficiently inhibit RNase A displaying similar K_i values, in the range of mid- μ M (Table 1) [22] they do not display a similar potency for EDN. Thus, the 5-substituent of the pyrimidine base has a profound effect on the potency of these inhibitors for EDN and it seems, that it follows the pattern, Me < F < Cl. Thus, the K_i values of **IV** (methyl group as substituent) for EDN and RNase A are similar whereas **VI** (fluorine as substituent) and **V** (chlorine as substituent) have 6-fold and 24-fold higher K_i values for EDN than for RNase A, respectively. Therefore, it is evident that the halogen substitution resulted to a much more significant release of the inhibition for EDN than for RNase A, and the bulkier the halogen the greater the K_i value and the less efficient the inhibition of EDN. This trend is independent of the existence of the triazole ring since the calculated K_i values for compounds **I**, and **II**, are following the same potency pattern (Table 1). For either the triazole or

non-triazole 5-methyl-substituted nucleoside, the K_i values were lower than the 5-chloro or 5-fluorosubstituted ones.

All the inhibitors presented here display a stronger potency for RNase A than for EDN. The only exception is compound **11c**, which displays a K_i value \sim 2 fold smaller for EDN than for RNase A (Table 1). Inhibitor **11c**, has a cytosine linked through a triazole with a ribosyladenine. This is the first instance where an inhibitor displays a stronger potency for EDN than for RNase A. The reported inhibition constants of adenylic mononucleotides, 3',5'-ADP, 2',5'-ADP and, 5'-ADP for EDN were 32, 64 and 92 μ M, respectively [13] while for RNase A range from 1 to 8 μ M [40,41] indicating that these nucleotides have a much better affinity with RNase A. A 10-fold difference in the K_i values has also been observed while studying the affinity of dinucleotides for both RNase A and EDN [42], in agreement with kinetic data that showed a lower catalytic efficiency for the RNA transphosphorylation reaction for EDN [11].

2.4. Structural studies

The active site of EDN has been structurally mapped by X-ray crystallography studies of EDN in complex with adenylic nucleotide ligands [13,37]. The three catalytic residues of RNase A, His-12, Lys-41, and His-119 of the P_1 subsite are present in EDN as His-15, Lys-38 and His-129. The key B_1 residues, Thr-45 and Phe-120 in RNase A, are also maintained in EDN as Thr-42 and Leu-130, but the other components of this subsite are variable. The B_2 subsite is also partially conserved between EDN and RNase A. Subsites P_0 and P_2 are not conserved in EDN. Despite these differences, both EDN and RNase A bind only pyrimidines at B_1 and prefer purines at B_2 [11].

To elucidate the structural basis of the inhibitory potency of **11c** we determined the crystal structure of the EDN–**11c** complex at 1.34 Å resolution. The inhibitor binds at the enzyme's active site and all of its atoms are well defined within the electron density map. The binding of **11c** does not trigger any significant conformational changes to the protein and the r.m.s. difference between the complex and the native structure [38] is 0.79 Å for all atoms (0.22 Å for the $C\alpha$ atoms). The binding mode of the purine part of **11c** is very similar to that of 3',5' ADP to EDN [13]. Thus, the adenine base of **11c** is bound at subsite B_2 participating in hydrogen bond interactions with side chain atoms of Asn70 and water

mediated interactions with side chain atoms of Ser64, and Asn65 (Table 2). The five-membered ring of adenine is almost parallel to the imidazole ring of His-129 and is involved in ring-stacking interactions (Fig. 2a). The ribose of the purine part of **11c** form hydrogen bonds with ND1 of His129 and water mediated interactions with Trp10, Gln14, His15, and Leu130 (Table 2). The triazole ring is located close at the Trp7 side chain (the place where the 3'-phosphate group of 3',5' ADP binds [13]) participating in van der Waals interactions with this residue (Table S1). Uracil does not bind at B₁ but it was found bound close to the N-terminus (Fig. 2a) engaging in hydrogen bond interactions with the main chain atoms of Lys1 and Met-0 (the additional formylmethionine residue from the recombinant protein). In addition, it is involved in 19 van der Waals interactions with Lys1 and Trp7. Overall, EDN and **11c** form 11 polar/polar, 42 non-polar/polar and 15 non-polar/non-polar van der Waals interactions (Table S1). This binding mode of uracil is in contrast to our design goal: to exploit interactions with residues in subsite B₁ and hence increase potency. It is not clear why uracil does not bind at B₁. However, it seems that its binding is dictated by a combination of the stereochemical constraints of **11c** and the selectivity of the EDN active site. EDN has a 20-fold preference for cytidine over uridine for polynucleotides, a 2-fold preference for cytidine at B₁ but a 100-fold preference for adenosine at B₂ for dinucleotide substrates [11]. Thus, it preferentially binds the adenosine part of **11c** over its uracil part at B₁. This binding mode imposes a conformation to the ribose that drives the 3' linked triazole (and subsequently uracil) away from the active site towards the N-terminus. This is an important aspect for future rational design efforts of new more potent and selective inhibitors for EDN.

Despite the unexpected binding mode, **11c** is more potent for EDN than for RNase A (Table 1). In terms of structure the EDN strong specificity for **11c** might be explained by the structural differences of the N-terminus between RNase A and EDN. In the EDN, the triazole and uracil moieties of **11c** form 19 van der Waals interactions with Lys1 and Trp7. These interactions could not be present in the RNase A – inhibitor complex since the N-terminus adopts a different conformation from that of EDN (Fig. 2b). In addition, the equivalent residue of EDN's Trp7 in RNase A is Ala4, a residue with a significantly smaller side chain than Trp, and thus cannot engage in similar interactions with the ligand.

The relevance of the RNase A-triazole inhibitor complexes determined previously [22] for the development of inhibitors of EDN, was examined by superimposing the EDN crystal structure [38] with each RNase A complex and then performing 10 cycles of energy minimization on the resultant EDN-inhibitor models with REFMAC [43]. Compound **III** is the most effective inhibitor from the triazole nucleotides tested and binds with similar affinity to EDN and RNase A (Table 1). Examination of the energy minimized models indicates that **III** can be accommodated in the EDN active site in the same orientation as for RNase A and there are no significant conflicts (Fig. 3a). The pyrimidine is placed in subsite B₁ but forms only a single hydrogen bond with the primary functional component of this subsite Thr42, whereas in RNase A the structurally equivalent Thr45 forms an additional hydrogen bond with pyrimidine: its main-chain NH donates a hydrogen to O2 of the uracil. The side chain of Leu130 and His15 lie in van der Waals contact distance from the uracil ring stabilizing its binding. In RNase A, this uracil forms additional van der Waals interactions with Val43. However, the structurally equivalent residue in EDN, Gln40 adopts a different conformation which does not allow it to engage in similar interactions with **III**. The triazole moiety is involved in an extensive hydrogen bond interactions network with protein residues Gln14, His15, and Lys38 at subsite P₁, while the ribose is located at the far end of subsite P₁ in hydrogen-bonding distance from His129, Gln14 and Trp10 (subsite P₂). These

Table 2
Potential hydrogen bond interactions of **11c** with EDN residues in the crystal.

Inhibitor atom	Protein atom/water	Distance (Å)
N3T	Lys1 N	3.1
N4T	Lys1 O	3.0
	Wat5	3.2
	Wat113	2.9
O4'	Wat146	3.1
O5'	His129 ND1	2.8
	Wat17	3.3
	Wat96	2.7
N1	Asn70 ND2	3.0
N3	Wat146	3.0
N6	Asn70 OD1	3.0
	Wat39	3.1
N7	Wat39	2.9
N12	Wat163	2.8
Total	14	

Water mediated interactions: Wat5 is hydrogen-bonded to Lys1 O. Wat113 is hydrogen-bonded to Lys1 NZ. Wat146 is hydrogen-bonded to Wat118. Wat17 is hydrogen-bonded to His15 NE2, Leu130 N, Wat98, which in turn forms hydrogen bond interactions with Wat46 and Leu130 O, and Wat23, which in turn forms hydrogen bond interactions with Wat9 and Gln14 NE2. Wat96 is hydrogen-bonded to Gln14 NE2 and Wat83 which in turn forms hydrogen bond interactions with Wat129 and Trp10 NE1. Wat39 is hydrogen-bonded to Ser64 OG. Wat163 is hydrogen-bonded to Wat160.

interactions of **III** are also formed in the RNase A-**III** complex [22] with the exception of the interactions with Gln14. The structurally equivalent residue in RNase A, Gln11, has a different conformation from that of Gln14 in EDN lying in a distance which does not support the formation of hydrogen bond interactions.

Inhibitor **I** forms the same interactions with EDN as **III** with the exception of the interactions of the 5-fluorine of the uracil (Fig. 3b). The fluorine atom of **III** engages in halogen bond interactions with the main chain carbonyl oxygen of Asp131. In the RNase A-**III** complex there is one additional interaction of the fluorine with the side chain of Lys66 (there is no structurally equivalent residue in EDN). Overall the structural basis of the significant difference in the potency of **I** for RNase A and EDN (70 fold) seems to lie in the additional hydrogen bond interaction of uracil with Thr45. In EDN there are also interactions with Gln14 which do not form in the RNase A ligand complex but it seems that these are counterfeited by the van der Waals interactions of uracil with RNase A residue Val43 which do not exist in the EDN complex. The affinity of **III** for EDN is higher than that of **I**. However, this inhibitor is almost equipotent for EDN and RNase A. The halogen interactions of **III** may offer a plausible structural explanation since both **III** and **I** are docked similarly in EDN. In RNase A, **III** and **I** do not bind in the same way [22] and **I** participate in additional 11 van der Waals interactions which seem to be enough to counterbalance the halogen bond interactions of **III** and therefore the latter is less potent than **I**.

3. Conclusion

The present study elucidates the synthesis and inhibitory potency of two groups of triazole double-headed nucleosides, bearing an additional purine or a pyrimidine base at the 3'-C position of a pyrimidine or a purine ribonucleoside, against RNase A and EDN, respectively. Based on previous data with mononucleosides, the double-headed nucleosides were expected to improve the inhibitory potency for RNase A and specificity for EDN, however, kinetics data revealed that they were less potent than the respective mononucleosides and also more specific for RNase A than for EDN. The only exception was compound **11c** that displayed a stronger preference for EDN than for RNase A (K_i value of 58 μ M), and can be viewed as lead compound for further

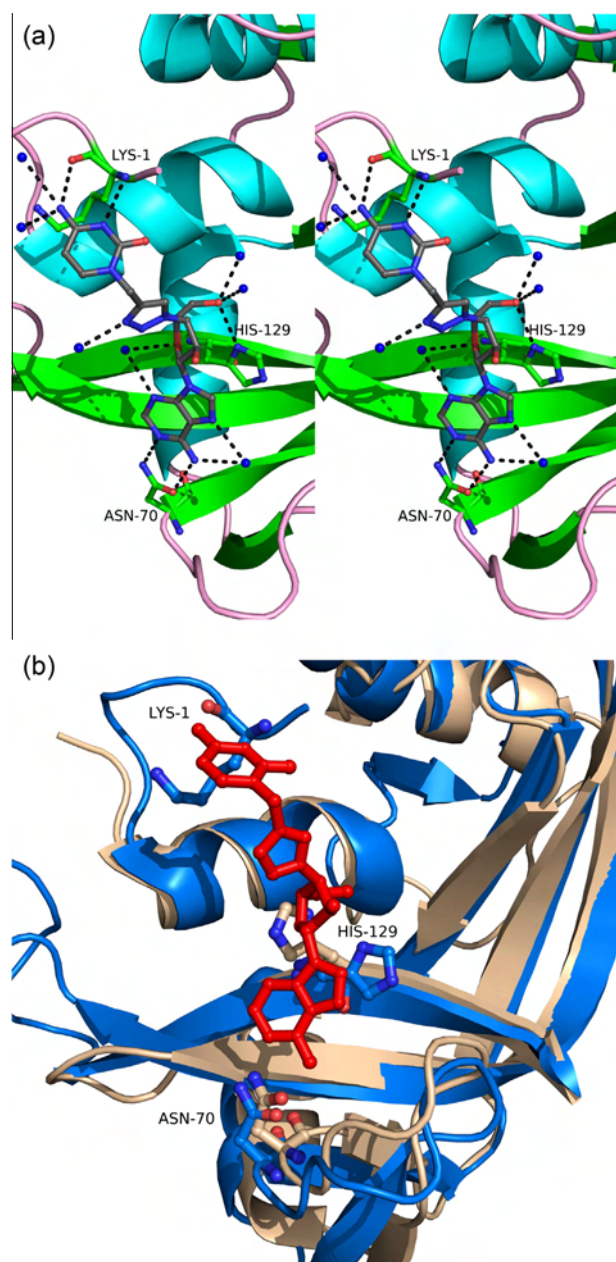


Fig. 2. (a) Stereo views of the interactions of **11c** with EDN. EDN residues are drawn as ball-and-stick models and water molecules as blue spheres. Hydrogen bonds are indicated by dashed lines. (b) Stereo views of the superimposed structures of EDN-**11c** complex and RNase A.

modifications in order to provide guidelines for future structure-based inhibitor design efforts.

4. Experimental section

4.1. General methods

Thin layer chromatography (TLC) was performed on Merck pre-coated 60F254 plates. Reactions were monitored by TLC on silica gel, with detection by UV light (254 nm) or by charring with sulfuric acid. Flash column chromatography was performed using silica gel (240–400 mesh, Merck). ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra were obtained at room temperature with a Bruker 300 spectrometer at 300 MHz and 75.5 MHz, respectively using chloroform- d (CDCl_3)

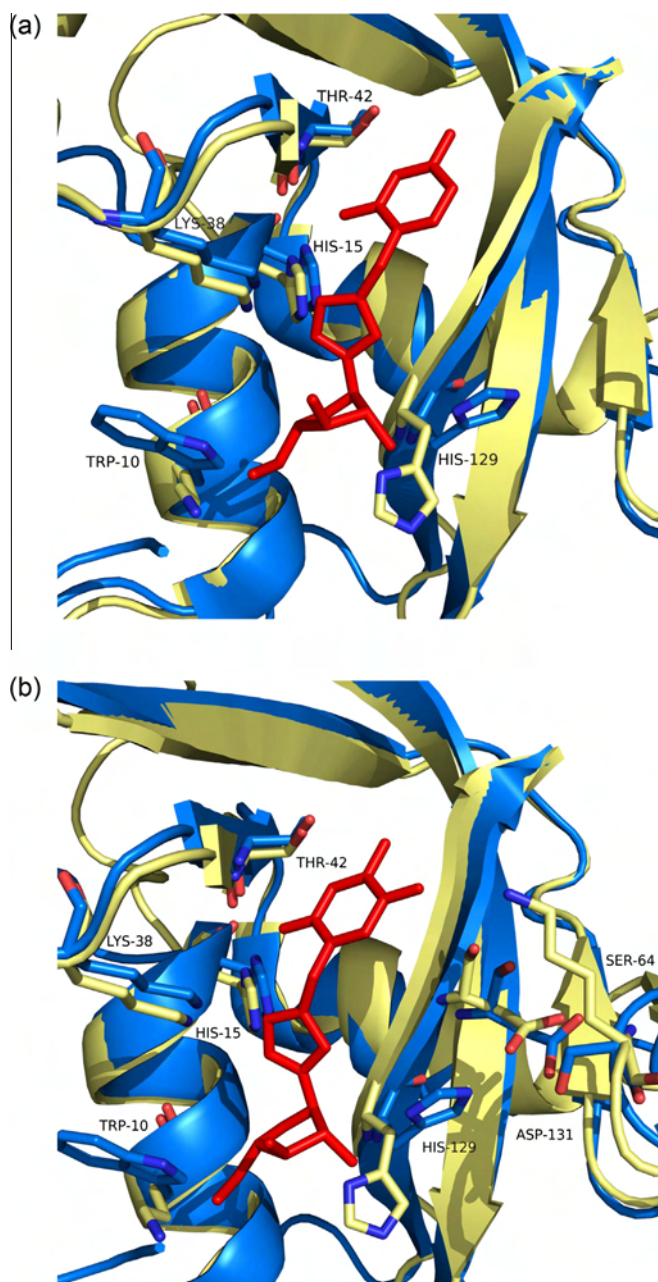


Fig. 3. The interactions between EDN and molecule **III** (a), **I** (b) from modeling. The side chain atoms of protein residues involved in interactions with each ligand are shown as ball-and-stick models. In (a) and (b) the RNase A molecule and residues superimposed onto the EDN structure are also shown in white.

and dimethylsulfoxide- d_6 ($\text{DMSO}-d_6$) with internal tetramethylsilane (TMS). Chemical shifts (δ) were given in ppm measured downfield from TMS, and spin–spin coupling constants are in Hz. UV–Vis spectra were recorded on a PG T70 UV–VIS spectrometer and mass spectra were obtained on a Thermo Quest Finnigan AQA Mass Spectrometer (electrospray ionization). Optical rotations were measured using an Autopol I polarimeter.

With the exception of CuAAC, all reactions sensitive to oxygen or moisture were carried out under nitrogen atmosphere using oven-dried glassware and dry solvents. CH_3CN was distilled from calcium hydride and stored over 3E molecular sieves and THF was freshly distilled under nitrogen from sodium/benzophenone before use. 1,2,5-Tri-*O*-acetyl-3-azido-3-deoxy- β -D-ribofuranose (**1**), [29] the propargyl purine and pyrimidine bases **3** [30], **8a–c**

[30,31] as well as N^6 -acetyladenine [34] were prepared according to the procedures described in literature and their chemical and physical properties were in agreement with previous data.

4.1.1. General procedure for preparation of ribonucleosides **2a–c**, **6** and **7**

A mixture of the proper pyrimidine or purine base (6.97 mmol), hexamethyldisilazane (HMDS) (8.64 mmol, 1.24 eq), and saccharine (0.32 mmol, 0.046 eq) in anhydrous CH_3CN (28 mL) was refluxed for 30 min under nitrogen. 1,2,5-Tri-*O*-acetyl-3-azido-3-deoxy- β -ribofuranose (**1**) [29] (5.36 mmol) and $\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$ (7.50 mmol, 1.40 eq) were then added and the reaction mixture was refluxed until completion of the reaction, cooled, neutralized with aqueous sodium bicarbonate, and extracted with dichloromethane (CH_2Cl_2 , 1000 mL). The organic extract was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered, and evaporated to dryness. The residue was purified by flash column chromatography to give compounds **2a–c**, **6** and **7**, in 42–71% yields as foams.

4.1.1.1. 1-(2',5'-Di-*O*-acetyl-3'-azido-3'-deoxy- β -D-ribofuranosyl)uracil (2a**).** Yield: 71%; Rf = 0.25 (*n*-Hexane/EtOAc 5:5); $[\alpha]_D^{25} = +26$ (c 0.20, CHCl_3); λ_{max} 257 nm (ϵ 5705); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 8.17 (br s, 1H, NH), 7.29 (d, 1H, $J_{5,6} = 7.9$ Hz, H-6), 5.75 (d, 1H, H-5), 5.73 (d, 1H, $J_{1,2'} = 3.5$ Hz, H-1'), 5.49 (dd, 1H, $J_{2,3'} = 5.8$ Hz, H-2'), 4.27 (t, 1H, $J = 6.4$ Hz, H-3'), 4.42–4.32 (m, 2H, H-4', H-5a'), 4.30–4.10 (m, 1H, H-5b'), 2.20, 2.14 (2s, 6H, 2OAc); ESI-MS (m/z) 354.11 [$M + H^+$]. Anal. calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_7$: C, 44.20; H, 4.28; N, 19.82; Found: C, 43.89; H, 4.40; N, 19.67.

4.1.1.2. 1-(2',5'-Di-*O*-acetyl-3'-azido-3'-deoxy- β -D-ribofuranosyl)thymine (2b**).** Yield: 60%; Rf = 0.39 (*n*-Hexane/EtOAc 5:5); $[\alpha]_D^{25} = -6$ (c 0.20, CHCl_3); λ_{max} 263 nm (ϵ 17,143); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 8.18 (br s, 1H, NH), 7.10 (s, 1H, H-6), 5.72 (d, 1H, $J_{1,2'} = 3.7$ Hz, H-1'), 5.66–5.64 (m, 1H, H-3'), 5.48 (dd, 1H, $J_{2,3'} = 5.8$ Hz, H-2'), 4.17–4.08 (m, 3H, H-4', H-5'), 2.20, 2.15 (2s, 6H, 2OAc), 1.93 (s, 3H, CH_3); ESI-MS (m/z) 368.14 [$M + H^+$]. Anal. calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_7$: C, 45.78; H, 4.66; N, 19.07; Found: C, 45.68; H, 4.78; N, 18.72.

4.1.1.3. 1-(2',5'-Di-*O*-acetyl-3'-azido-3'-deoxy- β -D-ribofuranosyl)5-fluorouracil (2c**).** Yield: 65%; Rf = 0.43 (*n*-Hexane/EtOAc 5:5); $[\alpha]_D^{25} = +20$ (c 0.20, CHCl_3); λ_{max} 265 nm (ϵ 8986); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 8.74 (br s, 1H, NH), 7.55 (d, 1H, $J_{6,F} = 6.0$ Hz, H-6) 5.85 (d, 1H, $J_{1,2'} = 3.6$ Hz, H-1'), 5.44 (dd, 1H, $J_{2,3'} = 5.2$ Hz, H-2'), 4.40–4.37 (m, 2H, H-3', H-4'), 4.24–4.16 (m, 2H, H-5'), 2.20, 2.17 (2s, 6H, 2OAc); ESI-MS (m/z) 372.13 [$M + H^+$]. Anal. calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{FN}_5\text{O}_7$: C, 42.05; H, 3.80; N, 18.86; Found: C, 42.17; H, 3.64; N, 18.67.

4.1.1.4. 1-(2',5'-Di-*O*-acetyl-3'-azido-3'-deoxy- β -D-ribofuranosyl) N^6 -benzoyladenine (6**).** Yield: 42%; Rf = 0.31 (*n*-Hexane/EtOAc 8:2); $[\alpha]_D^{25} = +12$ (c 0.20, CHCl_3); λ_{max} 280 nm (ϵ 17,323); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 8.80 (br s, 1H, NH), 8.04, 8.02 (2s, 2H, H-2, H-8), 7.67–7.44 (m, 5H, Bz), 6.13 (d, 1H, $J_{1,2'} = 3.4$ Hz, H-1'), 6.04 (dd, 1H, $J_{2,3'} = 5.7$ Hz, H-2'), 4.76 (t, 1H, $J = 6.4$ Hz, H-3'), 4.52–4.31 (m, 3H, H-4', H-5'), 2.20, 2.08 (2s, 6H, 2OAc); ESI-MS (m/z) 481.21 [$M + H^+$]. Anal. calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_8\text{O}_6$: C, 52.50; H, 4.20; N, 23.32; Found: C, 52.34; H, 4.51; N, 23.72.

4.1.1.5. 1-(2',5'-Di-*O*-acetyl-3'-azido-3'-deoxy- β -D-ribofuranosyl) N^6 -acetyladenine (7**).** Yield: 52%; Rf = 0.25 (*n*-Hexane/EtOAc 6:4); $[\alpha]_D^{25} = +2$ (c 0.20, CHCl_3); λ_{max} 263 nm (ϵ 18,636); $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$): δ : 10.85 (br s, 1H, NH), 8.69, 8.64 (2s, 2H, H-2, H-8), 6.18 (d, 1H, $J_{1,2'} = 3.4$ Hz, H-1'), 6.03 (dd, 1H, $J_{2,3'} = 5.7$ Hz, H-2'), 4.90 (t, 1H, $J = 6.9$ Hz, H-3'), 4.43–4.36 (m, 3H, H-4', H-5'), 2.25, 2.14, 1.98 (3s, 9H, 3OAc); ESI-MS (m/z) 419.21 [$M + H^+$]. Anal. calcd

for $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_8\text{O}_6$: C, 45.93; H, 4.34; N, 26.78; Found: C, 45.78; H, 4.74; N, 26.43.

4.1.2. General procedure for preparation of the protected double-headed ribonucleosides **4a–c**, **9a–c** and **10a,b**

To a stirred mixture of azide **2a–c**, **6** or **7** (6.60 mmol) and the corresponding propargyl purine or pyrimidine base **3** [30] or **8a–c** [30,31] (7.60 mmol) in THF (41.6 mL), was added a solution of sodium ascorbate (3.50 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.84 mmol) in H_2O (41.6 mL). The reaction mixture was refluxed for 3 h and then cooled. After being treated with MeOH and concentrated, the residue was purified by flash column chromatography (EtOAc/MeOH 9:1) to give the desired analogs **4a–c**, **9a–c** and **10a,b** in 47–61% yields as white foams.

4.1.2.1. 1-[2',5'-Di-*O*-acetyl-3'-[4-[(adenine-9-yl)methyl]-1,2,3-triazol-1-yl]- β -D-ribofuranosyl]uracil (4a**).** Yield: 56%; Rf = 0.30 (EtOAc/MeOH 7:3); $[\alpha]_D^{25} = -2$ (c 0.20, DMSO); λ_{max} 260 nm (ϵ 12,030); $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$): δ 11.37 (br s, 1H, NH Ur), 8.18, 8.16, 8.15 (3s, 3H, H-2 Ade, H-8 Ade, H-triazole), 7.76 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.4$ Hz, H-6 Ur), 7.11 (br s, 2H, NH_2 Ade), 6.06 (d, 1H, $J_{1,2'} = 3.9$ Hz, H-1'), 5.72 (d, 1H, H-5 Ur), 5.67–5.56 (m, 2H, H-2', H-3'), 5.47 (s, 2H, CH_2), 4.94–4.86 (m, 1H, H-4'), 4.34–4.23 (m, 2H, H-5'), 1.97, 1.64 (2s, 6H, 2OAc); ESI-MS (m/z) 527.22 [$M + H^+$]. Anal. calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_{10}\text{O}_7$: C, 47.91; H, 4.21; N, 26.61; Found: C, 47.79; H, 4.42; N, 26.95.

4.1.2.2. 1-[2',5'-Di-*O*-acetyl-3'-[4-[(adenine-9-yl)methyl]-1,2,3-triazol-1-yl]- β -D-ribofuranosyl]thymine (4b**).** Yield: 55%; Rf = 0.33 (EtOAc/MeOH 7:3); $[\alpha]_D^{25} = -22$ (c 0.20, DMSO); λ_{max} 261 nm (ϵ 5095); $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$): δ 11.35 (br s, 1H, NH Thy), 8.18, 8.16, 8.15 (3s, 3H, H-2 Ade, H-8 Ade, H-triazole), 7.61 (s, 1H, H-6 Thy), 7.11 (br s, 2H, NH_2 Ade), 6.08 (d, 1H, $J_{1,2'} = 4.6$ Hz, H-1'), 5.65 (t, 1H, $J = 7.2$ Hz, H-3'), 5.56 (dd, 1H, $J_{2,3'} = 7.2$ Hz, H-2'), 5.48 (s, 2H, CH_2), 4.92–4.84 (m, 1H, H-4'), 4.32 (dd, 1H, $J_{5a',5b'} = 12.3$ Hz, $J_{4',5a'} = 3.8$ Hz, H-5a'), 4.24 (dd, 1H, $J_{4',5b'} = 5.1$ Hz, H-5b'), 1.97, 1.81 (2s, 6H, 2OAc), 1.63 (s, 3H, CH_3 Thy); ESI-MS (m/z) 541.26 [$M + H^+$]. Anal. calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_{10}\text{O}_7$: C, 48.89; H, 4.48; N, 25.91; Found: C, 49.05; H, 4.20; N, 26.06.

4.1.2.3. 1-[2',5'-Di-*O*-acetyl-3'-[4-[(adenine-9-yl)methyl]-1,2,3-triazol-1-yl]- β -D-ribofuranosyl]5-fluorouracil (4c**).** Yield: 61%; Rf = 0.38 (EtOAc/MeOH 7:3); $[\alpha]_D^{25} = +2$ (c 0.20, DMSO); λ_{max} 284 nm (ϵ 3980); $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$): δ 8.20–8.12 (m, 4H, H-2 Ade, H-8 Ade, H-triazole, H-6 FUr), 7.25 (br s, 2H, NH_2 Ade), 6.08 (d, 1H, $J_{1,2'} = 4.1$ Hz, H-1'), 5.61 (t, 1H, $J = 7.2$ Hz, H-3'), 5.55 (dd, 1H, $J_{2,3'} = 7.1$ Hz, H-2'), 5.46 (s, 2H, CH_2), 4.91–4.84 (m, 1H, H-4'), 4.30 (dd, 1H, $J_{5a',5b'} = 12.7$ Hz, $J_{4',5a'} = 3.8$ Hz, H-5a'), 4.25 (dd, 1H, $J_{4',5b'} = 5.5$ Hz, H-5b'), 1.96, 1.60 (2s, 6H, 2OAc); ESI-MS (m/z) 545.13 [$M + H^+$]. Anal. calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{FN}_{10}\text{O}_7$: C, 46.33; H, 3.89; N, 25.73; Found: C, 46.08; H, 3.76; N, 26.09.

4.1.2.4. 9-[2',5'-Di-*O*-acetyl-3'-[4-[(uracil-1-yl)methyl]-1,2,3-triazol-1-yl]- β -D-ribofuranosyl] N^6 -benzoyladenine (9a**).** Yield: 57%; Rf = 0.29 (EtOAc/MeOH 8:2); $[\alpha]_D^{25} = -2$ (c 0.20, DMSO- d_6); λ_{max} 273 nm (ϵ 55,838); $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$): δ 11.22 (br s, 1H, NH Ur), 8.81, 8.74, 8.25 (3s, 3H, H-2 BzAde, H-8 BzAde, H-triazole), 8.05 (d, 2H, $J = 7.1$ Hz, Bz), 7.95 (br s, 1H, NH BzAde), 7.76 (d, 1H, $J_{5,6} = 7.9$ Hz, H-6 Ur), 7.64 (t, 1H, $J = 7.1$ Hz, Bz), 7.56 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz, Bz), 6.54 (d, 1H, $J_{1,2'} = 4.5$ Hz, H-1'), 6.19 (dd, 1H, $J_{2,3'} = 6.7$ Hz, H-2'), 6.04 (t, 1H, $J = 6.6$ Hz, H-3'), 5.60 (d, 1H, H-5 Ur), 5.13–5.04 (m, 1H, H-4'), 5.00 (s, 2H, CH_2), 4.44 (dd, 1H, $J_{5a',5b'} = 12.3$ Hz, $J_{4',5a'} = 3.7$ Hz, H-5a'), 4.30 (dd, 1H, $J_{4',5b'} = 5.4$ Hz, H-5b'), 1.96, 1.81 (2s, 6H, 2OAc); ESI-MS (m/z) 631.14 [$M + H^+$].

Anal. calcd for $C_{28}H_{26}N_{10}O_8$: C, 53.33; H, 4.16; N, 22.21; Found: C, 52.95; H, 4.33; N, 22.02.

4.1.2.5. 9-[2',5'-Di-O-acetyl-3'-[4-[(thymine-1-yl)methyl]-1,2,3-triazol-1-yl]- β -D-ribofuranosyl]N⁶-benzoyladenine (**9b**). Yield: 48%; Rf = 0.36 (EtOAc/MeOH 8:2); $[\alpha]_D^{22} = -2$ (c 0.20, DMSO); λ_{max} 269 nm (ϵ 9003); ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 11.26 (br s, 1H, NH Thy), 8.82, 8.74, 8.25 (3s, 3H, H-2 BzAde, H-8 BzAde, H-triazole), 8.05 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Bz), 7.69–7.53 (m, 5H, NH BzAde, H-6 Thy, Bz), 6.54 (d, 1H, $J_{1',2'} = 4.2$ Hz, H-1'), 6.40 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 6.4$ Hz, H-2'), 6.03 (t, 1H, J = 6.7 Hz, H-3'), 5.11–5.04 (m, 1H, H-4'), 4.96 (s, 2H, CH₂), 4.43 (dd, 1H, $J_{5a',5b'} = 12.6$ Hz, $J_{4',5a'} = 3.1$ Hz, H-5a'), 4.31 (dd, 1H, $J_{4',5b'} = 5.0$ Hz, H-5b'), 1.96, 1.80, 1.77 (3s, 9H, 2OAc, CH₃Thy); ESI-MS (*m/z*) 645.16 [M + H⁺]. Anal. calcd for $C_{29}H_{28}N_{10}O_8$: C, 54.04; H, 4.38; N, 21.73; Found: C, 54.41; H, 4.19; N, 22.13.

4.1.2.6. 9-[2',5'-Di-O-acetyl-3'-[4-[(N⁴-acetylcytosine-1-yl)methyl]-1,2,3-triazol-1-yl]- β -D-ribofuranosyl]N⁶-benzoyladenine (**9c**). Yield: 57%; Rf = 0.12 (EtOAc/MeOH 7:3); $[\alpha]_D^{22} = -39$ (c 0.20, DMSO); λ_{max} 269 nm (ϵ 9215); ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 11.19 (br s, 1H, NH BzAde), 10.78 (br s, 1H, NH AcCyt), 8.81, 8.84, 8.25 (3s, 3H, H-2 BzAde, H-8 BzAde, H-triazole), 8.22 (d, 1H, $J_{5,6} = 7.2$ Hz, H-6 AcCyt), 8.05 (d, 2H, J = 7.4 Hz, Bz), 7.64 (t, 1H, J = 7.4 Hz, Bz), 7.70 (t, 2H, J = 7.4 Hz, Bz), 7.18 (d, 1H, H-5 AcCyt), 6.54 (d, 1H, $J_{1',2'} = 4.4$ Hz, H-1'), 6.19 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 6.2$ Hz, H-2'), 6.03 (t, 1H, J = 6.8 Hz, H-3'), 5.12 (s, 2H, CH₂), 4.47–4.39 (m, 1H, H-4'), 4.44 (dd, 1H, $J_{5a',5b'} = 12.2$ Hz, $J_{4',5a'} = 3.7$ Hz, H-5a'), 4.31 (dd, 1H, $J_{4',5b'} = 5.1$ Hz, H-5b'), 2.09, 1.96, 1.79 (3s, 9H, 3OAc); ESI-MS (*m/z*) 672.18 [M + H⁺]. Anal. calcd for $C_{30}H_{29}N_{11}O_8$: C, 53.65; H, 4.35; N, 22.94; Found: C, 53.45; H, 4.46; N, 22.69.

4.1.2.7. 9-[2',5'-Di-O-acetyl-3'-[4-[(uracil-1-yl)methyl]-1,2,3-triazol-1-yl]- β -D-ribofuranosyl]N⁶-acetyladenine (**10a**). Yield: 47%; Rf = 0.38 (EtOAc/MeOH 7:3); $[\alpha]_D^{22} = -6$ (c 0.20, DMSO); λ_{max} 276 nm (ϵ 51,026); ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 11.23 (br s, 1H, NH Ur), 10.63 (br s, 1H, NH AcAde), 8.70, 8.23, 8.20 (3s, 3H, H-2 AcAde, H-8 AcAde, H-triazole), 7.74 (d, 1H, $J_{5,6} = 7.6$ Hz, H-6 Ur), 6.50 (d, 1H, $J_{1',2'} = 4.3$ Hz, H-1'), 6.19–6.09 (m, 1H, H-2'), 6.00 (t, 1H, J = 7.4 Hz, H-3'), 5.59 (d, 1H, H-5 Ur), 5.12–5.02 (m, 1H, H-4'), 4.99 (s, 2H, CH₂), 4.47–4.26 (m, 2H, H-5'), 2.27, 1.94, 1.79 (3s, 9H, 3OAc); ESI-MS (*m/z*) 569.21 [M + H⁺]. Anal. calcd for $C_{23}H_{24}N_{10}O_8$: C, 48.59; H, 4.26; N, 24.64; Found: C, 48.29; H, 4.02; N, 24.49.

4.1.2.8. 9-[2',5'-Di-O-acetyl-3'-[4-[(thymine-1-yl)methyl]-1,2,3-triazol-1-yl]- β -D-ribofuranosyl]N⁶-acetyladenine (**10b**). Yield: 54%; Rf = 0.21 (EtOAc/MeOH 7:3); $[\alpha]_D^{22} = -6$ (c 0.20, DMSO); λ_{max} 272 nm (ϵ 51,784); ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 11.22 (br s, 1H, NH Thy), 8.70 (br s, 1H, NH AcAde), 8.38, 8.21, 8.20 (3s, 3H, H-2 AcAde, H-8 AcAde, H-triazole), 7.60 (s, 1H, H-6 Thy), 6.34 (d, 1H, $J_{1',2'} = 4.1$ Hz, H-1'), 6.15–6.10 (m, 1H, H-2'), 6.02 (t, 1H, J = 6.7 Hz, H-3'), 5.00–4.98 (m, 1H, H-4'), 4.95 (s, 2H, CH₂), 4.41 (dd, 1H, $J_{5a',5b'} = 12.0$ Hz, $J_{4',5a'} = 3.2$ Hz, H-5a'), 4.27 (dd, 1H, $J_{4',5b'} = 4.9$ Hz, H-5b'), 1.93, 1.78, 1.76 (3s, 12H, 3OAc, CH₃Thy); ESI-MS (*m/z*) 583.25 [M + H⁺]. Anal. calcd for $C_{24}H_{26}N_{10}O_8$: C, 49.48; H, 4.50; N, 24.04; Found: C, 49.58; H, 4.39; N, 24.24.

4.1.3. General procedure for the preparation of unprotected nucleosides **5a–c**, **11a–c** and **12a,b**

The protected nucleosides **4a–c**, **9a–c** and **10a,b** (1.00 mmol) were treated with ammonia/MeOH (saturated at 0 °C, 27.9 mL) overnight at room temperature. The solvent was evaporated under reduced pressure to afford pure **5a–c**, **11a–c** and **12a,b** in 61–78% yields as white foams.

4.1.3.1. 1-[3'-[4-[(Adenine-9-yl)methyl]-1,2,3-triazol-1-yl]- β -D-ribofuranosyl]uracil (**5a**). Yield: 61%; Rf = 0.36 (EtOAc/MeOH 5:5); $[\alpha]_D^{22} = +12$ (c 0.20, DMSO); λ_{max} 278 nm (ϵ 25,310); ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 8.36 (d, 1H, $J_{5,6} = 7.3$ Hz, H-6 Ur), 8.17, 8.14 (2s, 3H, H-2 Ade, H-8 Ade, H-triazole), 7.12 (br s, 2H, NH₂ Ade), 6.58, 5.97 (2br s, 2H, 2OH), 5.90 (d, 1H, $J_{1',2'} = 3.7$ Hz, H-1'), 5.47 (s, 2H, CH₂), 5.42 (d, 1H, H-5 Ur), 5.18 (t, 1H, J = 6.3 Hz, H-3'), 4.69–4.64 (m, 1H, H-2'), 4.51–4.44 (m, 1H, H-4'), 3.81–3.53 (m, 2H, H-5'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 164.1, 155.9, 152.4, 151.0, 150.1, 142.8, 141.7, 140.8, 122.9, 119.3, 102.6, 91.2, 68.7, 63.3, 56.4, 55.2; ESI-MS (*m/z*) 443.18 [M + H⁺]. Anal. calcd for $C_{17}H_{18}N_{10}O_5$: C, 46.15; H, 4.10; N, 31.66; Found: C, 45.77; H, 3.82; N, 31.31.

4.1.3.2. 1-[3'-[4-[(Adenine-9-yl)methyl]-1,2,3-triazol-1-yl]- β -D-ribofuranosyl]thymine (**5b**). Yield: 78%; Rf = 0.41 (EtOAc/MeOH 5:5); $[\alpha]_D^{22} = -2$ (c 0.20, DMSO); λ_{max} 277 nm (ϵ 6358); ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 8.17, 8.16, 8.14 (3s, 3H, H-2 Ade, H-8 Ade, H-triazole), 7.81 (s, 1H, H-6 Thy), 7.06 (br s, 2H, NH₂ Ade), 6.51 (br s, 1H, OH), 5.94 (d, 1H, $J_{1',2'} = 4.9$ Hz, H-1'), 5.87 (br s, 1H, OH), 5.46 (s, 2H, CH₂), 5.19 (t, 1H, J = 6.2 Hz, H-3'), 4.64–4.60 (m, 1H, H-2'), 4.52–4.46 (m, 1H, H-4'), 3.73 (dd, 1H, $J_{5a',5b'} = 12.6$ Hz, $J_{4',5a'} = 3.3$ Hz, H-5a'), 3.58 (dd, 1H, $J_{4',5b'} = 2.8$ Hz, H-5b'), 1.77 (s, 3H, CH₃Thy); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 163.4, 155.7, 152.3, 151.8, 150.0, 142.4, 141.0, 136.7, 123.4, 120.1, 111.2, 93.3, 70.0, 62.4, 56.8, 55.7, 16.1; ESI-MS (*m/z*) 457.24 [M + H⁺]. Anal. calcd for $C_{18}H_{20}N_{10}O_5$: C, 47.37; H, 4.42; N, 30.69; Found: C, 47.08; H, 4.24; N, 30.95.

4.1.3.3. 4.1.3.3.1-[3'-[4-[(Adenine-9-yl)methyl]-1,2,3-triazol-1-yl]- β -D-ribofuranosyl]5-fluorouracil (**5c**). Yield: 72%; Rf = 0.45 (EtOAc/MeOH 5:5); $[\alpha]_D^{22} = +2$ (c 0.20, DMSO); λ_{max} 277 nm (ϵ 6103); ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 8.36 (d, 1H, $J_{6,F5} = 7.3$ Hz, H-6 FUr), 8.17, 8.13 (2s, 3H, H-2 Ade, H-8 Ade, H-triazole), 7.11 (br s, 2H, NH₂ Ade), 6.57, 5.97 (2br s, 2H, 2OH), 5.89 (d, 1H, $J_{1',2'} = 3.7$ Hz, H-1'), 5.46 (s, 2H, CH₂), 5.17 (t, 1H, J = 6.2 Hz, H-3'), 4.68–4.64 (m, 1H, H-2'), 4.50–4.43 (m, 1H, H-4'), 3.78 (dd, 1H, $J_{5a',5b'} = 12.9$ Hz, $J_{4',5a'} = 3.3$ Hz, H-5a'), 3.57 (dd, 1H, $J_{4',5b'} = 2.7$ Hz, H-5b'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 161.2, 156.7, 152.3, 151.1, 150.4, 143.8, 141.0, 140.9, 127.7, 123.4, 120.1, 92.1, 70.3, 63.2, 56.7, 55.4; ESI-MS (*m/z*) 461.17 [M + H⁺]. Anal. calcd for $C_{17}H_{17}FN_{10}O_5$: C, 44.35; H, 3.72; N, 30.42; Found: C, 44.62; H, 3.88; N, 30.27.

4.1.3.4. 9-[3'-[4-[(Uracil-1-yl)methyl]-1,2,3-triazol-1-yl]- β -D-ribofuranosyl]N⁶-benzoyladenine (**11a**). Yield: 66%; Rf = 0.38 (EtOAc/MeOH 5:3); $[\alpha]_D^{22} = -14$ (c 0.20, DMSO); λ_{max} 273 nm (ϵ 51,779); ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 8.43, 8.18, 8.16 (3s, H-2 BzAde, H-8 BzAde, H-triazole), 7.87 (d, 2H, J = 7.0 Hz, Bz), 7.77 (d, 1H, $J_{5,6} = 7.8$ Hz, H-6 Ur), 7.47–7.38 (m, 3H, Bz), 6.08 (d, 1H, $J_{1',2'} = 5.7$ Hz, H-1'), 5.73 (br s, 1H, OH), 5.61 (d, 1H, H-5 Ur), 5.41 (t, 1H, J = 6.1 Hz, H-3'), 5.08–4.97 (m, 1H, H-2'), 4.98 (s, 2H, CH₂), 4.76–4.72 (m, 2H, OH, H-4'), 3.79–3.60 (m, 2H, H-5'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 165.6, 163.2, 152.3, 151.8, 151.0, 150.4, 143.5, 141.2, 140.9, 133.9, 132.6, 128.7, 127.1, 123.0, 120.2, 102.2, 91.7, 70.8, 64.5, 56.7, 50.4; ESI-MS (*m/z*) 547.16 [M + H⁺]. Anal. calcd for $C_{24}H_{22}N_{10}O_6$: C, 52.75; H, 4.06; N, 25.63; Found: C, 52.57; H, 3.89; N, 25.29.

4.1.3.5. 9-[3'-[4-[(Thymine-1-yl)methyl]-1,2,3-triazol-1-yl]- β -D-ribofuranosyl]N⁶-benzoyladenine (**11b**). Yield: 71%; Rf = 0.29 (EtOAc/MeOH 5:5); $[\alpha]_D^{22} = -2$ (c 0.20, DMSO); λ_{max} 275 nm (ϵ 6824); ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 11.18 (br s, 1H, NH), 8.41, 8.17, 8.15 (3s, 3H, H-2 BzAde, H-8 BzAde, H-triazole), 7.87 (d, 2H, J = 6.9 Hz, Bz), 7.62 (s, 1H, H-6 Thy), 7.53–7.40 (m, 3H, Bz), 6.09 (d, 1H, $J_{1',2'} = 5.6$ Hz, H-1'), 5.99 (d, 1H, J = 5.2 Hz, OH), 5.59 (br s, 1H, OH), 5.41 (t, 1H, J = 6.1 Hz, H-3'), 5.07–4.99 (m, 1H, H-2'), 4.95 (s, 2H, CH₂), 4.77–4.69 (m, 1H, H-4'), 3.78 (dd, 1H, $J_{5a',5b'} = 12.7$ Hz, $J_{4',5a'} = 4.0$ Hz,

H-5a'), 3.63 (dd, 1H, $J_{4,5b'} = 5.4$ Hz, H-5b'), 1.77 (s, 3H, CH₃Thy); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 165.4, 163.7, 152.8, 151.1, 150.4, 150.0, 142.9, 141.1, 138.4, 135.6, 133.3, 129.0, 128.2, 122.8, 120.4, 111.1, 93.3, 70.0, 64.5, 56.7, 50.2, 16.3; ESI-MS (*m/z*) 561.13 [M + H⁺]. Anal. calcd.

4.1.3.6. 9-[3'-[4-[(Cytosine-1-yl)methyl]-1,2,3-triazol-1-yl]-β-D-ribofuranosyl]adenine (**11c**). Yield: 71%; Rf = 0.21 (EtOAc/MeOH 7:3); $[\alpha]_D^{22} = -2$ (c 0.20, DMSO); λ_{max} 278 nm (ϵ 10,932); ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 8.41, 8.16, 8.08 (3s, 3H, H-2 Ade, H-8 Ade, H-triazole), 7.69 (d, 1H, $J_{5,6} = 7.2$ Hz, H-6 Cyt), 7.33 (br s, 2H, NH₂Cyt), 6.99 (br s, 2H, NH₂ Ade), 6.08 (d, 1H, $J_{1',2'} = 5.7$ Hz, H-1'), 6.00 (br s, 1H, OH), 5.68 (d, 1H, H-5 Cyt), 5.66 (br s, 1H, OH), 5.40 (t, 1H, $J = 6.2$ Hz, H-3'), 5.02 (t, 1H, H-2'), 4.93 (s, 2H, CH₂), 4.73–4.68 (m, 1H, H-4'), 3.79–3.58 (m, 2H, H-5'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 164.9, 157.2, 155.8, 152.4, 150.3, 142.5, 140.8, 138.7, 122.1, 119.9, 99.2, 95.3, 70.1, 64.1, 62.9, 56.3; ESI-MS (*m/z*) 444.17 [M + H⁺]. Anal. calcd for C₁₇H₂₁N₁₁O₄: C, 46.05; H, 4.77; N, 34.75; Found: C, 45.65; H, 4.63; N, 34.87.

4.1.3.7. 9-[3'-[4-[(Uracil-1-yl)methyl]-1,2,3-triazol-1-yl]-β-D-ribofuranosyl]adenine (**12a**). Yield: 63%; Rf = 0.25 (EtOAc/MeOH 7:3); $[\alpha]_D^{22} = +12$ (c 0.20, DMSO); λ_{max} 278 nm (ϵ 10,774); ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 11.23 (br s, 1H, NH), 8.41, 8.16 (2s, 3H, H-2 Ade, H-8 Ade, H-triazole), 7.74 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.4$ Hz, H-6 Ur), 7.29 (s, 2H, NH₂ Ade), 6.58 (br s, 1H, OH), 6.09 (d, 1H, $J_{1',2'} = 5.3$ Hz, H-1'), 6.00 (br s, 1H, OH), 5.59 (d, 1H, H-5 Ur), 5.47–5.37 (m, 1H, H-3'), 5.11–5.00 (m, 1H, H-2'), 4.98 (s, 2H, CH₂), 4.77–4.68 (m, 1H, H-4'), 3.82–3.58 (m, 2H, H-5'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 162.7, 157.3, 152.2, 150.9, 148.4, 143.5, 142.0, 140.6, 122.7, 120.1, 102.2, 92.5, 68.6, 63.6, 54.9, 48.0; ESI-MS (*m/z*) 443.10 [M + H⁺]. Anal. calcd for C₁₇H₁₈N₁₀O₅: C, 46.15; H, 4.10; N, 31.66; Found: C, 46.35; H, 3.92; N, 31.41.

4.1.3.8. 9-[3'-[4-[(Thymine-1-yl)methyl]-1,2,3-triazol-1-yl]-β-D-ribofuranosyl]adenine (**12b**). Yield: 66%; Rf = 0.23 (EtOAc/MeOH 7:3); $[\alpha]_D^{22} = +10$ (c 0.20, DMSO); λ_{max} 278 nm (ϵ 18,211); ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 11.25 (br s, 1H, NH), 8.43, 8.18, 8.16 (3s, 3H, H-2 Ade, H-8 Ade, H-triazole), 7.63 (s, 1H, H-6 Thy), 7.31 (s, 2H, NH₂ Ade), 6.10 (d, 1H, $J_{1',2'} = 5.3$ Hz, H-1'), 6.01, 5.62 (2br s, 2H, 2OH), 5.47–5.36 (m, 1H, H-3'), 5.09–4.99 (m, 1H, H-2'), 4.95 (s, 2H, CH₂), 4.75–4.70 (m, 1H, H-4'), 3.83–3.56 (m, 2H, H-5'), 1.25 (s, 3H, CH₃Thy); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 164.5, 157.3, 152.4, 150.1, 148.8, 143.6, 140.7, 136.4, 122.3, 120.0, 110.5, 93.1, 68.9, 63.2, 55.4, 50.4, 16.7; ESI-MS (*m/z*) 457.20 [M + H⁺]. Anal. calcd for C₁₈H₂₀N₁₀O₅: C, 47.37; H, 4.42; N, 30.69; Found: C, 47.07; H, 4.56; N, 30.52.

4.2. EDN expression and purification

The expression strain was constructed as described previously [13]. The purification procedure has many similarities to that of eosinophil cationic protein [36] but with a significant number of modifications. Briefly, a synthetic gene for human EDN was inserted into pET11c expression vector, and the protein was purified from inclusion bodies of *E. coli* B834 cells, which were used as the host strain. Recombinant EDN contains an additional methionine residue at the N terminus, that does not affect its natural specific activity [12] and lacks any post-translational modification that is present in EDN isolated from human body fluids. More specifically, expression strains were cultured at 37 °C with shaking in Terrific broth [44], supplemented with ampicillin (100 µg/mL). Initially, 8 mL of broth was inoculated with the strain from a frozen glycerol stock culture. Incubation proceeded for 16 h, at which point the culture was used to inoculate 800 mL of fresh broth (ratio 1:100). This was incubated to a density of OD_{600nm}

0.6–0.8, when protein expression was induced by the addition of IPTG to a final concentration of 1 mM. Incubation was continued for an additional 3 h, at which point the culture was harvested by centrifugation for 20 min at 2000g and 4 °C. Cell pellets were stored at –20 °C prior to protein purification. Cell lysis and protein extraction were carried out on ice. Cell pellet was dispersed in 40 mL lysis buffer A (1 mM PMSF, 0.1% (v/v) Triton X-100, 2 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0) and incubated on ice for 10 min after addition of 0.1% (w/v) sodium deoxycholate. Incubation was continued for an additional 15 min at 4 °C under agitation after the addition of 40 mg lysozyme and 500 U benzonase and then ruptured by sonication in 4–5 × 30 s bursts, using the ultrasonic processor UP400S (400 W, 24 kHz). The lysate was centrifuged for 1 h at 9200g and 4 °C, the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 100 mL washing buffer (50 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA, 0.3 M NaCl, pH 8.0) supplemented with 0.1% (v/v) Triton X-100. The lysate was mechanically sheared using the WiseStir HS-30E homogenizing stirrer and then centrifuged for 1 h at 9200g, 4 °C. The pellet was washed with a further 100 mL washing buffer, homogenized and collected by centrifugation as before for two more times. The last time, no Triton was added to the washing buffer. The pellet fraction, containing the inclusion bodies, was dissolved in 15 mL of solution containing 6 M guanidine hydrochloride, 0.08 M reduced glutathione, 2 mM EDTA, 0.1 M Tris/HCl pH 8.5, and placed on a circular rotator at room temperature for 2 h. The sample was then added dropwise with gentle stirring at 4 °C to 0.5 M L-arginine-HCl, 0.1 M Tris/acetate, pH 8.5, containing oxidized glutathione, to obtain a reduced/oxidized glutathione ratio of 4. The final volume of the refolding buffer was adjusted to obtain a final protein concentration of 0.1 mg/mL. The protein was incubated in the refolding buffer for 72 h at 4 °C, and then centrifuged for 10 min. at 7000g and 4 °C, after setting the pH value of the buffer at 5.0. Thereafter, the protein sample was concentrated and buffer exchanged against 0.15 M sodium acetate, pH 5.0, using a Millipore filtration system (Millipore). Basic proteins were captured by passing the solution through a 1 mL Resource S cation exchange resin (GE Healthcare), which was equilibrated with 5 column volumes (CV) of 0.15 M sodium acetate, pH 5.0, and the protein was eluted at a flowrate of 1 mL/min with a linear gradient from the initial buffer A (0.15 M sodium acetate, pH 5.0) to the final buffer B (0.15 M sodium acetate, pH 5.0, 2.0 M NaCl) with the following steps: 15 CV with 100% buffer A, 7 CV to 20% buffer B, 40 CV to 35% buffer B, and 12 CV to 100% buffer B. EDN elutes at about 400 mM NaCl. The peak fraction is pooled, buffer exchanged against 0.15 M sodium acetate, pH 5.0, and reloaded onto the same column. The steps were the following: 10 CV with 100% buffer A, 5 CV to 25% buffer B, 20 CV to 45% buffer B, and 5 CV to 100% buffer B. EDN elutes at about 400 mM NaCl. The eluate absorbance was monitored at 280 nm and fractions corresponding to the major absorbance peak were pooled and buffer exchanged against MilliQ H₂O, prior to storage at –80 °C after flash freezing. EDN was obtained in a yield of 2 mg/L.

4.3. Enzyme kinetics

Bovine pancreatic RNase A (type XII-A), yeast tRNA and other chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (Athens, Greece). Concentrations of the RNase A and EDN solutions were determined spectrophotometrically using absorption coefficient $\epsilon_{278.5nm} = 9800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [45] and $\epsilon_{280nm} = 11,220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [5], respectively. The Ribonuclease Activity assay used was adapted from the procedure described by Anfinsen et al. [46] and Slifman et al. [47]. Determination of ribonuclease activity of RNase A and EDN proceeded as follows: yeast tRNA (Sigma-Aldrich) was solubilized in 50 mM sodium phosphate, pH = 7.4, at a concentration of 60 µM.

Table 3

A summary of the data processing and refinement statistics for the inhibitor complex structure. Values in parentheses are for the outermost shell.

EDN complex	11c
Experiment	5 mM (24 h)
Space group	$P2_12_12_1$
<i>Cell dimensions</i>	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	42.0, 52.2, 56.8
α , β , γ (°)	90.0, 90.0, 90.0
Resolution (Å)	38.41–1.34
Outermost shell (Å)	1.42–1.34
Reflections measured	254,921 (32,135)
Unique reflections	28,507 (4093)
R_{symm}	0.156 (0.330)
Completeness (%)	100 (100)
$\langle I/\sigma \rangle$	10.3 (5.3)
R_{cryst}	0.169 (0.208)
R_{free}	0.198 (0.227)
No of solvent molecules	177
<i>r.m.s. deviation from ideality</i>	
in bond lengths (Å)	0.009
in angles (°)	1.48
<i>Average B factor</i>	
Protein atoms (Å ²)	10.55
Solvent molecules (Å ²)	21.75
Ligand atoms (Å ²)	14.54
PDB entry	5E13

Various tRNA concentrations were used: 2 μM , 3 μM , 4 μM , 5 μM and 6 μM . The final volume of the reaction was 300 μl . tRNA solutions were incubated at 30 °C for 10 min. 10 nM of enzyme final concentration from a 0.6 μM stock solution added to the reaction mixture. The reaction was stopped one minute and five minutes later in the case of RNase A and EDN respectively, by the addition of 300 μl of fresh ice-cold solution of 40 mM lanthanum nitrate, 6% v/v perchloric acid. Stopped reactions were maintained on ice for 15 min, and insoluble tRNA was removed by centrifugation at 4 °C for 15 min at 14,500 rpm on a bench centrifuge. The amount of cleaved tRNA was determined from the ultraviolet absorbance at 260 nm (A_{260}) of the supernatant fraction. RNase A displayed a $K_m = 6.79 \pm 0.23 \mu\text{M}$ for tRNA. The same procedure was repeated, by adding different concentrations of the inhibitors (Fig. 1) in 6% and 20% v/v DMSO for RNase A and EDN, respectively. Each experiment was performed in duplicate and the average of two measurements was included in the plots. For each experiment a blank run (without enzyme) was conducted. The A_{260} measured from these blanks was subtracted from the corresponding reaction samples to eliminate any endogenous tRNA hydrolysis. Calculations included the following approximations: the average molecular weight (Mr) of tRNA as 28,100 (75–90 ribonucleotides/tRNA molecule \times Mr 341/ribonucleotide), with A_{260} of 1.0 corresponding to 40 μg of RNA [2]. Kinetic data presented in the form of a Lineweaver–Burk, Dixon or IC_{50} plots were analyzed for the calculation of the kinetic and binding parameters by the non-linear regression program GRAFIT [48], using the explicit weighting function for treating data errors. K_i values for EDN were calculated from IC_{50} s using the equation $K_i = IC_{50}/([S]/K_m + 1)$, with $K_m = 11.29 \pm 1.16 \mu\text{M}$ and [tRNA] of 6 μM .

4.4. Crystallization, X-ray data collection, phasing and refinement

Crystals of EDN were grown with the vapor diffusion method from a drop containing 3.5 mg/mL protein in 0.05 M sodium cacodylate buffer pH 6.5, 0.75 M sodium acetate, equilibrated against a reservoir of 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 6.5, 1.5 M sodium acetate at 16 °C. The protein–ligand complex was formed by soaking a single EDN crystal in a solution of **11c** in 0.1 M sodium cacodylate pH buffer 6.5, supplemented with 1.5 M

sodium acetate and 10% v/v DMSO prior to data collection (Table 3). X-ray diffraction data were collected at 100 K at station ID911-3 of the Max-Lab synchrotron facility at Lund, Sweden, on a MAR CCD detector using a wavelength of 1.0403 Å. Raw data were processed with Mosflm [49] while scaling and merging of intensities was performed with the program SCALA [50] of the CCP4 suite. The structure of EDN–**11c** complex was solved using the program Phaser [51] and the native structure EDN at 0.98 Å resolution [38] as a model. Alternate cycles of manual building with the program COOT [52], and refinement using the maximum likelihood target function as implemented in the program REFMAC [53] improved the model. The ligand model was constructed using the PRODRG server [54] and it was fitted to the electron density map after adjustment of its torsion angles. A summary of the crystallographic statistics is presented in Table 3. The stereochemistry of the protein residues was validated by MolProbity [55]. Hydrogen bonds and van der Waals interactions were calculated with the program CONTACT as implemented in CCP4 [56] applying a distance cut off 3.3 Å and 4.0 Å, respectively. Figures were prepared with PyMOL [57].

Acknowledgments

This work was supported in part by the Postgraduate Programmes “Biotechnology–Quality assessment in Nutrition and the Environment”, “Application of Molecular Biology–Molecular Genetics–Molecular Markers”, Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2015.10.007>.

References

- [1] K.R. Acharya, S.J. Ackerman, Eosinophil granule proteins: form and function, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 17406–17415.
- [2] E. Boix, M. Torrent, D. Sanchez, M.V. Nogueas, The antipathogen activities of eosinophil cationic protein, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9 (2008) 141–152.
- [3] H.F. Rosenberg, Eosinophil-derived neurotoxin/RNase 2: connecting the past, the present and the future, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9 (2008) 135–140.
- [4] K. Fredens, R. Dahl, P. Venge, The Gordon phenomenon induced by the eosinophil cationic protein and eosinophil protein X, *J. Allergy Clin. Immunol.* 70 (1982) 361–366.
- [5] G.J. Gleich, D.A. Loegering, M.P. Bell, J.L. Checkel, S.J. Ackerman, D.J. McKean, Biochemical and functional similarities between human eosinophil derived neurotoxin and eosinophil cationic protein – homology with ribonuclease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 3146–3150.
- [6] K.J. Hamann, R.L. Barker, D.A. Loegering, G.J. Gleich, Comparative toxicity of purified human eosinophil granule proteins for newborn larvae of *Trichinella spiralis*, *J. Parasitol.* 73 (1987) 523–529.
- [7] K.J. Hamann, G.J. Gleich, J.L. Checkel, D.A. Loegering, J.W. McCall, R.L. Barker, In vitro killing of microfilariae of *Brugia pahangi* and *Brugia malayi* by eosinophil granule proteins, *J. Immunol.* 144 (1990) 3166–3173.
- [8] D. Yang, Q. Chen, H.F. Rosenberg, S.M. Rybak, D.L. Newton, Z.Y. Wang, Q. Fu, V. T. Tchernev, M. Wang, B. Schweitzer, S.F. Kingsmore, D.D. Patel, J.J. Oppenheim, O.M. Howard, Human ribonuclease A superfamily members, eosinophil-derived neurotoxin and pancreatic ribonuclease, induce dendritic cell maturation and activation, *J. Immunol.* 173 (2004) 6134–6142.
- [9] D. Yang, Q. Chen, S.B. Su, P. Zhang, K. Kurosaka, R.R. Caspi, S.M. Michalek, H.F. Rosenberg, N. Zhang, J.J. Oppenheim, Eosinophil-derived neurotoxin acts as an alarmin to activate the TLR2–MyD88 signal pathway in dendritic cells and enhances Th2 immune responses, *J. Exp. Med.* 205 (2008) 79–90.
- [10] J.B. Domachowske, K.D. Dyer, C.A. Bonville, H.F. Rosenberg, Recombinant human eosinophil-derived neurotoxin/RNase 2 functions as an effective antiviral agent against respiratory syncytial virus, *J. Infect. Dis.* 177 (1998) 1458–1464.
- [11] S. Sorrentino, D.G. Glitz, K.J. Hamann, D.A. Loegering, J.A. Checkel, G.J. Gleich, Eosinophil-derived neurotoxin and human liver ribonuclease: identity of structure and linkage of neurotoxicity to nuclease activity, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 14859–14865.
- [12] D.L. Newton, P. Nicholls, S.M. Rybak, R.J. Youle, Expression and characterization of recombinant human eosinophil-derived neurotoxin and

- eosinophil-derived neurotoxin-anti-transferrin receptor sFv, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 26739–26745.
- [13] D.D. Leonidas, E. Boix, R. Prill, M. Suzuki, R. Turton, K. Minson, G.J. Swaminathan, R.J. Youle, K.R. Acharya, Mapping the ribonucleolytic active site of eosinophil-derived neurotoxin (EDN). High resolution crystal structures of EDN complexes with adenylic nucleotide inhibitors, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 15009–15017.
- [14] R.T. Raines, Ribonuclease A, *Chem. Rev.* 98 (1998) 1045–1065.
- [15] D.D. Leonidas, R. Shapiro, L.I. Irons, N. Russo, K.R. Acharya, Crystal structures of ribonuclease A complexes with 5'-diphosphoadenosine 3'-phosphate and 5'-diphosphoadenosine 2'-phosphate at 1.7 Å resolution, *Biochemistry* 36 (1997) 5578–5588.
- [16] D.D. Leonidas, R. Shapiro, L.I. Irons, N. Russo, K.R. Acharya, Toward rational design of ribonuclease inhibitors: high-resolution crystal structure of a ribonuclease A complex with a potent 3',5'-pyrophosphate-linked dinucleotide inhibitor, *Biochemistry* 38 (1999) 10287–10297.
- [17] D.D. Leonidas, G.B. Chavali, N.G. Oikonomakos, E.D. Chrysina, M.N. Kosmopoulou, M. Vlasi, C. Frankling, K.R. Acharya, High-resolution crystal structures of ribonuclease A complexed with adenylic and uridylic nucleotide inhibitors. Implications for structure-based design of ribonucleolytic inhibitors, *Protein Sci.* 12 (2003) 2559–2574.
- [18] G.N. Hatzopoulos, D.D. Leonidas, R. Kardakaris, J. Kobe, N.G. Oikonomakos, The binding of IMP to Ribonuclease A, *FEBS J.* 272 (2005) 3988–4001.
- [19] V.G. Tsrirkone, K. Dossi, C. Drakou, S.E. Zographos, M. Kontou, D.D. Leonidas, Inhibitor design for the binding of two 5'-phosphate uridine analogues, *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 65 (2009) 671–677.
- [20] D.D. Leonidas, T.K. Maiti, A. Samanta, S. Dasgupta, T. Pathak, S.E. Zographos, N. G. Oikonomakos, The binding of 3'-N-piperidine-4-carboxyl-3'-deoxy-arauidine to ribonuclease A in the crystal, *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 6055–6064.
- [21] A. Samanta, D.D. Leonidas, S. Dasgupta, T. Pathak, S.E. Zographos, N.G. Oikonomakos, Morpholino, piperidino, and pyrrolidino derivatives of pyrimidine nucleosides as inhibitors of ribonuclease A: synthesis, biochemical, and crystallographic evaluation, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 932–942.
- [22] V. Parmenopoulou, D.S.M. Chatzileontiadou, S. Manta, S. Bougiatioti, P. Maragozidis, D.N. Gkaragkouni, E. Kaffesaki, A.L. Kantsadi, V.T. Skamnaki, S.E. Zographos, P. Zounpoulakis, N.A.A. Balatsos, D. Komiottis, D.D. Leonidas, Triazole pyrimidine nucleosides as inhibitors of Ribonuclease A. Synthesis, biochemical, and structural evaluation, *Bioorg. Med. Chem.* 20 (2012) 7184–7193.
- [23] J. Debnath, S. Dasgupta, T. Pathak, Inhibition of ribonuclease A by nucleoside-dibasic acid conjugates, *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 6491–6495.
- [24] J. Debnath, S. Dasgupta, T. Pathak, Nucleoside-amino acid conjugates: an alternative route to the design of ribonuclease A inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 4921–4927.
- [25] J. Debnath, S. Dasgupta, T. Pathak, Dinucleosides with non-natural backbones: a new class of ribonuclease A and angiogenin inhibitors, *Chemistry* 18 (2012) 1618–1627.
- [26] C. Andersen, P.K. Sharma, M.S. Christensen, N.S. Pedersen, P. Nielsen, Synthesis of double-headed nucleosides with the additional nucleobase in the 5'-C-position, *Nucl. Acids Symp. Ser. (Oxf.)* 52 (2008) 275–276.
- [27] A.S. Jorgensen, K.I. Shaikh, G. Enderlin, E. Ivarsen, S. Kumar, P. Nielsen, The synthesis of double-headed nucleosides by the CuAAC reaction and their effect in secondary nucleic acid structures, *Org. Biomol. Chem.* 9 (2011) 1381–1388.
- [28] K.I. Shaikh, Charlotte Stahl Madsen, Lise Junker Nielsen, A.S. Jorgensen, H. Nielsen, M. Petersen, P. Nielsen, Synthesis and molecular modelling of double-functionalized nucleosides with aromatic moieties in the 5'-(S)-position and minor groove interactions in DNA zipper structures, *Chem. Eur. J.* 16 (2010) 12904–12919.
- [29] Z.G. Gao, H.T. Duong, T. Sonina, S.K. Kim, P. Van Rompaey, S. Van Calenbergh, L. Mamedova, H.O. Kim, M.J. Kim, A.Y. Kim, B.T. Liang, L.S. Jeong, K.A. Jacobson, Orthogonal activation of the reengineered A(3) adenosine receptor (neocceptor) using tailored nucleoside agonists, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 2689–2702.
- [30] H.B. Lazrek, M. Taourirte, T. Oulih, J.L. Barascut, J.L. Imbach, C. Pannecouque, M. Witrouw, E. De Clercq, Synthesis and anti-HIV activity of new modified 1,2,3-triazole acyclonucleosides, *Nucleos. Nucleot. Nucl. Acids* 20 (2001) 1949–1960.
- [31] W.E. Lindsell, C. Murray, P.N. Preston, T.A.J. Woodman, Synthesis of 1,3-diyenes in the purine, pyrimidine, 1,3,5-triazine and acridine series, *Tetrahedron* 56 (2000) 1233–1245.
- [32] E. Bozo, S. Boros, J. Kuzsmann, E. Gacs-Baitz, L. Parkanyi, Orally active antithrombotic thioglycosides. Part V. An economic synthesis of 1,2,3,4-tetra-O-acetyl-5-thio- β -xylopyranose and its transformation into 4-substituted-phenyl 1,5-dithio- β -xylopyranosides possessing antithrombotic activity, *Carbohydr. Res.* 308 (1998) 297–310.
- [33] N. Kunesch, C. Miet, J. Poisson, Mild, rapid and selective deprotection of acetylated carbohydrates and phenols with guanidine, *Tetrahedron Lett.* 28 (1987) 3569–3572.
- [34] N.M. Brahme, W.T. Smith, Some intramolecular Michael additions of adenine-derivatives, *J. Heterocycl. Chem.* 22 (1985) 109–112.
- [35] M. Tourirte, T. Oulih, H.B. Lazrek, J.L. Barascut, J.L. Imbach, N.A. Almasoudi, Synthesis of 3'-deoxy-3'-[4-(pyrimidin-1-yl)methyl-1,2,3-triazol-1-yl] thymidine via 1,3-dipolar cycloaddition, *Nucleos. Nucleot. Nucl. Acids* 22 (2003) 1985–1993.
- [36] E. Boix, Eosinophil cationic protein, *Methods Enzymol.* 341 (2001) 287–305.
- [37] M.D. Baker, D.E. Holloway, G.J. Swaminathan, K.R. Acharya, Crystal structures of eosinophil-derived neurotoxin (EDN) in complex with the inhibitors 5'-ATP, Ap3A, Ap4A, and Ap5A, *Biochemistry* 45 (2006) 416–426.
- [38] G.J. Swaminathan, D.E. Holloway, K. Veluraja, K.R. Acharya, Atomic resolution (0.98 Å) structure of eosinophil-derived neurotoxin, *Biochemistry* 41 (2002) 3341–3352.
- [39] M.Z. Hernandez, S.M. Cavalcanti, D.R. Moreira, W.F. de Azevedo Junior, A.C. Leite, Halogen atoms in the modern medicinal chemistry: hints for the drug design, *Curr. Drug Targets* 11 (2010) 303–314.
- [40] N. Russo, R. Shapiro, B.L. Vallee, 5'-diphosphoadenosine 3'-phosphate is a potent inhibitor of bovine pancreatic ribonuclease A, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231 (1997) 671–674.
- [41] B.R. Kelemen, T.A. Klink, M.A. Behlke, S.R. Eubanks, P.A. Leland, R.T. Raines, Hypersensitive substrate for ribonucleases, *Nucl. Acids Res.* 27 (1999) 3696–3701.
- [42] N. Russo, R. Shapiro, Potent inhibition of mammalian ribonucleases by 3',5'-pyrophosphate-linked nucleotides, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 14902–14908.
- [43] G.N. Murshudov, P. Skubak, A.A. Lebedev, N.S. Pannu, R.A. Steiner, R.A. Nicholls, M.D. Winn, F. Long, A.A. Vagin, REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 67 (2011) 355–367.
- [44] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- [45] M. Sela, C.B. Anfinsen, Some spectrophotometric and polarimetric experiments with ribonuclease, *Biochim. Biophys. Acta* 24 (1957) 229–235.
- [46] C.B. Anfinsen, R.R. Redfield, W.L. Choate, J. Page, W.R. Carroll, Studies on the gross structure, cross-linkages, and terminal sequences in ribonuclease, *J. Biol. Chem.* 207 (1954) 201–210.
- [47] N.R. Slifman, D.A. Leogering, D.J. McKean, G.J. Gleich, Ribonuclease-activity associated with human eosinophil derived neurotoxin and eosinophil cationic protein, *J. Immunol.* 137 (1986) 2913–2917.
- [48] R.J. Leatherbarrow, GraFit version 4.06, Erithacus Software Ltd., Staines, U.K., 1998.
- [49] A.G.W. Leslie, H.R. Powell, Processing diffraction data with mosflm, in: R.J. Read, J.L. Sussman (Eds.), *Evolving Methods for Macromolecular Crystallography*, Springer, 2007, pp. 41–51.
- [50] P. Evans, Scaling and assessment of data quality, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 62 (2006) 72–82.
- [51] A.J. McCoy, R.W. Grosse-Kunstleve, P.D. Adams, M.D. Winn, L.C. Storoni, R.J. Read, Phaser crystallographic software, *J. Appl. Crystallogr.* 40 (2007) 658–674.
- [52] P. Emsley, K. Cowtan, Coot: model-building tools for molecular graphics, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 60 (2004) 2126–2132.
- [53] G.N. Murshudov, A.A. Vagin, E.J. Dodson, Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method, *Acta Crystallogr. D53* (1997) 240–255.
- [54] A.W. Schuttelkopf, D.M.F. van Aalten, PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 60 (2004) 1355–1363.
- [55] V.B. Chen, W.B. Arendall 3rd, J.J. Headd, D.A. Keedy, R.M. Immormino, G.J. Kapral, L.W. Murray, J.S. Richardson, D.C. Richardson, MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 66 (2010) 12–21.
- [56] CCP4, The CCP4 suite: programs for protein crystallography, *Acta Crystallogr. D* 50 (1994) 760–763.
- [57] W.L. DeLano, The PyMol Molecular Visualization System, Sa Carlos, CA, USA, 2002.

Synthesis of novel *N*-acyl- β -D-glucopyranosylamines and ureas as potential lead cytostatic agents

Vanessa Parmenopoulou¹ · Stella Manta¹ · Athina Dimopoulou¹ · Nikolaos Kollatos¹ · Dominique Schols² · Dimitri Komiotis¹

Received: 12 January 2015 / Accepted: 16 February 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract Novel classes of acetylated and fully deprotected *N*-acyl- β -D-glucopyranosylamines and ureas have been synthesized and biologically evaluated. Acylation of the per-*O*-acetylated β -D-glucopyranosylurea (**5**), easily prepared via its corresponding phosphinimine derivative, by zinc chloride catalyzed reaction of the corresponding acyl chlorides RCOCl (**a–f**) gave the protected *N*-acyl- β -D-glucopyranosylureas (**6a–f**), in acceptable-to-moderate yields. Subsequent deacetylation of analogues **6a–f** under Zemplén conditions afforded the fully deprotected derivatives **7a,b,d,e,f**, while the desired urea **7c** was formed after treatment of **6c** with dibutyltin oxide. All protected and unprotected compounds were examined for their cytotoxic activity in different L1210, CEM and HeLa tumor cell lines and were also evaluated against a broad panel of DNA and RNA viruses. Derivative **7c** exhibited cytostatic activity against the three evaluated tumor cell lines (IC₅₀ 9–24 μ M) and might be the basis for the synthesis of structure-related derivatives with improved cytostatic potential. Only analogue **6f** weakly but significantly inhibited the replication of parainfluenza-3 virus, Sindbis virus and Coxsackie virus B4 in cell cultures at concentrations of 45–58 μ M.

Keywords *N*-acyl- β -D-glucopyranosylamines · *N*-acyl- β -D-glucopyranosylureas · Antitumor agents · Cytotoxic activity · Antiviral activity

Introduction

Cancer figures among the major concerns of modern healthcare due to its rapidly increasing rates and associated mortality. In light of the growing prevalence of malignant carcinomas and their implications, equal impetus is being paid by the scientific community to research on the disease (Ferlay *et al.*, 2015). Although significant effort has been made to improve the current preventive and/or therapeutic strategies against carcinogenesis, the development of new selective agents capable of suppressing tumor growth and metastasis would contribute greatly to a better prognosis and current therapy (Sethi and Kang, 2011).

In the beginning of 1990s (Lu *et al.*, 2013), small molecule kinase inhibitors have shown great potential as novel therapeutics for the treatment of cancer (Sausville, 2000) because of their intimate involvement in oncogenic signal transduction pathways that present multiple physiological responses, tumor cell proliferation and cell survival (Blanc *et al.*, 2013). Among them, sorafenib (Nexavar), a diaryl urea analogue, is a small molecular inhibitor of several tyrosine protein kinases for the treatment of advanced renal cell carcinoma (RCC) and advanced hepatocellular carcinoma (HCC) (Wilhelm *et al.*, 2006; Montagut and Settleman, 2009). In the same manner, PAC-1 bearing the *N*-acylhydrazone pharmacophore is promising as a new antitumor drug that can directly influence the apoptotic machinery or suicide of cells and has shown good results in mouse models (Zhang *et al.*, 2012; Peterson *et al.*, 2009; Putt *et al.*, 2006). Finally, carboxamide analogue sunitinib (Sutent) has proven to be successful in the treatment of renal cancer and pancreatic neuroendocrine tumors, while thiazole carboxamide analogue dasatinib is used for the treatment of several types of leukemia (Jänne *et al.*, 2009). Probably, the use of amide,

✉ Dimitri Komiotis
dkom@bio.uth.gr

¹ Laboratory of Bioorganic Chemistry, Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, 26 Ploutonos Str., 41 221 Larissa, Greece

² Department of Microbiology and Immunology, Rega Institute for Medical Research, KU Leuven, Louvain, Belgium

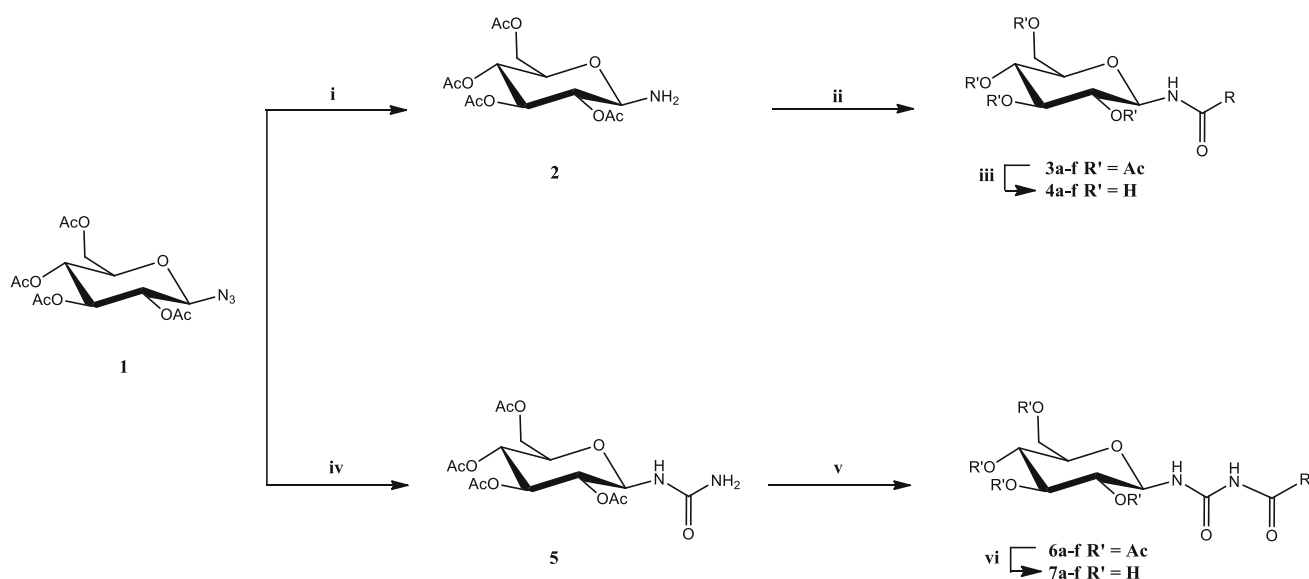
urea or heteroatom linkers such as nitrogen or oxygen in the structure of the aforementioned inhibitors are important features for their selectivity that allow the formation of one or two hydrogen bonds with residues of the specific kinase (Davis *et al.*, 2011).

In view of the above observations and as a continuation of our long-term interest in glucopyranosyl analogues as antitumor/antiviral agents and potent enzyme inhibitors (Parmenopoulou *et al.*, 2014; Dimopoulou *et al.*, 2013; Manta *et al.*, 2012; Kantsadi *et al.*, 2012), it was envisaged that compounds bearing a glucopyranosyl moiety linked with various aralkyl and aralkenyl groups (Somsák *et al.*, 2008a, b) via the pharmacophore linkers NHCO and NHCONHCO would be endowed with pronounced antitumor activity. We hereby report the facile synthesis and biological properties of novel acetylated as well as fully deprotected *N*-acyl- β -D-glucopyranosylamines (**3a–f**, **4a–f**) and ureas (**6a–f**, **7a–f**), respectively.

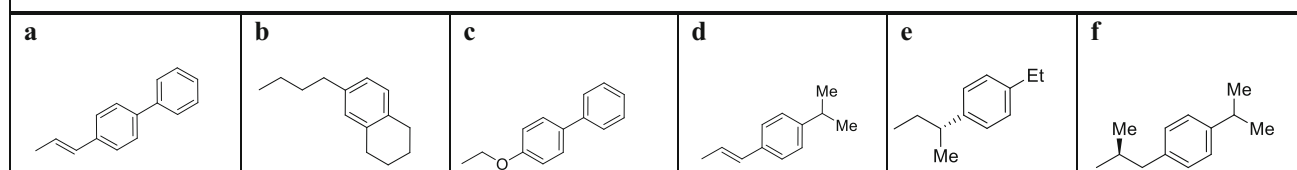
Results and discussion

Chemistry

For the synthesis of the target *N*-acyl-*N'*-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylureas (**6a–f**), the per-*O*-acetylated β -D-glucopyranosylurea (**5**), easily prepared via its corresponding phosphinimine derivative (Pinter *et al.*, 1995), seemed a suitable precursor. Therefore, acylation of compound **5** (Pinter *et al.*, 1995) by zinc chloride (ZnCl₂) catalyzed reaction of the corresponding acyl chlorides RCOCl (**a–f**) gave derivatives **6a–f**, in acceptable-to-moderate yields (35–67%). Although the Lewis acidic zinc chloride not only activates acid chlorides but also catalyze iminium ion formation (Paulsen and Pflufhaupt, 1980; Isbell and Frush, 1958) and, thereby, anomerization (Somsák *et al.*, 2008a, b), in our case, the β -anomers **6a–f** were solely obtained. Their ¹H NMR spectra showed



Ligands (R)



Scheme 1 Reagents and conditions: (i) H₂, 10% Pd/C, EtOAc, 20 °C, 24 h; (ii) DMF, RCOCl, Et₃N, room temperature, 1 h; (iii) ammonia/MeOH or MeOH, methanolic NaOMe (1 M), Amberlyst 15 (H⁺ form), room temperature; (iv) NH₃, CO₂, THF, Ph₃P, 24 h;

(v) CHCl₃, RCOCl, ZnCl₂, reflux; (vi) MeOH, methanolic NaOMe (1 M), Amberlyst 15 (H⁺ form), 0 °C, 20 min or MeOH, Bu₂SnO, reflux, 2 h

Table 1 Cytostatic activity of compounds **3a–f**, **4a–f**, **6a–f** and **7a–f** against murine leukemia (L1210), human lymphocyte (CEM) and human cervix carcinoma (HeLa) cell cultures and primary fibroblasts

Compound	IC ₅₀ (μM)			MCC ^b (μM) HEL
	L1210	CEM	HeLa	
3a	≥250	≥250	≥250	>100
3b	106 ± 6	116 ± 9	118 ± 23	>100
3c	139 ± 8	180 ± 100	≥250	>100
3d	110 ± 6	99 ± 15	124 ± 18	>100
3e	184 ± 2	118 ± 5	≥250	>100
3f	103 ± 1	110 ± 5	64 ± 16	>100
4a	134 ± 1	192 ± 82	84 ± 21	>100
4b	>250	>250	>250	>100
4c	>250	>250	>250	>100
4d	>250	>250	>250	>100
4e	>250	>250	>250	>100
4f	>250	>250	>250	>100
6a	91 ± 15	110 ± 29	100 ± 14	>100
6b	78 ± 0	38 ± 10	66 ± 12	>100
6c	>250	>250	>250	>100
6d	24 ± 0	16 ± 1	44 ± 24	>100
6e	71 ± 16	41 ± 4	88 ± 17	>100
6f	47 ± 8	32 ± 1	39 ± 23	>100
7a	206 ± 44	141 ± 5	>250	>100
7b	>250	>250	>250	>100
7c	9.0 ± 5.9	24 ± 1	19 ± 3	>100
7d	25 ± 2	22 ± 4	45 ± 27	>100
7e	>250	>250	>250	>100
7f	>250	>250	>250	>100
5-Fluorouracil	0.33 ± 0.17	18 ± 5	0.54 ± 0.12	–
6-Mercaptopurine	2.8 ± 1.1	2.8 ± 1.3	1.1 ± 0.1	–

^a 50 % inhibitory concentration or compound concentration required to inhibit cell proliferation by 50 %

^b Minimal cytotoxic concentration or compound concentration required to affect and alter microscopically detectable human lung fibroblast HEL cell morphology

large coupling constants for H-1, H-2, H-3, H-4 and H-5 ($J_{1,2} \geq 9.4$ Hz, $J_{2,3} \geq 8.5$ Hz, $J_{3,4} \geq 8.9$ Hz and $J_{4,5} \geq 9.4$ Hz) arising from the trans-diaxial orientation of these consecutive protons, indicating the β -configuration of the sugar moiety and equatorially oriented acetyl groups.

Subsequent deacetylation of analogues **6a–f** under Zemplén conditions (Agoston *et al.*, 2001) at 0 °C for 20 min afforded the fully deprotected derivatives **7a,b,d,e,f** after flash chromatography, in good yields (72–82 %). Deprotection of acyl urea **6c** either with basic or acidic transesterification conditions (sodium methoxide, methanolic ammonia, methanolic hydrogen chloride) was unsuccessful, due to faster cleavage of the *N*-acyl moiety than removal of the *O*-protecting groups. In order to overcome this difficulty and to successfully synthesize

compound **7c**, we sought to couple the free glucosyl urea (McKay and Nguyen, 2014; Helm and Kakhsy, 1989) with the desired acyl chloride RCOCl (**c**) in the presence of ZnCl₂, but unfortunately only the starting materials were recovered. To our delight, when the acyl urea **6c** was stirred in methanol in the presence of 0.5 eq dibutyltin oxide (Bu₂SnO) at reflux (Liu *et al.*, 2002), the acetyl groups were smoothly deprotected and derivative **7c** was isolated after flash chromatography, in 83 % yield (Scheme 1).

All compounds were well characterized by ¹H and ¹³C NMR, mass spectrometry and elemental analysis and gave satisfactory analytical and spectroscopic data, which were in full accordance with their depicted structure. During the spectroscopic characterization, compound **6f** appeared to

Table 2 Cytotoxicity and antiviral activity of **6f** in Vero cell cultures

Compound	IC ₅₀ ^b (μM)					
	Minimum cytotoxic concentration ^a (μM)	Parainfluenza-3 virus	Reovirus-1	Sindbis virus	Coxsackie virus B4	Punta Toro virus
6f	>100	45	>100	58	58	100
DS-10.000 (μg/mL)	>100	>100	>100	20	100	100
Ribavirin	>250	250	>250	>250	>250	146

^a Required to cause a microscopically detectable alteration of normal cell morphology

^b Required to reduce virus-induced cytopathicity by 50 %

consist of two rotamers, judged from their ¹H NMR spectra, which is probably due to hindered rotation of the amide bond.

Anticancer activity

The cytostatic activity of **3a–f**, **4a–f**, **6a–f** and **7a–f** was determined against murine leukemia (L1210), human lymphocyte (CEM) and human cervix carcinoma (HeLa) cell cultures, and the results are summarized in Table 1.

From the overall results obtained, it was clear that the acetylated *N*-acyl-β-D-glucopyranosylamines (**3b–f**) and ureas (**6a, b, e, f**) showed a better cytostatic profile than their corresponding unprotected derivatives **4b–f** and **7a, b, e, f**, respectively (Table 1). Exceptions were analogues **4a** and **7c**, which proved to be more cytostatic than their corresponding acetylated congeners **3a** and **6c**; in particular derivative **7c** proved to be the most cytotoxic for all three tumor cell lines (IC₅₀ of 9, 24 and 19 μM, respectively). The cytostatic potential of **7c** was only 5- to 15-fold lower than the established 6-mercaptopurine anticancer drug. Finally, the acetylated analogue **6d** and the unprotected **7d** exhibited a comparable degree of cellular cytotoxicity (IC₅₀ of 16–45 μM). Also, the tested compounds were not cytotoxic in normal (primary) confluent human lung fibroblast (HEL) cell cultures (MCC₅₀ > 100 μM).

Broad-spectrum evaluation for potential antiviral activity

Compounds **3a–f**, **4a–f**, **6a–f** and **7a–f** have been evaluated against a broad panel of DNA and RNA viruses, including herpes simplex virus type 1 [HSV-1(KOS)], HSV-2 (G), vaccinia virus and vesicular stomatitis virus (VSV) in HEL cultures; VSV, Coxsackie virus B4 and respiratory syncytial virus (RSV) in HeLa cell cultures; parainfluenza-3 virus, reovirus-1, Sindbis virus, Coxsackie virus B4 and Punta Toro virus in Vero cell cultures; influenza virus A (H1N1, H3N2) and influenza virus B in MDCK cell

cultures, feline corona virus (FIPV) and feline herpes virus in CRFK cell cultures and human immunodeficiency virus (HIV-1III_B and HIV-2ROD) in CEM T cell cultures.

Only the acetylated glucopyranosyl urea **6f** was found to inhibit the proliferation of parainfluenza-3 virus, Sindbis virus and Coxsackie virus B4 in Vero cells at the concentration of 45 and 58 μM (*vide* IC₅₀), respectively, whereas the well-described antiviral drug ribavirin showed no activity at all (≥250 μM). The polyanionic compound dextran sulfate (DS) (mw 10,000) was also included as a control compound (Table 2).

Conclusion

In this study, we report the synthesis of novel acetylated as well as fully deprotected *N*-acyl-β-D-glucopyranosylamines and ureas as potential cytotoxic agents. Since the *N*-acyl-β-D-glucopyranosylureas proved to be more cytostatic than the corresponding amines and the final analogues were less potent than their acetylated congeners, it seems that the cytostatic activity of compounds is associated with the type of the linker, while the acetyl moiety may also contribute to the antitumor effect. Derivative **7c** exhibited the most enhanced cytostatic activity (IC₅₀ of 9, 24 and 19 μM, respectively) and might be the basis for preparing structure-related derivatives with improved cytostatic potential, while analogue **6f** inhibited the proliferation of parainfluenza-3 virus, Sindbis virus and Coxsackie virus B4 in Vero cell cultures at the concentration of 45, 58 and 58 μM (*vide* IC₅₀), respectively, as compared to ribavirin (≥250 μM).

Experimental

Chemistry

Thin layer chromatography (TLC) was performed on Merck precoated 60F254 plates. Reactions were monitored by TLC

on silica gel, with detection by UV light (254 nm) or by charring with sulfuric acid. Flash chromatography was performed using silica gel (240–400 mesh, Merck). ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra were obtained at room temperature with a Bruker 300 spectrometer at 300 and 75.5 MHz, respectively, using chloroform-*d* (CDCl_3) and methanol-*d*₄ (CD_3OD) with internal tetramethylsilane (TMS). The ^1H assignments of compounds **6** were based on ^1H - ^1H COSY experiments executed using standard Varian software. Chemical shifts (δ) were given in ppm measured downfield from TMS, and spin-spin coupling constants are in Hz. Mass spectra were obtained on a ThermoQuest Finnigan AQA Mass Spectrometer (electrospray ionization). Optical rotations were measured using an Autopol I polarimeter.

All reactions sensitive to oxygen or moisture were carried out under nitrogen atmosphere using oven-dried glassware. Chloroform (CHCl_3) was distilled from phosphorus pentoxide and stored over 4E molecular sieves. Methanol (MeOH) was stored over 3E molecular sieves. 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl azide (**1**) (Tropper *et al.*, 1992), 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylamine (**2**), *N*-acyl- β -D-glucopyranosylamines **3a–f** and **4a–f** (Parmenopoulou *et al.*, 2014) and 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylurea (**5**) (Pinter *et al.*, 1995) were prepared according to the procedures described in literature, and their chemical and physical properties were in agreement with previous data.

General procedure for preparation of the *N*-acyl-*N'*-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylureas (**6a–f**)

To a solution of an acyl chloride (18 mmol) in 20 mL of dry CHCl_3 , anhydrous ZnCl_2 (0.59 mmol) and 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylurea (**5**) (2.56 mmol) were added with stirring. The reaction mixture was refluxed until TLC showed the complete transformation of the urea. Then, the reaction mixture was poured into ice water and was extracted with chloroform (2 \times). The organic phases were collected and washed with sat. aq. NaHCO_3 solution and water. After drying, the solvent was evaporated under vacuo and the residue was purified by flash chromatography (*n*-hexane/EtOAc 1:1).

N-(*E*)-3-(Biphenyl-4-yl)acryloyl-*N'*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-urea (**6a**)

White foam, yield 44 %; *R*_f = 0.28 (*n*-hexane/EtOAc 1:1); $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +4$ (*c* = 0.20, CHCl_3); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 9.37 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, NH), 9.10 (s, 1H, NH), 7.86 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz, CH=CH), 7.68–7.38 (m, 9H, ArH), 6.51 (d, 1H, CH=CH), 6.39–5.29 (2pseudo t, 2H, *J* = 9.6, 9.4 Hz, H-1, H-3), 5.17–5.08 (2pseudo t, 2H, *J* = 9.4, 9.5 Hz, H-4, H-2), 4.25 (dd, 1H, *J* = 4.3,

12.5 Hz, H-6a), 4.10 (dd, 1H, *J* = 1.9, 12.5 Hz, H-6b), 3.83 (ddd, 1H, *J* = 2.1, 4.1, 10.0 Hz, H-5), 2.06, 2.05, 2.03, 2.01 (4s, 12H, 4OAc); ^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3) δ 170.6, 170.1, 169.8, 169.4, 166.4, 154.8 (CO), 145.4, 143.7, 139.9, 132.8, 128.9, 128.8, 128.0, 127.7, 127.0, 118.3 (CH=CH and Ar-C), 79.0, 73.6, 73.0, 70.0, 68.2, 61.6 (C-1–C-6), 20.7, 20.6, 20.5 (OCOCH₃); ESI-MS: *m/z*, 597.24 [*M* + *H*]⁺. Anal. calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_{11}$: C, 60.40; H, 5.41; N, 4.70; Found: C, 60.17; H, 5.59; N, 4.83.

N-4-(5,6,7,8-Tetrahydronaphthalen-2-yl)butanoyl-*N'*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-urea (**6b**)

Yellow foam, Yield 38 %; *R*_f = 0.38 (*n*-hexane/EtOAc 1:1); $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +2$ (*c* = 0.20, CHCl_3); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 6.99–6.86 (m, 4H, ArH, NH), 6.13 (d, 1H, *J* = 9.2 Hz, NH), 5.34–5.25 (2pseudo t, 2H, *J* = 9.4, 8.9 Hz, H-1, H-3), 5.06 (t, 1H, *J* = 9.9 Hz, H-4), 4.90 (t, 1H, *J* = 9.6 Hz, H-2), 4.30 (dd, 1H, *J* = 3.8, 12.5 Hz, H-6a), 4.08 (dd, 1H, *J* = 1.1, 12.5 Hz, H-6b), 3.82 (ddd, 1H, *J* = 1.8, 3.8, 10.3 Hz, H-5), 2.73 (m, 4H, tetrahydronaphthalene moiety), 2.60 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, CH₂), 2.38 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, CH₂), 2.07, 2.03, 2.02, 2.01 (4s, 12H, 4OAc), 1.95–1.88 (m, 2H, CH₂), 1.79 (m, 4H, tetrahydronaphthalene moiety); ^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3) δ 173.8, 170.5, 169.9, 169.7, 169.4, 152.9 (CO), 137.7, 137.3, 135.2, 129.3, 129.1, 125.6 (Ar-C), 79.1, 73.7, 73.2, 70.4, 68.4, 61.8 (C-1–C-6), 36.4, 34.4, 29.4, 29.1, 26.0, 23.3, 23.2 (3CH₂ and 4CH₂ of tetrahydronaphthalene moiety), 20.7, 20.5, 20.4 (OCOCH₃); ESI-MS: *m/z*, 591.21 [*M* + *H*]⁺. Anal. calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_{11}$: C, 58.97; H, 6.49; N, 4.74; Found: C, 59.31; H, 6.67; N, 4.53.

N-2-(Biphenyl-4-yloxy)acetyl-*N'*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-urea (**6c**)

Yellow foam, Yield 62 %; *R*_f = 0.32 (*n*-hexane/EtOAc 1:1); $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +16$ (*c* = 0.20, CHCl_3); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 8.92 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, NH), 8.51 (s, 1H, NH), 7.58–7.30 (m, 7H, ArH), 7.00 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz, ArH), 7.35–5.25 (2pseudo t, 2H, *J* = 9.4, 9.2 Hz, H-1, H-3), 5.14–5.06 (2pseudo t, 2H, *J* = 9.7, 9.5 Hz, H-4, H-2), 4.63, 4.58 (q, AB-system, 2H, *J* = 16.3 Hz, CH₂), 4.28 (dd, 1H, *J* = 4.4, 12.5 Hz, H-6a), 4.13 (dd, 1H, *J* = 2.1, 12.5 Hz, H-6b), 3.83 (ddd, 1H, *J* = 2.2, 4.3, 10.1 Hz, H-5), 2.09, 2.04, 2.03, 2.02 (4s, 12H, 4OAc); ^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3) δ 170.7, 170.0, 169.8, 169.5, 169.4, 169.3 (CO), 157.4, 140.6, 134.8, 128.8, 128.4, 128.2, 126.8, 114.9 (Ar-C), 77.9, 75.0, 72.9, 70.1, 68.0, 67.5, 61.4 (CH₂ and C1–C6), 20.7, 20.6, 20.5 (OCOCH₃); ESI-MS: *m/z*, 601.22 [*M* + *H*]⁺. Anal. calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_{12}$: C, 58.00; H, 5.37; N, 4.66; Found: C, 57.88; H, 5.73; N, 5.06.

N-(E)-3-(4-Isopropylphenyl)acryloyl-N'-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-urea (6d)

White foam, Yield 67 %; Rf = 0.36 (*n*-hexane/EtOAc 1:1); $[\alpha]_D^{22} = -4$ ($c = 0.20$, CHCl₃); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 9.32 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, NH), 8.59 (s, 1H, NH), 7.80 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, CH=CH), 7.47 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, ArH cumenyl), 7.28 (d, 2H, $J = 10.1$ Hz, ArH cumenyl), 6.39 (d, 1H, CH=CH), 5.37–5.27 (2pseudo t, 2H, $J = 9.4$, 9.8 Hz, H-1, H-3), 5.15–5.08 (2pseudo t, 2H, $J = 9.4$, 9.6 Hz, H-4, H-2), 4.26 (dd, 1H, $J = 4.4$, 12.4 Hz, H-6a), 4.15–4.08 (dd, 1H, $J = 1.6$, 12.4 Hz, H-6b), 3.83 (ddd, 1H, $J = 2.1$, 4.1, 10.0 Hz, H-5), 2.99–2.90 (m, 1H, CH₃–CH–CH₃), 2.05, 2.03 (2s, 12H, 4OAc), 1.27 (d, 6H, $J = 6.9$ Hz, CH₃–CH–CH₃); ¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ 170.7, 170.1, 169.9, 169.4, 166.3, 154.4 (CO), 152.5, 146.1, 131.4, 128.5, 127.2, 117.3 (CH=CH and Ar–C), 79.0, 73.6, 73.0, 70.1, 68.1, 61.6 (C-1–C-6), 34.2, 23.7 (CH₃–CH–CH₃), 20.7, 20.6, 20.5 (OCOCH₃); ESI-MS: m/z , 563.21 [M + H]⁺. Anal. calcd for C₂₇H₃₄N₂O₁₁: C, 57.64; H, 6.09; N, 4.98; Found: C, 57.46; H, 6.34; N, 5.29.

N-(R)-3-(4-Ethylphenyl)butanoyl-N'-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-urea (6e)

Yellow foam, Yield 44 %; Rf = 0.28 (*n*-hexane/EtOAc 1:1); $[\alpha]_D^{22} = -10$ ($c = 0.20$, CHCl₃); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 9.05 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, NH), 8.28 (s, 1H, NH), 7.19–7.11 (m, 4H, ArH), 5.31–5.16 (2pseudo t, 2H, $J = 9.4$, 9.2 Hz, H-1, H-3), 5.12–5.02 (2pseudo t, 2H, $J = 9.5$, 10.0 Hz, H-4, H-2), 4.25 (dd, 1H, $J = 4.3$, 12.4 Hz, H-6a), 4.11 (dd, 1H, $J = 2.0$, 12.4 Hz, H-6b), 3.80 (ddd, 1H, $J = 2.1$, 4.0, 10.7 Hz, H-5), 3.35–3.22 (m, 1H, CH), 3.69–3.54 (m, 4H, CH₂, CH₂CH₃), 2.07, 2.02, 2.01, 1.98 (4s, 12H, 4OAc), 1.34 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz, CH₃), 1.20 (t, 3H, $J = 7.6$ Hz, CH₂CH₃); ¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ 175.9, 172.3, 171.5, 170.1, 169.8, 154.4 (CO), 142.5, 142.4, 128.7, 126.6 (Ar–C), 77.9, 73.3, 72.4, 70.7, 68.2, 61.6 (C-1–C-6), 45.5, 42.3, 36.0 (CH and 2CH₂), 27.7, 21.0, 20.8, 20.7, 15.1 (OCOCH₃, CHCH₃, CH₂CH₃); ESI-MS: m/z , 565.20 [M + H]⁺. Anal. calcd for C₂₇H₃₆N₂O₁₁: C, 57.44; H, 6.43; N, 4.96; Found: C, 57.34; H, 6.72; N, 4.57.

N-(S)-3-(4-Isopropylphenyl)-2-methylpropanoyl-N'-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-urea (6f)

Yellow foam, Yield 35 %; Rf = 0.33 (*n*-hexane/EtOAc 1:1); $[\alpha]_D^{22} = +4$ ($c = 0.20$, CHCl₃); The ¹H NMR spectrum showed hindered rotation around the amide bond. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 9.11 (t, 1H, $J = 10.1$ Hz, NH), 8.10 (2br s, 1H, NH), 7.17–7.05 (m, 4H, ArH cumenyl), 5.32–5.18 (2pseudo t, 2H, $J = 9.4$, 9.1 Hz, H-1,

H-3), 5.12–5.03 (2pseudo t, 2H, $J = 9.4$, 8.5 Hz, H-4, H-2), 4.26 (dd, 1H, $J = 4.3$, 12.5 Hz, H-6a), 4.09 (dd, 1H, $J = 1.6$, 12.5 Hz, H-6b), 3.77 (ddd, 1H, $J = 2.0$, 4.0, 10.1 Hz, H-5), 3.05–2.83 (m, 2H, CH₂), 2.69–2.58 (m, 2H, CH, CH₃–CH–CH₃), 2.08, 2.07, 2.02, 2.01 (4s, 12H, 4OAc), 1.24, 1.23 (2d, 6H, $J = 6.9$ Hz, CH₃–CH–CH₃), 1.19 (2d, 3H, $J = 6.5$ Hz, CH₃); ¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ 177.2, 170.5, 170.0, 169.5, 169.3, 153.8 (CO), 147.4, 135.8, 128.8, 126.7 (Ar–C), 79.1, 73.8, 73.2, 70.4, 68.4, 61.8 (C-1–C-6), 43.9, 39.1, 33.7 (2CH and CH₂), 23.9, 20.6, 20.5, 20.4, 16.8 (CH₃–CH–CH₃, OCOCH₃, CHCH₃); ESI-MS: m/z , 579.25 [M + H]⁺. Anal. calcd for C₂₈H₃₈N₂O₁₁: C, 58.12; H, 6.62; N, 4.84; Found: C, 58.26; H, 6.35; N, 4.72.

General procedure for the preparation of the N-acyl-N'-β-D-glucopyranosylureas 7a,b,d,e,f

The protected ureas **6a,b,d,e,f** (0.18 mmol) were dissolved in dry MeOH (1 mL), 1–2 drops of 1 M methanolic sodium methoxide (NaOMe) solution were added and the reaction mixture was kept at 0 °C until completion of the transformation (20 min, TLC, EtOAc/MeOH 4:1). Amberlyst 15 (H⁺ form) was then added to remove sodium ions, the resin was filtered off, the solvent was removed and the residue was purified by flash chromatography (EtOAc/MeOH 4:1) to afford pure **7a,b,d,e,f**.

N-(E)-3-(Biphenyl-4-yl)acryloyl-N'-(β-D-glucopyranosyl)-urea (7a)

White syrup, Yield 72 %; Rf = 0.22 (EtOAc/MeOH 4:1); $[\alpha]_D^{22} = +2$ ($c = 0.20$, MeOH); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 7.83 (d, 1H, $J = 15.7$ Hz, CH=CH), 7.71–7.65 (m, 6H, ArH), 7.51–7.36 (m, 3H, ArH), 6.76 (d, 1H, CH=CH), 4.98 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz, H-1), 3.88 (dd, 1H, $J = 1.5$, 11.8 Hz, H-6b), 3.71 (dd, 1H, $J = 4.4$, 11.8 Hz, H-6a), 3.50–3.37 (m, 4H, H-2–H-5); ¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD) δ 168.8, 156.3 (CO), 145.6, 144.9, 141.4, 134.7, 130.0, 129.9, 129.0, 128.6, 128.0, 120.2 (CH=CH and Ar–C), 82.2, 79.8, 79.1, 74.6, 71.6, 62.9 (C-1–C-6); ESI-MS: m/z , 429.17 [M + H]⁺. Anal. calcd for C₂₂H₂₄N₂O₇: C, 61.67; H, 5.65; N, 6.54; Found: C, 61.39; H, 5.48; N, 6.65.

N-4-(5,6,7,8-Tetrahydronaphthalen-2-yl)butanoyl-N'-(β-D-glucopyranosyl)-urea (7b)

Yellow syrup, Yield 82 %; Rf = 0.25 (EtOAc/MeOH 4:1); $[\alpha]_D^{22} = +22$ ($c = 0.20$, MeOH); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 6.94–6.85 (m, 3H, ArH), 4.90 (d, 1H,

$J = 9.0$ Hz, H-1), 3.83 (dd, 1H, $J = 1.3$, 11.8 Hz, H-6b), 3.66 (dd, 1H, $J = 4.4$, 11.8 Hz, H-6a), 3.44–3.35 and 3.28–3.22 (2 m, 4H, H-2–H-5), 2.71 (m, 4H, tetrahydronaphthalene moiety), 2.56 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, CH₂), 2.33 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz, CH₂), 1.95–1.85 (m, 2H, CH₂), 1.78 (m, 4H, tetrahydronaphthalene moiety); ¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD) δ 177.2, 156.0 (CO), 139.7, 138.1, 135.8, 130.1, 126.7 (Ar-C), 82.1, 79.8, 79.1, 74.5, 71.6, 62.9 (C-1–C-6), 36.8, 35.6, 30.4, 30.1, 27.7, 24.6, 24.5 (3CH₂ and 4CH₂ of tetrahydronaphthalene moiety); ESI-MS: m/z , 423.18 [M + H]⁺. Anal. calcd for C₂₁H₃₀N₂O₇: C, 59.70; H, 7.16; N, 6.63; Found: C, 59.85; H, 7.01; N, 6.49.

N-2-(Biphenyl-4-yloxy)acetyl-*N'*-(β -D-glucopyranosyl)-urea (**7c**)

The protected derivative **6c** (1 mmol) was heated under reflux in dry MeOH (4 mL) containing Bu₂SnO (0.5 mmol) for 2 h and the fully deprotected compound **7c** was obtained as a yellow syrup after flash chromatography using EtOAc/MeOH 4:1 as eluting solvents. Yield 83 %; $R_f = 0.18$ (EtOAc/MeOH 4:1); $[\alpha]_D^{22} = -8$ ($c = 0.20$, MeOH); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 7.59–7.56 (m, 4H, ArH), 7.40, 7.28 (2t, 3H, $J = 7.6$ Hz, ArH), 7.10 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, ArH), 5.04 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz, H-1), 4.63, 4.60 (q, AB-system, 2H, $J = 15.0$ Hz, CH₂), 3.84 (dd, 1H, $J = 1.3$, 11.8 Hz, H-6b), 3.68 (dd, 1H, $J = 4.4$, 11.8 Hz, H-6a), 3.46–3.36 (m, 4H, H-2–H-5); ¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD) δ 172.1, 158.7 (CO), 141.9, 136.2, 129.8, 129.2, 127.9, 127.6, 116.3 (Ar-C), 80.9, 79.5, 79.0, 73.9, 71.3, 68.4, 62.6 (C1–C6, CH₂); ESI-MS: m/z , 433.18 [M + H]⁺. Anal. calcd for C₂₁H₂₄N₂O₈: C, 58.33; H, 5.59; N, 6.48; Found: C, 58.67; H, 5.32; N, 6.23.

N-(*E*)-3-(4-Isopropylphenyl)acryloyl-*N'*-(β -D-glucopyranosyl)-urea (**7d**)

White syrup, Yield 76 %; $R_f = 0.29$ (EtOAc/MeOH 4:1); $[\alpha]_D^{22} = +20$ ($c = 0.20$, MeOH); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 7.74 (d, 1H, $J = 15.7$ Hz, CH=CH), 7.53, 7.29 (2d, 4H, $J = 8.2$ Hz ArH cumenyl), 6.64 (d, 1H, CH=CH), 4.94 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, H-1), 3.85 (dd, 1H, $J = 1.8$, 11.6 Hz, H-6b), 3.67 (dd, 1H, $J = 4.4$, 11.6 Hz, H-6a), 3.46–3.34 (m, 4H, H-2–H-5), 2.97–2.88 (m, 1H, CH), 1.25 (d, 6H, $J = 6.9$ Hz, CH₃–CH–CH₃); ¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD) δ 168.9, 156.4 (CO), 153.5, 146.2, 133.4, 129.6, 128.2, 119.3 (CH=CH and Ar-C), 82.2, 79.8, 79.1, 74.6, 71.6, 62.9 (C-1–C-6), 35.4, 24.1 (CH₃–CH–CH₃); ESI-MS: m/z , 395.20 [M + H]⁺. Anal. calcd for C₁₉H₂₆N₂O₇: C, 57.86; H, 6.64; N, 7.10; Found: C, 57.69; H, 6.29; N, 7.23.

N-(*R*)-3-(4-Ethylphenyl)butanoyl-*N'*-(β -D-glucopyranosyl)-urea (**7e**)

Yellow syrup, Yield 74 %; $R_f = 0.37$ (EtOAc/MeOH 4:1); $[\alpha]_D^{22} = +20$ ($c = 0.20$, MeOH); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 7.13–7.09 (m, 4H, ArH), 4.88 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, H-1), 3.83 (dd, 1H, $J = 4.5$, 11.8 Hz, H-6a), 3.70–3.62 (m, 1H, H-6b), 3.42–3.34 and 3.26–3.19 (2 m, 4H, H-2–H-5), 2.64–2.53 (m, 5H, CH, CH₂, CH₂CH₃), 1.29–1.24 (m, 6H, CHCH₃, CH₂CH₃); ¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD) δ 176.0, 155.9 (CO), 145.7, 143.7, 129.0, 127.8 (Ar-C), 82.1, 79.8, 79.0, 74.5, 71.5, 62.8 (C-1–C-6), 45.9, 37.2, 29.4 (CH and 2CH₂), 22.3, 16.1 (CHCH₃, CH₂CH₃); ESI-MS: m/z , 397.16 [M + H]⁺. Anal. calcd for C₁₉H₂₈N₂O₇: C, 57.56; H, 7.12; N, 7.07; Found: C, 57.73; H, 6.86; N, 6.70.

N-(*S*)-3-(4-Isopropylphenyl)-2-methylpropanoyl-*N'*-(β -D-glucopyranosyl)-urea (**7f**)

Yellow syrup, Yield 72 %; $R_f = 0.35$ (EtOAc/MeOH 4:1); $[\alpha]_D^{22} = +36$ ($c = 0.20$, MeOH); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 7.15–7.08 (m, 4H, ArH cumenyl), 4.90 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, H-1), 3.84 (m, 1H, H-6b), 3.68 (dd, 1H, $J = 4.3$, 12.0 Hz, H-6a), 3.46–3.35 (m, 4H, H-2–H-5), 3.00–2.83 and 2.81–2.57 (2 m, 4H, CH₂, CH, CH₃–CH–CH₃), 1.22 (d, 6H, $J = 6.9$ Hz, CH₃–CH–CH₃), 1.14 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz, CH₃); ¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD) δ 180.3, 156.1 (CO), 148.2, 137.8, 130.0, 127.5 (Ar-C), 82.0, 79.8, 79.0, 74.4, 71.3, 62.7 (C-1–C-6), 44.4, 40.0, 35.1 (2CH and CH₂), 24.5, 17.8 (CH₃–CH–CH₃, CHCH₃); ESI-MS: m/z , 411.19 [M + H]⁺. Anal. calcd for C₂₀H₃₀N₂O₇: C, 58.52; H, 7.37; N, 6.82; Found: C, 58.33; H, 7.63; N, 6.42.

Antiviral activity assays (Kokosza et al., 2013; Novikov et al., 2013)

The antiviral assays, other than the anti-HIV assays, were based on the inhibition of virus-induced cytopathicity or plaque formation in HEL [herpes simplex virus type 1 (HSV-1) (KOS), HSV-2 (G), vaccinia virus, vesicular stomatitis virus, human cytomegalovirus (HCMV), and varicella-zoster virus (VZV)], Vero (parainfluenza-3, reovirus-1, Sindbis virus, and Coxsackie B4), HeLa (vesicular stomatitis virus, Coxsackie virus B4, and respiratory syncytial virus) or MDCK [influenza A (H1N1; H3N2) and influenza B] cell cultures. The confluent cell cultures (or nearly confluent for MDCK cells) in microtiter 96-well plates were inoculated with 100 CCID₅₀ of virus (1 CCID₅₀ being the virus dose to infect 50 % of the cell cultures) or with 20 plaque-forming units (PFU) (for VZV) in the

presence of varying concentrations (100, 20, etc., μM) of the test compounds. The viral cytopathicity was recorded as soon as it reached completion in the control virus-infected cell cultures that were not treated with the test compounds. The antiviral activity was expressed as the EC_{50} or the compound concentration required to reduce virus-induced cytopathogenicity or viral plaque (VZV) plaque formation by 50 %. The minimal cytotoxic concentration (MCC) of the compounds was defined as the compound concentration that caused a microscopically visible alteration of cell morphology. Alternatively, the cytostatic activity of the test compounds was measured based on the inhibition of cell growth. HEL cells were seeded at a rate of 5×10^3 cells/well into 96-well microtiter plates and allowed to proliferate for 24 h. Then, the medium containing different concentrations of the test compounds was added. After three days of incubation at 37 °C, the cell number was determined with a Coulter counter. The cytostatic concentration was calculated as the CC_{50} , or the compound concentration required to reduce cell proliferation by 50 % relative to the number of cells in the untreated controls. The methodology of the anti-HIV assays was as follows: human CEM ($\sim 3 \times 10^5$ cells/ cm^3) cells were infected with 100 CCID_{50} of HIV-1_{IIIB} or HIV-2_{ROD} and seeded in 200- μL wells of a microtiter plate containing appropriate dilutions of the test compounds. After 4 days of incubation at 37 °C, the HIV-induced CEM giant cell formation was examined light microscopically.

Antiproliferative assays (Kokosza *et al.*, 2013; Novikov *et al.*, 2013)

The cytostatic effects of the test compounds on murine leukemia cells (L1210), human T-lymphocyte cells (CEM), and human cervix carcinoma cells (HeLa) were evaluated as follows: an appropriate number of cells suspended in growth medium were allowed to proliferate in 200- μL wells of 96-well microtiter plates in the presence of variable amounts of test compounds at 37 °C in a humidified CO_2 -controlled atmosphere. After 48 h (L1210), 72 h (CEM) or 96 h (HeLa), the number of cells was determined in a Coulter counter. The IC_{50} value was defined as the compound concentration required to inhibit cell proliferation by 50 %.

Cytotoxic activity assay (Kokosza *et al.*, 2013; Novikov *et al.*, 2013)

Confluent human lung fibroblast (HEL) cultures in 96-well microtiter plate were exposed to serial dilutions of the test

compounds (i.e., 100, 20, 4, 0.8 μM). After 3 days of incubation at 37 °C, microscopical detectable alterations of cell morphology were examined.

Acknowledgments This work was supported in part by the Postgraduate Programmes “Biotechnology-Quality assessment in Nutrition and the Environment,” “Application of Molecular Biology-Molecular Genetics-Molecular Markers,” Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, and the KU Leuven (GOA 10/14). We thank Lizette van Berckelaer, Leen Ingels, Leentje Persoons and Frieda De Meyer for excellent technical assistance in the evaluation of these compounds in the cellular assays.

References

- Agoston K, Dobó A, Rákó J, Kerékgyártó J, Szirmai Z (2001) Anomalous Zemplén deacylation reactions of alpha- and beta-D-mannopyranoside derivatives. *Carbohydr Res* 330:183–190
- Blanc J, Geney R, Menet C (2013) Type II kinase inhibitors: an opportunity in cancer for rational design. *Anti-Cancer Agents Med Chem* 13:731–747
- Davis MI, Hunt JP, Herrgard S, Ciceri P, Wodicka LM, Pallares G, Hocker M, Treiber DK, Zarrinkar PP (2011) Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol* 29:1046–1051
- Dimopoulou A, Manta S, Kiritsis C, Gkaragkouni DN, Papatotiriou I, Balzarini J, Komiotis D (2013) Rapid microwave-enhanced synthesis of C5-alkynyl pyranonucleosides as novel cytotoxic antitumor agents. *Bioorg Med Chem Lett* 23:1330–1333
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136:E359–E386
- Helm RF, Kakhsy JJ (1989) Carbohydrate-urea-phenol-based adhesives: transient formation of mono- and di-D-glucosylurea. *Carbohydr Res* 189:103–112
- Isbell HS, Frush HL (1958) Mutarotation, hydrolysis, and rearrangement reactions of glycosylamines. *J Org Chem* 23:1309–1319
- Jänne PA, Gray N, Settleman J (2009) Factors underlying sensitivity of cancers to small-molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 8:709–723
- Kantsadi AL, Manta S, Psarra AM, Dimopoulou A, Kiritsis C, Parmenopoulou V, Skamnaki VT, Zoumpoulakis P, Zographos SE, Leonidas DD, Komiotis D (2012) The binding of C5-alkynyl and alkylfuran[2,3-*d*]pyrimidine glucopyranonucleosides to glycogen phosphorylase b: synthesis, biochemical and biological assessment. *Eur J Med Chem* 54:740–749
- Kokosza K, Balzarini J, Piotrowska DG (2013) Design, synthesis, antiviral and cytostatic evaluation of novel isoxazolidine nucleotide analogues with a carbamoyl linker. *Bioorg Med Chem* 21:1097–1108
- Liu HM, Yan X, Li W, Huang C (2002) A mild and selective method for cleavage of *O*-acetyl groups with dibutyltin oxide. *Carbohydr Res* 337:1763–1767
- Lu CS, Tang K, Li Y, Jin B, Yin DL, Ma C, Chen XG, Huang HH (2013) Synthesis and in vitro antitumor activities of novel benzyl urea analogues of sorafenib. *Yao Xue Xue Bao* 48:709–717
- Manta S, Parmenopoulou V, Kiritsis C, Dimopoulou A, Kollatos N, Papatotiriou I, Balzarini J, Komiotis D (2012) Stereocontrolled facile synthesis and biological evaluation of (3′S) and (3′R)-3′-amino (and Azido)-3′-deoxy pyranonucleosides. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 31:522–535

- McKay MJ, Nguyen HM (2014) Recent developments in glycosyl urea synthesis. *Carbohydr Res* 385:18–44
- Montagut C, Settleman J (2009) Targeting the RAF–MEK–ERK pathway in cancer therapy. *Cancer Lett* 283:125–134
- Novikov MS, Babkov DA, Paramonova MP, Khandazhinskaya AL, Ozerov AA, Chizhov AO, Andrei G, Snoeck R, Balzarini J, Seley-Radtke KL (2013) Synthesis and anti-HCMV activity of 1- $[\omega$ -(phenoxy)-alkyl]uracil derivatives and analogues thereof. *Bioorg Med Chem* 21:4151–4157
- Parmenopoulou V, Kantsadi AL, Tsirkone VG, Chatzileontiadou DS, Manta S, Zographos SE, Molfeta C, Archontis G, Agius L, Hayes JM, Leonidas DD, Komiotis D (2014) Structure based inhibitor design targeting glycogen phosphorylase b. Virtual screening, synthesis, biochemical and biological assessment of novel *N*-acyl- β -D-glucopyranosylamines. *Bioorg Med Chem* 22:4810–4825
- Paulsen H, Pflufhaupt KW (1980) The carbohydrates: chemistry and biochemistry. In: Pigman W, Horton D (eds) 2. Academic Press, New York, pp 881–927
- Peterson QP, Hsu DC, Goode DR, Novotny CJ, Totten RK, Hergenrother PJ (2009) Procaspase-3 activation as an anticancer strategy: structure-activity relationship of procaspase-activating compound 1 (PAC-1) and its cellular co-localization with caspase-3. *J Med Chem* 52:5721–5731
- Pinter I, Kovacs J, Toth G (1995) Synthesis of sugar ureas via phosphinimines. *Carbohydr Res* 273:99–108
- Putt KS, Chen GW, Pearson JM, Sandhorst JS, Hoagland MS, Kwon JJ, Hwang SK, Jin H, Churchwell MI, Cho MH, Doerge DR, Helferich WG, Hergenrother PJ (2006) Small-molecule activation of procaspase-3 to caspase-3 as a personalized anticancer strategy. *Nat Chem Biol* 2:543–550
- Sausville EA (2000) Protein kinase antagonists: interim challenges and issues. *Anticancer Drug Des* 15:1–2
- Sethi N, Kang Y (2011) Unravelling the complexity of metastasis—molecular understanding and targeted therapies. *Nat Rev Cancer* 11:735–748
- Somsák L, Felföldi N, Kónya B, Hüse C, Telepó K, Bokor E, Czifrák K (2008a) Assessment of synthetic methods for the preparation of *N*-beta-D-glucopyranosyl-*N'*-substituted ureas, -thioureas and related compounds. *Carbohydr Res* 343:2083–2093
- Somsák L, Czifrák K, Tóth M, Bokor E, Chrysina ED, Alexacou KM, Hayes JM, Tiraidis C, Lazoura E, Leonidas DD, Zographos SE, Oikonomakos NG (2008b) New inhibitors of glycogen phosphorylase as potential antidiabetic agents. *Curr Med Chem* 15:2933–2983
- Tropper FD, Andersson FO, Braun S, Roy R (1992) Phase transfer catalysis as a general and stereoselective entry into glycosyl azides from glycosyl halides. *Synthesis* 7:618–620
- Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA, Schwartz B, Simantov R, Kelley S (2006) Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 5:835–844
- Zhang B, Zhao Y, Zhai X, Wang L, Yang J, Tan Z, Gong P (2012) Design, synthesis and anticancer activities of diaryl urea derivatives bearing *N*-acylhydrazone moiety. *Chem Pharm Bull* 60:1046–1054