

Politechnika Gdańska
Wydział Chemiczny
Katedra Chemii Organicznej

Rozprawa doktorska

**SYNTEZA I BADANIA BIOLOGICZNE ANALOGÓW KWASU
MYKOFENOLOWEGO Z POCHODNYMI AMINO-AKRYDINY/AKRYDONU
JAKO POTENCJALNYCH ZWIĄZKÓW IMMUNOSUPRESYJNYCH
STOSOWANYCH PO PRZESZCZEPACH NARZĄDOWYCH**

Mgr inż. Magdalena Małachowska-Ugarte

Promotorzy: dr hab. inż. K. Dzierzbicka, prof. nadzw. PG
dr hab. med. P. Trzonkowski, prof. nadzw. GUMED

Gdańsk 2012

Składam serdeczne podziękowania

Moim Promotorom:

Pani Prof. Krystynie Dzierzbickiej i

Panu Prof. Piotrowi Trzonkowskiemu

*za opiekę naukową oraz nieocenioną pomoc przy
powstawaniu tej pracy,*

Dr Grzegorzowi Cholewińskiemu

za kilkuletnią współpracę i wszelką udzieloną mi pomoc,

Pani mgr Anicie Dobyszek

za pomoc laboratoryjną oraz wielką życzliwość,

Natali Salewskiej

za pomoc laboratoryjną,

pozalaboratoryjną oraz przyjaźń,

Tacie

za nieustające wsparcie,

Mężowi

za cierpliwość, zrozumienie i

pomoc podczas realizacji tej pracy.

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	8
STRESZCZENIE	11
1. WSTĘP	13
2. CZĘŚĆ LITERATUROWA	15
2.1. Kwas mykofenolowy (MPA) – struktura chemiczna i właściwości biologiczne.....	15
2.2. Cel molekularny kwasu mykofenolowego – IMPDH (E.C. 1.1.1.205)	16
2.2.1. Kinetyka reakcji enzymatycznej	17
2.2.2. Inhibitory IMPDH [12, 17-18, 25-27].....	18
2.2.2.1. Inhibitory wiążące się w miejscu IMP [27-36]	19
2.2.2.2. Inhibitory blokujące miejsce wiązania kofaktora NAD ⁺ /NADH [19, 37-50].....	19
2.3. Mechanizm działania kwasu mykofenolowego [20, 51-52]	21
2.4. Właściwości biologiczne kwasu mykofenolowego.....	22
2.4.1. Efekty biologiczne MPA powodowane inhibicją IMPDH.....	22
2.4.2. Mechanizm nekrotyczny działania MPA [67]	23
2.4.3. Zastosowanie MPA w medycynie	24
2.4.4. Proleki zawierające MPA jako substancję aktywną.....	24
2.4.4.1. Mykofenolan mofetylu (CellCept, Roche, MMF)	25
2.4.4.2. Mykofenolan sodu (Myfortic, Novartis, EC-MPS) [88-91].....	26
2.4.5. Metabolizm <i>in vivo</i> MPA, MMF i MPS.....	26
2.5. Metody syntezy kwasu mykofenolowego [98-109]	27
2.5.1. Synteza MPA wg Bircha i Wrighta [98]	28
2.5.2. Synteza MPA wg Canonica i in. [99].....	29
2.5.3. Synteza MPA wg Danheiser i in. [100].....	30
2.5.4. Synteza MPA wg Covarrubias-Zúñiga i in. [101, 102].....	31
2.5.5. Synteza MPA wg R.A. de la Cruz i in. [103].....	32
2.5.6. Synteza MPA wg Ple i in. [104].....	32
2.5.7. Synteza MPA wg Pattersona [106]	33
2.6. Biosynteza kwasu mykofenolowego [112-120].....	35
2.7. Pochodne kwasu mykofenolowego [121-138].....	36
2.7.1. Pochodne modyfikowane w pierścieniu aromatycznym lub laktonowym [129]	37
2.7.1.1. Pochodne modyfikowane w pierścieniu aromatycznym [129]	37

2.7.1.2. Pochodne modyfikowane w pierścieniu laktonowym [129-131].....	38
2.7.2. Monocykliczne fenole i niefenole oraz monocykliczne aminy [129]	39
2.7.2.1. Pochodne typu fenoli [129]	39
2.7.2.2. Pochodne typu niefenoli i monocyklicznych amin [129].....	40
2.7.3. Pochodne MPA modyfikowane w łańcuchu bocznym [19, 31, 37, 42, 133-136]	40
2.8. Akrydyny – struktura i aktywność biologiczna [139-147].....	43
2.8.1. Nitroakrydyny - zależność SAR.....	43
3. CEL I ZAKRES PRACY	45
4. WYNIKI I WNIOSKI	47
4.1. Prace syntetyczne	47
4.1.1. Synteza kwasu mykofenolowego [106]	47
4.1.2. Synteza 9-(ω -alkiloamino)-1-nitroakrydyn [139, 160-164, 168].....	51
4.1.3. Synteza 1-(ω -aminoalkilo)-4-nitro-9(<i>10H</i>)akrydonów.....	57
4.1.4. Synteza analogów MPA z pochodnymi amino-akrydyny/akrydonu.....	60
4.2. Badania biologiczne	63
4.2.1. Oznaczanie aktywności antyproliferacyjnej badanych związków 91a-e, 92a-e, 93a-e, 94a-e, 1 metodą inkorporacji TdR-3H	64
4.2.1.1. Oznaczanie aktywności antyproliferacyjnej badanych związków 91a-e, 92a-e, 93a-e, 94a-e, 1 metodą inkorporacji TdR-3H wobec linii komórkowych (Jukrat, Molt-4, CCRF-CEM, HL-60, Yac-1).....	64
4.2.1.2. Oznaczanie aktywności antyproliferacyjnej badanych związków 91a-e, 92a-e, 93a-e, 94a-e, 1 metodą inkorporacji tymidyny znakowanej trytem (TdR-3H) wobec aktywowanych limfocytów	69
4.2.2. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej badanych związków 91a-e, 92a-e, 93a-e, 94a-e, 1 metodą MTT.....	72
4.2.2.1. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej badanych związków 91a-e, 92a-e, 93a-e, 94a-e, 1 wobec linii komórkowych i PBMC metodą MTT	75
4.2.2.2. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej mieszanin badanych związków 91a-e, 92a-e, 93a-e, 94a-e, 1 metodą MTT	80
4.2.3. Selekcja analogów MPA o najkorzystniejszych parametrach.....	81
4.2.4. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej badanych związków 91a-e, 92a-e, 1 w obecności GMP	84

5. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	86
5.1. Synteza kwasu mykofenolowego (MPA).....	86
5.1.1. Synteza 4-metoksy-2-(prop-2-enyloksy)benzoesanu metylu	86
5.1.2. Synteza <i>N,N</i> -dietylo-4-metoksy-2-(prop-2-enyloksy)benzamidu	87
5.1.3. Synteza <i>N,N</i> -dietylo-2-hydroksy-4-metoksy-3-(prop-2-enyl)benzamidu	88
5.1.4. Synteza <i>N,N</i> -dietylo-5-bromo-2-hydroksy-4-metoksy-3-(prop-2-enyl)benzamidu	89
5.1.5. Synteza <i>N,N</i> -dietylo-5-bromo-2-[(<i>tert</i> -butylodimetylosililo)-oksy]-4-metoksy-3-(prop-2-enyl)benzamidu	89
5.1.6. Synteza <i>N,N</i> -dietylo-5-metylo-2-[(<i>tert</i> -butylodimetylosililo)-oksy]-4-metoksy-3-(prop-3-enyl)benzamidu	90
5.1.7. Synteza <i>N,N</i> -dietylo-5-metylo-2-[(<i>tert</i> -butylodimetylosililo)-oksy]-6-formylo-4-metoksy-5-metylo-3-(prop-2-enyl)benzamidu	90
5.1.8. Synteza <i>N,N</i> -dietylo-2-[(<i>tert</i> -butylodimetylosililo)-oksy]-6-(hydroksymetylo)-4-metoksy-5-metylo-3-(prop-2-enyl)benzamidu	91
5.1.9. Synteza 1,3-dihydro-4-[(<i>tert</i> -butylodimetylosililo)-oksy]-6-metoksy-7-metylo-3-okso-5-(prop-2-enyl)izobenzofuranu	91
5.1.10. Synteza 1,3-dihydro-4-[(<i>tert</i> -butylodimetylosililo)-oksy]-6-metoksy-7-metylo-3-okso-5-(prop-2,3-epoksy) izobenzofuranu	92
5.1.11. Synteza [4-(<i>tert</i> -butyldimetylosililo)-oksy]-6-metoksy-7-metylo-3-okso-1,3-dihydrobenzofuran-5-yl]-acetaldehydu	93
5.1.12. Synteza 6-(2-hydroksy-3-metylbut-3-ynyl)-5-metoksy-7-(2- <i>tert</i> -butylodimetylosililo)-oksy]-4-metylo-3 <i>H</i> -izobenzofuran-2-onu	93
5.1.13. Synteza estru etylowego kwasu 6-[1,3-dihydro-4(<i>tert</i> -butyldimetylosililo)-oksy-6-metoksy-7-metylo-3-okso-5-izobenzofuranylo]-4-metylo-heks-4-enowego	94
5.1.14. Synteza estru etylowego kwasu 6-(1,3-dihydro-4-hydroksy)-6-metoksy-7-metylo-3-okso-5-izobenzofuranylo]-4-metylo-heks-4-enowego	94
5.1.15. Synteza kwasu 6-(4-hydroksy-6-metoksy-7-metylo-3-okso-1,3-dihydroizobenzofuran)-4-metylo-heks-4-enowego	94
5.2. Synteza pochodnym amino-akrydyny/akrydonu	95
5.2.1. Synteza soli potasowej kwasu <i>o</i> -chlorobenzoesowego	95
5.2.2. Synteza kwasu <i>N</i> -(3'-nitrofenylo)antranilowego	95
5.2.2.1. Przygotowanie katalizatora do reakcji Ullmanna	96
5.2.3. Synteza 9-chloro-1-nitroakrydyny i 9-fenoksy-1-nitroakrydyny	96
5.2.4. Synteza 9-(ω -aminoalkilo)amino-1-nitroakrydyny	97

5.2.4.1. Synteza 9-(ω -aminoetylo)amino-1-nitroakrydyny - procedura A	97
5.2.4.2. Synteza 9-(ω -aminopropylo)amino-1-nitroakrydyny - procedura A	97
5.2.4.3. Synteza 9-(ω -aminobutylo)amino-1-nitroakrydyny - procedura A	98
5.2.4.4. Synteza 9-(ω -aminopentylo)amino-1-nitroakrydyny - procedura A	98
5.2.4.5. Synteza 9-(ω -aminoheksylo)amino-1-nitroakrydyny - procedura A	98
5.2.4.6. Synteza <i>mono</i> -Boc-etylenodiaminy	99
5.2.4.7. Synteza <i>mono</i> -Boc-propylenodiaminy	99
5.2.4.8. Synteza <i>mono</i> -Boc-butylodiaminy	99
5.2.4.9. Synteza <i>mono</i> -Boc-pentylodiaminy	100
5.2.4.10. Synteza <i>mono</i> -Boc-heksylodiaminy	100
5.2.4.11. Synteza 9-(ω -aminoetylo)amino-1-nitroakrydyny - procedura B	100
5.2.4.12. Synteza 9-(ω -aminopropylo)amino-1-nitroakrydyny - procedura B	100
5.2.4.13. Synteza 9-(ω -aminobutylo)amino-1-nitroakrydyny - procedura B	101
5.2.4.14. Synteza 9-(ω -aminopentylo)amino-1-nitroakrydyny - procedura B	101
5.2.4.15. Synteza 9-(ω -aminoheksylo)amino-1-nitroakrydyny - procedura B	101
5.2.5. Synteza kwasu <i>N</i> -(3'-nitro-5'-chlorofenylo)antranilowego	102
5.2.6. Synteza 1-chloro-4-nitro-9(<u>10H</u>)-akrydonu	102
5.2.7. Synteza 1-(ω -aminoalkilo)amino-4-nitro-9(<u>10H</u>)	102
5.2.7.1. Synteza 1-(ω -aminoetylo)amino-4-nitro-9(<u>10H</u>)akrydonu	102
5.2.7.2. Synteza 1-(ω -aminopropylo)amino-4-nitro-9(<u>10H</u>)akrydonu	103
5.2.7.3. Synteza 1-(ω -aminobutylo)amino-4-nitro-9(<u>10H</u>)akrydonu	103
5.2.7.4. Synteza 1-(ω -aminopentylo)amino-4-nitro-9(<u>10H</u>)akrydonu	104
5.2.7.5. Synteza 1-(ω -aminoheksylo)amino-4-nitro-9(<u>10H</u>)akrydonu	104
5.3. Synteza analogów MPA z pochodnymi amino-akrydyny/akrydonu	105
5.3.1. Synteza analogów MPA z pochodnymi amino-akrydyny	105
5.3.1.1. Synteza amidu 9-(ω -aminoetylo)amino-1-nitroakrydynowego MPA	105
5.3.1.2. Synteza amidu 9-(ω -aminopropylo)amino-1-nitroakrydynowego MPA	105
5.3.1.3. Synteza amidu 9-(ω -aminobutylo)amino-1-nitroakrydynowego MPA	106
5.3.1.4. Synteza amidu 9-(ω -aminopentylo)amino-1-nitroakrydynowego MPA	107
5.3.1.5. Synteza amidu 9-(ω -aminoheksylo)amino-1-nitroakrydynowego MPA	107
5.3.2. Synteza analogów MPA z pochodnymi amino-akrydonu	108
5.3.2.1. Synteza amidu 9-(ω -aminoetylo)amino-4-nitro-9(<u>10H</u>)akrydonu MPA	108
5.3.2.2. Synteza amidu 9-(ω -aminopropylo)amino-4-nitro-9(<u>10H</u>)akrydonu MPA	108

5.3.2.3. Synteza amidu 9-(ω -aminobutylo)amino-4-nitro-9(10H)akrydonu MPA	109
5.3.2.4. Synteza amidu 9-(ω -aminopentylo)amino-4-nitro-9(10H)akrydonu MPA	110
5.3.2.5. Synteza amidu 9-(ω -aminoheksylo)amino-4-nitro-9(10H)akrydonu MPA.....	110
5.4. Materiały stosowane podczas badań biologicznych.....	111
5.4.1. Linie komórkowe	111
5.4.1.1. Pasażowanie linii komórkowych – hodowle zawieszinowe (CCRF-CEM, HL-60, Jurkat, Molt-4, L-1210, Yac-1)	112
5.4.1.2. Pasażowanie linii komórkowych – hodowle komórek przylegających (HeLa S3, HT-29).....	112
5.4.1.3. Mrożenie komórek pochodzących z linii komórkowych	112
5.4.2. Uzyskiwanie mononuklearnych komórek krwi obwodowej (PBMC)	113
5.4.2.1. Rozdzielanie limfocytów krwi obwodowej (PBL) od monocytów.....	113
5.5. Metody stosowane w pracy	114
5.5.1. Test inkorporacji TdR-3H (linie komórkowe CCRF-CEM, HL-60, Yac-1 Jurkat, Molt-4, komórki PBMC).....	114
5.5.2. Test kolorymetryczny MTT	115
6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI KOŃCOWE	116
7. SUMMARY	121
8. DOROBEK NAUKOWY	123
9. LITERATURA	126
ANEKS 1 - TABELE STATYSTYCZNE	143
ANEKS 2 – WIDMA 2D NMR	149

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AcCoA	- acetylokoenzym A
AML	- ostra białaczka szpikowa (ang. acute myeloid leukemia)
AMP	- adenozyno-5'-monofosforan
ATG	- globulina antytymocytna (ang. antithymocyte globulin)
AUC	- pole pod krzywą $C = f(t)$; (ang. area under the curve)
AZA	- azatiopryna
Boc	- grupa <i>tert</i> -butoksykarbonylowa
BrdU	- 5-bromo-2-deoksyurydyna
BTMA	- dichlorojodan benzylotrimetyloamoniowy
CCA	- kwas α -cyjano-4-hydroksycynamonowy
cDNA	- komplementarny DNA
$(\text{CH}_3)_3\text{Al}$	- trimetyloaluminium
CHCl_3	- chloroform
CML	- przewlekła białaczka szpikowa (ang. chronic myelogenous leukemia)
CML-BC	- przełom blastyczny w CML
CPM	- liczba zliczeń na minutę (ang. counts per minute)
DCC	- dicykloheksylokarbodiimid
DCM	- dichlorometan
DHB	- kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy
DMAD	- acetylenodikarboksylan dimetylu
DMA	- dimetylacetamid
DMF	- <i>N,N</i> -dimetyloformamid
DPPA	- azydek difenylofosforanowy
EDCI	- chlorowodorek <i>N</i> -etylo- <i>N'</i> -(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu
EEDQ	- <i>N</i> -etoksykarbonylo-2-etoksy-1,2-dihydrochinolina
EICAR	- 5-etynyl-1- β -D-rybofuranozylimidazol-4-karboksamid
Et_3N	- trietyloamina
Et_2NH	- dietyloamina
Fas	- receptor liganda Fas
FasL	- ligand dla Fas
FBS	- płodowa surowica wołowa (ang. fetal bovine serum)

FDA	- amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (ang. Food and Drug Administration)
GDP	- guanozyno-5'-difosforan
GMP	- guanozyno-5'-monofosforan
GTP	- guanozyno-5'-trifosforan
HCV	- wirus zapalenia wątroby typu C (ang. Hepatitis C virus)
HDAC	- deacetylaza histonowa
IMP	- monofosforan inozyny
<i>i</i> -PrOH	- izopropanol
IMPDH	- dehydrogenaza inozyno-5'-monofosforanu
K _m	- stała Michaelisa
<i>m</i> -CPBA	- kwas <i>m</i> -chloronadbenzoesowy
MMF	- mykofenolan mofetylu
MPA	- kwas mykofenolowy
MPS	- mykofenolan sodu
mTOR	- inhibitory sygnału proliferacji (ang. mammalian target of rapamycin)
MTT	- bromek 3-(4,5-dimetylo-2-ilo)-2,5-difenylotetrazolu
NaBH ₄	- borowodorek sodu
NAD ⁺ /NADH	- dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy, forma utleniona/zredukowana
<i>n</i> -Bu ₄ NF	- fluorek czterobutyloamoniowy
<i>n</i> -BuLi	- <i>n</i> -butylolit
NEAA	- aminokwasy nie niezbędne (ang. nonessential amino acids)
NMR	- spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. Nuclear Magnetic Resonance)
NOX2	- oksydaza NADPH
PBMC	- komórki jednojądrowe krwi obwodowej (ang. peripheral blood mononuclear cells)
Piv	- piwaloil
POCl ₃	- tlenochlorek fosforu
PP _i	- reszta kwasu ortofosforowego
PPE	- estry kwasu polifosforowego
PRPP	- fosforybozylpirofosforan
RSV	- wirus RSV (ang. Respiratory Syncytial Virus)
SAD	- dinukleotyd selenazol-4-karboksyamidowo-adeninowy

SPE	- ekstrakcja do fazy stałej (ang. solid phase extraction)
TAD	- dinukleotyd tiazol-4-karboksyamidowo-adeninowy
TBS	- <i>tert</i> -butylo(dimetylo)silil
TdR-3H	- metyl-[³ H]-tymidyna
temp. pok.	- temperatura pokojowa
TFA	- kwas trifluorooctowy
THF	- tetrahydrofuran
TMEDA	- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametylethylenodiamina
TNF- α	- czynnik nekrozy nowotworów
T.t.	- temperatura topnienia
Wyd.	- wydajność
XMP	- monofosforan ksantyny
XTT	- sól sodowa 2,3-bis(2-metoksy-4-nitro-5-sulfofenylo)-2H-tetrazolio-5-karboksyanilidu
zVAD-fmk	- benzyloksykarbonylo-Val-Ala-Asp(OCH ₃)-fluorometyloketon, inhibitor kaspaz

STRESZCZENIE

Kwas mykofenolowy (MPA) jest powszechnie stosowany w medycynie jako lek immunosupresyjny w terapii podtrzymującej u pacjentów po przeszczepach narządów (nerka, wątroba, serce) oraz w epizodach ostrego odrzucania przeszczepu. MPA w terapii w używany jest w postaci proleków - estru 2-morfolinoetylowego (mykofenolan mofetylu, Cellcept®, Roche) oraz mykofenolanu sodu (Myfortic®, Novartis). Związek ten znajduje również zastosowanie w leczeniu chorób autoimmunologicznych. Kwas mykofenolowy był testowany w różnych typach nowotworów, jednak bez powodzenia. Gwałtowny metabolizm MPA do nieaktywnego 7-*O*-glukuronidu ogranicza jego skuteczność terapeutyczną - wymusza stosowanie wysokich dawek leku, co powoduje szereg efektów ubocznych w terapii. Dotychczas otrzymano wiele analogów MPA w nadziei na otrzymanie związków o ulepszonych właściwościach farmakologicznych i mniejszej podatności na glukuronidację *in vivo*. W tematykę poszukiwań bardziej aktywnych i selektywnych pochodnych MPA wpisuje się moja praca doktorska.

Zakres badań obejmował syntezę i testy aktywności biologicznej nowych analogów kwasu mykofenolowego (MPA) z pochodnymi amino-akrydyny/akrydonu **91a-e**, **92a-e** jako potencjalnych związków immunosupresyjnych.

Prace syntetyczne obejmowały otrzymanie kwasu mykofenolowego, pochodnych amino-akrydyny/akrydonu oraz koniugatów tych związków. MPA otrzymałam metodą zaproponowaną przez Pattersona, wprowadzając modyfikację niektórych etapów. Pochodne amino-akrydyny/akrydonu zsyntezowałam wykorzystując reakcję Ullmanna kwasu *o*-chlorobenzoesowego i *m*-nitroaniliny lub 3-amino-4nitro-chlorobenzenu w obecności pyłu miedzi jako katalizatora, cyklizacji i kondensacji z odpowiednimi dichlorowodorkami diamin alifatycznych. W celu wytworzenia wiązania amidowego pomiędzy MPA i pochodnymi amino-akrydyny/akrydonu przetestowałam kilka metod i wybrałam najbardziej selektywną i generującą produkty z najlepszymi wydajnościami. W przypadku pochodnych akrydyny jako odczynnik kondensujący wybrałam DPPA/Et₃N, a dla pochodnych akrydonu EDCI/HOBt.

Testy biologiczne obejmowały badanie aktywności antyproliferacyjnej metodą inkorporacji metyl-[³H]-tymidyny oraz ocenę żywotności komórek za pomocą testu MTT. Do wstępnych badań wyselekcjonowałam kilka linii komórkowych białaczek (Jurkat, Molt-4, CCRF-CEM, HL-60, Yac-1, L-1210). Testy te miały na celu sprawdzenie, czy otrzymane przeze mnie nowe analogi MPA **91a-e**, **92a-e** zachowują aktywność charakterystyczną dla związków natywnych w warunkach zestandaryzowanych.

Analogi MPA zawierające pochodne amino-akrydyny wykazywały aktywność wobec wszystkich testowanych komórek, a wartości EC_{50} zależały od wrażliwości danej linii.

Analogi MPA z pochodnymi amino-akrydonu były mniej aktywne w porównaniu do związków natywnych lub całkowicie pozbawionych aktywności wobec linii komórkowych.

Następnie wykonałam badania analogów MPA na komórkach docelowych dla związków immunosupresyjnych - PBMC. Testy potwierdziły, że badane związki **91a-e**, **92a-e** wykazują aktywność antyproliferacyjną i potencjalnie mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu immunosupresyjnym. Analogi MPA zawierające pochodne amino-akrydyny również silnie hamowały namnażanie ludzkich limfocytów, niezależnie od liczby atomów węgla w łączniku. Koniugaty kwasu mykofenolowego z pochodnymi amino-akrydonu również wykazywały aktywność biologiczną, jednak słabszą. Efektem badań *in vitro* było wyselekcjonowanie związków **91b-c** oraz **92a** do badań *in vivo*.

1. WSTĘP

Jedną z dziedzin medycyny rozwijającą się szczególnie szybko w ostatnich 40 latach jest transplantologia. Wzrasta zapotrzebowanie na ten sposób leczenia, zwłaszcza u chorych ze schyłkową niewydolnością serca, nerek, wątroby i układu oddechowego.

Według danych Europejskiej Agencji Leków rocznie w Europie notuje się około 15000 przeszczepów nerki, 5000 wątroby, 700 trzustki, 2000 serca i 900 płuc [1]. Powodzenie transplantacji narządu zależy od wielu czynników, między innymi od odpowiednio dobranego leczenia immunosupresyjnego.

Terapia immunosupresyjna jest niezbędna od chwili przeszczepienia narządu do ustania jego funkcji. Leczenie stosuje się w celu zahamowania odpowiedzi immunologicznej, zmniejszenia częstości epizodów ostrego odrzucania i wydłużenia przeżywalności po przeszczepie. Z drugiej strony, na ile to możliwe, istotne jest zapobieganie komplikacjom związanym z indukowanym niedoborem odporności. Najczęściej występującymi problemami podczas stosowania leków immunosupresyjnych są: zwiększona zapadalność na infekcje wirusowe, bakteryjne i grzybicze oraz ryzyko nowotworzenia. Standardowe farmakologiczne leczenie immunosupresyjne opiera się na równoczesnym podawaniu kilku immunosupresantów. Zazwyczaj łączy się leki o różnych mechanizmach działania. Stosowane schematy leczenia zależą od wielu czynników, między innymi od: rodzaju przeszczepianego narządu, stopnia ryzyka immunologicznego, nasilenia objawów ubocznych czy towarzyszących chorób [2]. Obecnie stosowane drobnocząsteczkowe leki immunosupresyjne można podzielić na pięć grup: inhibitory kalcyneuryny (cyklosporyna A, takrolimus), antymetabolity i leki antyproliferacyjne (mykofenolan mofetilu, mykofenolan sodu, azatiopryna AZA), inhibitory mTOR (sirolimus, everolimus) i glikokortykosteroidy (prednizon, prednizolon, metyloprednizolon). Ponadto stosuje się przeciwciała poliklonalne i monoklonalne (anty CD25, anty CD52, anty CD50, antyCD3), poliklonalne surowice antylimfocytarne (tymoglobulina, ATG) oraz monoklonalne przeciwciała przeciw receptorowi dla IL-2 (basiliximab i daclizumab) [2].

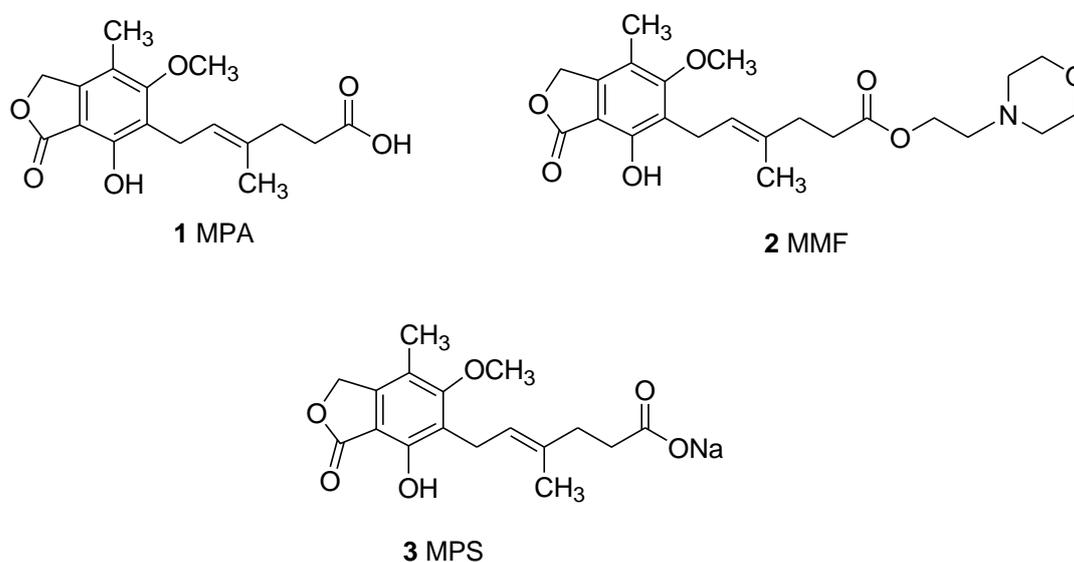
Inhibitory kalcyneuryny są najczęściej stosowanymi lekami immunosupresyjnymi po przeszczepach narządów unaczynionych. Spośród dostępnych leków antyproliferacyjnych dla pacjentów po przeszczepie nerki, serca i wątroby coraz częściej stosowany jest mykofenolan mofetylu (MMF) **2** lub mykofenolan sodu (MPS) **3**, zawierające kwas mykofenolowy (MPA) **1** jako substancję czynną (Rysunek 1).

Standardowo MMF i MPS stosuje się w terapii z inhibitorem kalcyneuryny i glikokortykosteroidami [3]. Badania wykazały wyższą skuteczność MMF w porównaniu do AZA, co spowodowało wyraźny wzrost stosowania proleków kwasu mykofenolowego w praktyce klinicznej. MMF i MPS stosuje się w dużej dawce, wymuszonej przez niekorzystny metabolizm tych leków. Powoduje to wiele efektów ubocznych szczególnie uciążliwych dla pacjentów po przeszczepach narządów, ze względu na konieczność dożywotniego stosowania leków immunosupresyjnych. Z tego powodu stale poszukuje się bardziej aktywnych i selektywnych pochodnych MPA, które zwiększyłyby szanse długoletniego przeżycia pacjentów po przeszczepach i jednocześnie poprawiło ich komfort życia poprzez ograniczenie efektów ubocznych. W niniejszej pracy zaprojektowano, zsyntetyzowano i przeprowadzono badania *in vitro* nowych analogów kwasu mykofenolowego.

2. CZĘŚĆ LITERATUROWA

2.1. Kwas mykofenolowy (MPA) – struktura chemiczna i właściwości biologiczne

Kwas mykofenolowy **1** jest naturalnym metabolitem kilku gatunków pleśni z rodzaju *Penicillium*. MPA został odkryty w 1896 roku przez Gosio [4], a strukturę określili Cluttenbuck i Raistick [5]. Pod względem budowy chemicznej zawiera 6-podstawiony układ ftalidowy. Pierścień aromatyczny podstawiony jest grupami: hydroksylową, metylową, metoksyową, sześciowęglowym łańcuchem bocznym z wiązaniem podwójnym o konfiguracji *trans* oraz wolną grupą karboksylową (Rysunek 1). MPA charakteryzuje się szerokim spektrum aktywności biologicznej, której mechanizm jest oparty o inhibicję biosyntezy puryn *de novo*. Związek ten wykazuje działanie przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwgrzybiczne, przeciwdrobnoustrojowe oraz immunosupresyjne. Posiada również aktywność antynowotworową, jednak niekorzystny metabolizm MPA znacznie ogranicza jego zastosowanie jako chemoterapeutyka.

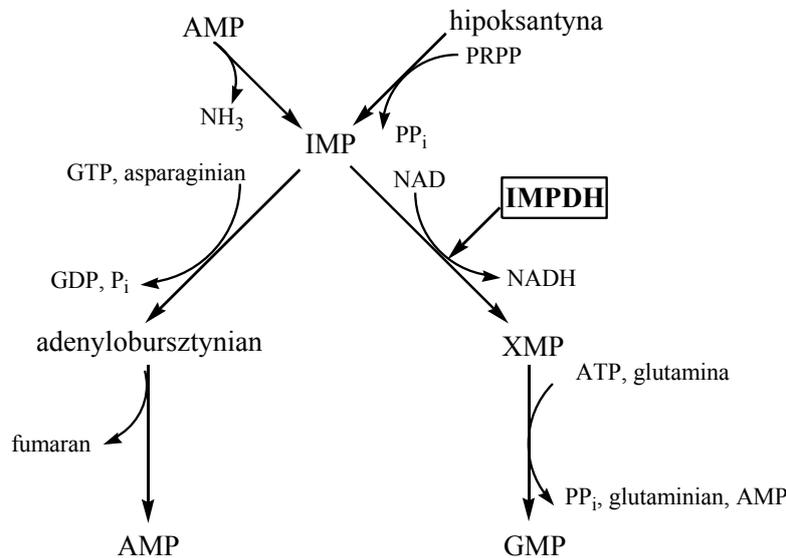


Rysunek 1. Struktura MPA **1**, MMF **2** oraz MPS **3**

2.2. Cel molekularny kwasu mykofenolowego – IMPDH (E.C. 1.1.1.205)

Głównym celem molekularnym kwasu mykofenolowego jest dehydrogenaza inozyno-5'-monofosforanu (IMP-NAD oksydoreduktaza), IMPDH [6]. IMPDH jest kluczowym enzymem w procesie biosyntezy nukleotydów purynowych *de novo* (Schemat 1).

Związki te odgrywają nadrzędną rolę w przemianach energetycznych, przekazywaniu sygnałów między komórkami, przechowywaniu informacji genetycznej czy procesie translacji. Zahamowanie aktywności IMPDH skutkuje zmniejszeniem puli nukleotydów guaninowych, głównie GTP. Ze względu na to, że guanozynotrójfosforan jest kofaktorem dwuetapowej przemiany IMP do AMP, ilość nukleotydów adeninowych również ulega zmniejszeniu (Schemat 1). Skutkuje to zaburzeniami w syntezie DNA i RNA, prowadząc do apoptozy [7].



Schemat 1. Ścieżki biosyntezy nukleotydów purynowych [8]

Dehydrogenaza inozyno-5'-monofosforanu występuje w postaci dwóch izoform – I oraz II, posiadających 84% identycznych sekwencji. Scharakteryzowano dwa różne cDNA, kodujące obie izoformy [9, 10]. Ekspresja IMPDH w komórkach ssaków jest kontrolowana przez białko p53 [11, 12]. Izoforma I (IMPDH I) dominuje w normalnych komórkach, kontrolując takie procesy jak angiogeneza, regulacja translacji czy wiązanie DNA. Izoforma II (IMPDH II) – występuje w komórkach gwałtownie proliferujących – aktywowanych limfocytach [13, 14] i nowotworowych [15, 16]. W komórkach zainfekowanych wirusem, ze względu na zwiększone zapotrzebowanie na nukleotydy purynowe niezbędne do syntezy DNA lub RNA, poziom IMPDH II również drastycznie wzrasta [17].

Ludzka IMPDH I (hIMPDH I) oraz II (hIMPDH II) różnią się od siebie, dlatego powszechnie uważa się, że selektywne hamowanie hIMPDH II powinno skutkować otrzymaniem inhibitorów efektywnych i mniej toksycznych, ograniczając efekty uboczne związane z inhibicją izoformy I [13]. Niedawno wykazano jednak, że wybiórcza inhibicja aktywności izoformy I jest wystarczająca do zatrzymania wzrostu komórek śródbłonna, co skutkowało hamowaniem unaczynienia nowotworu [18]. hIMPDH różni się znacznie od enzymu izolowanego z innych źródeł (bakterie, pasożyty), stwarzając możliwość selektywnej inhibicji. IMPDH drobnoustrojów i pasożytów stanowi atrakcyjny cel leków przeciwdrobnoustrojowych. IMPDH z *Mycobacterium tuberculosis* został zaproponowany jako potencjalny cel leków przeciwko gruźlicy (TB) [19].

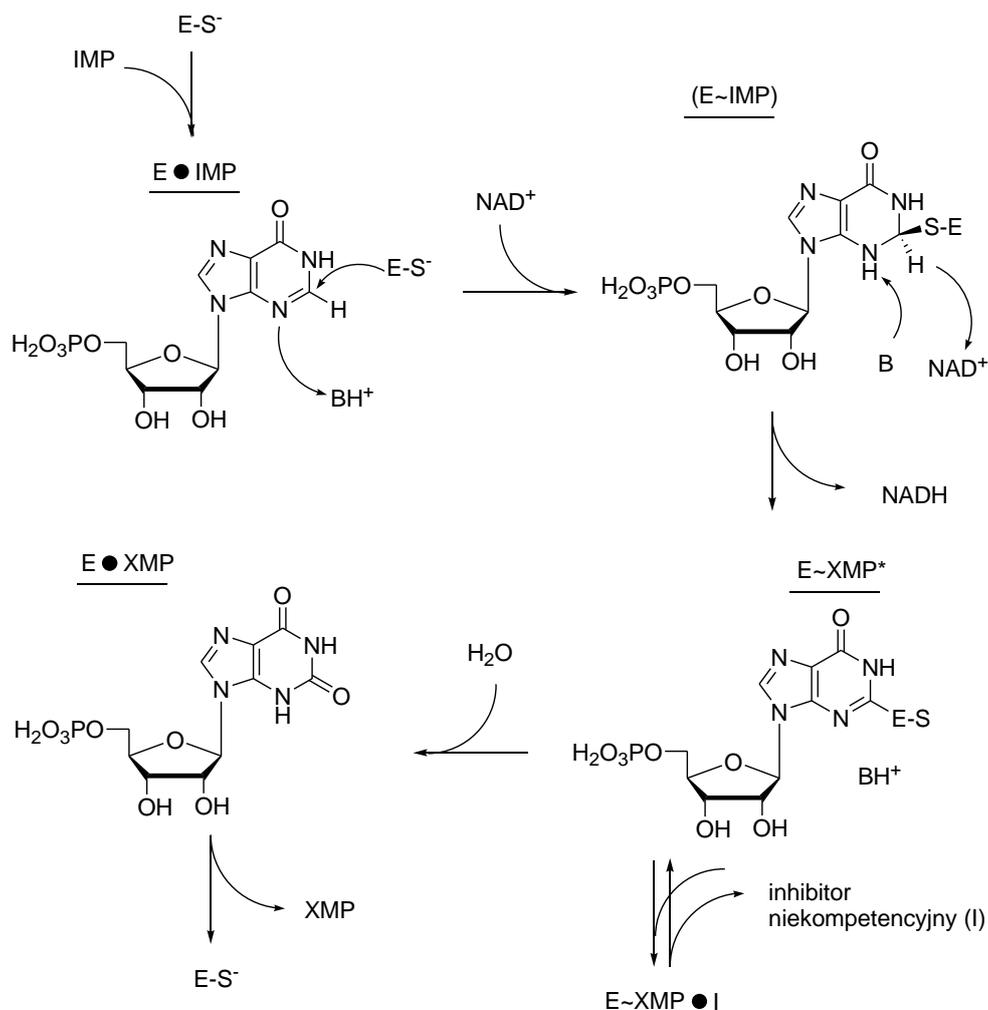
2.2.1. Kinetyka reakcji enzymatycznej

hIMPDH ma strukturę homotetrameru o masie 56 kDa, zawierającego 514 aminokwasów [8, 19-22]. Zrąb stanowi cylinder ok. 40 kDa, gdzie zachodzi reakcja enzymatyczna. IMPDH katalizuje zależną od NAD^+ reakcję utleniania inozyno-5'-monofosforanu (IMP) do ksantyno-5'-monofosforanu (XMP) (Schemat 2) [23]. W następnym etapie XMP ulega katalizowanej przez syntazę GMP przemianie do GMP. Centrum aktywne enzymu posiada miejsce wiązania substratu IMP oraz miejsce wiązania kofaktora NAD^+ . Wartości K_m dla IMP są porównywalne i zbliżone dla różnych organizmów (typowo 10^{-5}M). Jest to spowodowane dużym stopniem zakonserwowania tego obszaru centrum aktywnego enzymu niezależnie od źródła izolacji. Natomiast wartości K_m dla NAD różnią się istotnie [8].

Dehydrogenazy inozyno-5'-monofosforanu wyizolowane z różnych źródeł wykazują ten sam schemat reakcji enzymatycznej. Do osiągnięcia maksymalnej aktywności IMPDH niezbędny jest jednowartościowy kation, zwykle K^+ , Na^+ , NH_4^+ , którego rola wciąż pozostaje niepewna [20]. Kolejność wiązania substratów jest losowa, z niewielką preferencją, że IMP wiąże się jako pierwszy [24]. Przebieg reakcji katalizowanej przez IMPDH różni się istotnie od katalizowanych przez inne dehydrogenazy. Typowo NAD(H) wiąże się do centrum aktywnego na początku reakcji enzymatycznej, natomiast NADH(NAD) oddysocjuje jako ostatni [24]. W przypadku IMPDH w pierwszej kolejności wiązany jest substrat IMP, a produkt XMP odłącza się w ostatnim etapie (Schemat 2). Reakcja katalityczna rozpoczyna się od utworzenia kompleksu aktywnego IMP-enzym.

Następnie tworzy się kowalencyjny addukt, powstaje wiązanie pomiędzy C-2 IMP i atomem siarki Cys331 z centrum aktywnego IMPDH. Przeniesienie atomu wodoru z kompleksu IMP-enzym skutkuje powstaniem intermediatu o charakterze tioimidu (E-*XMP).

Hydroliza E-*XMP jest ostatnim etapem reakcji. Odłączenie XMP, a nie sama reakcja chemiczna, jest etapem limitującym szybkość przemiany enzymatycznej [24].



Schemat 2. Przebieg reakcji enzymatycznej katalizowanej przez IMPDH [20]

2.2.2. Inhibitory IMPDH [12, 17-18, 25-27]

Enzymy szlaku biosyntezy nukleotydów purynowych stanowią atrakcyjny cel dla leków przeciwnowotworowych, immunosupresyjnych, antywirusowych, przeciwbakteryjnych i przeciw pasożytniczych.

IMPDH jako enzym katalizujący kluczowy etap biosyntezy puryn jest szczególnie interesującym obiektem zainteresowania dla nowo projektowanych inhibitorów.

Otrzymano wiele związków hamujących aktywność IMPDH [12, 25-27], ale tylko nieliczne z nich znalazły zastosowanie w medycynie. Inhibitory IMPDH dzieli się na trzy grupy: analogi naturalnych substratów (IMP, NAD) oraz inhibitory allosteryczne [17]. Niekiedy wyróżnia się inhibitory pochodzenia naturalnego i syntetycznego [18].

2.2.2.1. Inhibitory wiążące się w miejscu IMP [27-36]

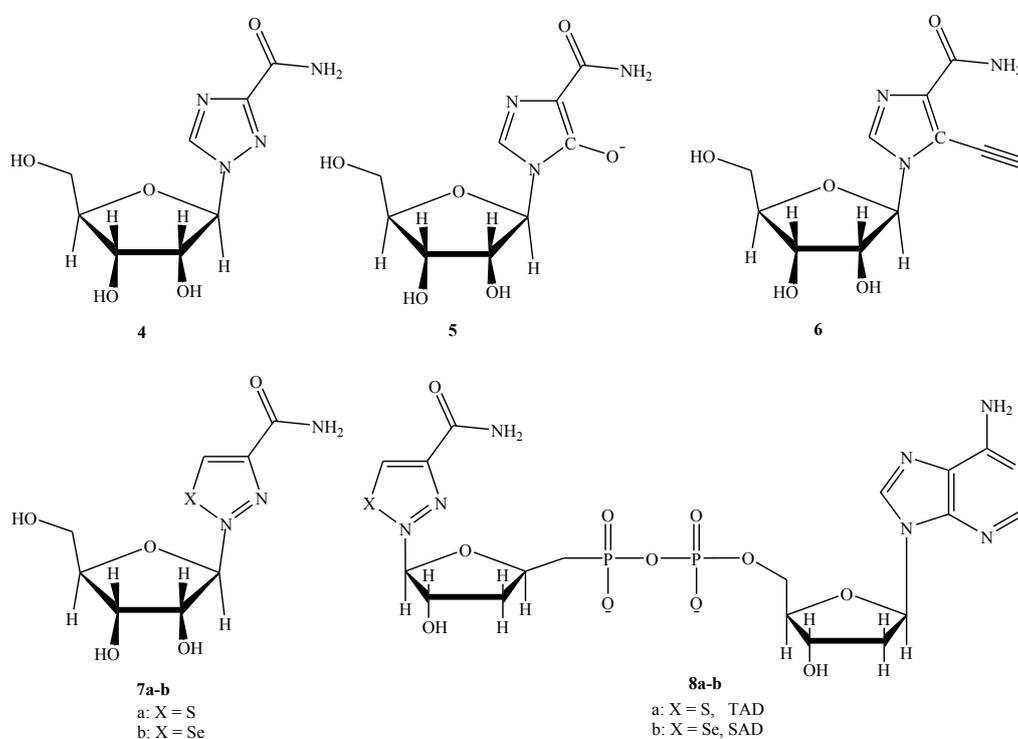
Do tej grupy inhibitorów zalicza się analogi naturalnego substratu – IMP, głównie rybonukleotydy wykazujące specyficzność działania. Związki te zwykle posiadają zdolność kowalencyjnego wiązania się z atomem siarki Cys 331 z centrum aktywnego enzymu [30]. Spośród analogów IMP zastosowanie w medycynie znalazły ribawirin **4** i mizoribine **5** [31] (Rysunek 2). Związki te ulegają *in vivo* fosforylacji do 5'-monofosforanów, tworząc aktywne metabolity [25]. Ribawirin jest zatwierdzonym przez FDA lekiem przeciw wirusowi RSV oraz HCV (w terapii z interferonem) [32-33, 34]. Związek ten wykazuje szerokie spektrum aktywności przeciwwirusowej - postaci 5'-monofosforanu jest inhibitorem IMPDH, natomiast jako trifosforan hamuje aktywność metylotransferazy i polimerazy wirusowego RNA.

Mizoribine (bredinin), silny inhibitor IMPDH, jest zatwierdzony w Japonii w profilaktyce odrzucania przeszczepu, leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów, zespołu nerczycowego, toczenia, zapalenia skórno-mięśniowego i dermatoz autoimmunologicznych [35]. Spośród innych analogów IMP dobrą aktywność inhibicyjną wykazuje EICAR **6** (Rysunek 2), posiadający w swej strukturze grupę etynyłową, łączącą się wiązaniem kowalencyjnym z Cys 331. Związek ten wykazuje aktywność przeciwwirusową, wielokrotnie silniejszą, niż ribawirin [36].

2.2.2.2. Inhibitory blokujące miejsce wiązania kofaktora NAD⁺/NADH [19, 37-50]

Miejsce wiązania NAD⁺ w centrum aktywnym enzymu podzielone jest na trzy części: obszar wiązania nikotynamidu (subdomena N), adenozyiny (subdomena A) i reszty pirofosforanowej (subdomena P) [37]. Analogi kofaktora, zależnie od struktury, mogą wiązać się w dowolnej subdomenie. Do inhibitorów wiążących się w miejscu kofaktora zalicza się głównie analogi TAD (Rysunek 2) i kwas mykofenolowy MPA [19].

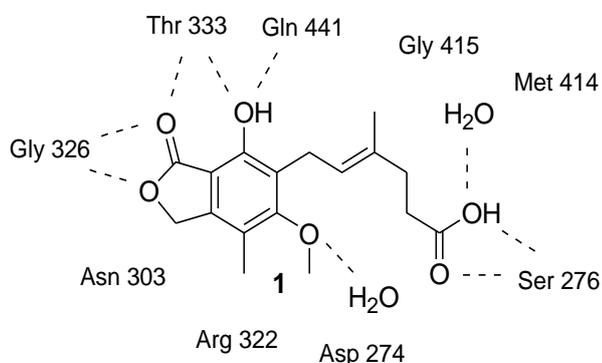
Tiazofurin, (TR, **7a**) wiąże się do wszystkich trzech subdomen i jest w komórkach przekształcany do aktywnego metabolitu (TAD, **8a**). Wykazuje aktywność immunosupresyjną i przeciwwirusową [38]. Udowodniono, że TR wywołuje całkowitą, ale krótkotrwałą remisję hematologiczną u pacjentów z AML, spowodowaną indukowanym przez ten związek różnicowaniem się komórek. Tiazofurin jest lekiem toksycznym, ale stosowanym w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej w fazie przełomu blastycznego (CML-BC) z braku innych alternatyw leczenia (tzw. „lek sierocy”) [31]. Selenowa pochodna tiazofurinu **7b**, w formie aktywnego metabolitu **8b** (SAD), wykazuje działanie przeciw DNA i RNA wirusom silniejsze niż TAD [39-40]. Kilka innych inhibitorów wiążących się do miejsca przeznaczonego dla NAD znajduje się obecnie w I/II fazie badań klinicznych [41]. TR i MPA powodują zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G1/S i indukują różnicowanie komórek w kilku liniach komórkowych, np. K562 i HL60 [42]. Wykazano, że kwas mykofenolowy indukuje różnicowanie komórek w raku prostaty [43, 44], białaczki [45] czerniaka złośliwego [46], piersi [47], nerwiaka płodowego [48, 49] i in. MPA posiada dużą zdolność wywoływania apoptozy/nekrozy i obecnie znajduje się w I fazie badań klinicznych przeciwko szpiczakowi mnogiemu. Kwas mykofenolowy, działając synergistycznie z imatinibem jest stosowany w terapii przewlekłej białaczki szpikowej (CML) [50].



Rysunek 2. Inhibitory IMPDH [25]

2.3. Mechanizm działania kwasu mykofenolowego [20, 51-52]

Kwas mykofenolowy jest silnym, odwracalnym, niekompetencyjnym inhibitorem dehydrogenazy inozyno-5'-monofosforanu (IMPDH) [51]. Wykazuje zdolność hamowania aktywności obu izoform, pięciokrotnie silniejszą w stosunku do izoformy II. Struktura centrum aktywnego enzymu została podana po raz pierwszy z uwzględnieniem przyłączonego do niego MPA [20]. Postuluje się, że kwas mykofenolowy przyłącza się do utworzonego wcześniej kompleksu enzym-IMP-NAD [52]. Na podstawie struktur krystalograficznych wykazano, że MPA wiąże się do subdomeny N i części subdomeny P [20]. Pierścień aromatyczny MPA przyłącza się w miejscu przeznaczonym dla nikotynamidu, a część laktonowa rozciąga się na inną część enzymu (tzw. region PDB1JR1). Łańcuch boczny kwasu mykofenolowego oddziałuje z częścią subdomeny P, tworząc wiązania z Ser 276. Subdomena A pozostaje pusta. Dla kompleksów MPA zawierających XMP struktura pozostaje bez zmian, występują takie same oddziaływania niekowalencyjne [20]. Analiza struktury kompleksu MPA-IMPDH ujawnia wiele oddziaływań pomiędzy tymi związkami (Rysunek 3). Wiązania van der Waalsa występują pomiędzy elementami struktury MPA: sześciowęglowym łańcuchem bocznym, podstawnikiem metylowym, metoksyowym pierścienia aromatycznego, a łańcuchami bocznymi kilku aminokwasów z centrum aktywnego IMPDH (Asp 274, Ser 276, Asn 303, Arg 322, Gln 441). Ponadto obserwuje się wiązania wodorowe, występujące pomiędzy atomami tlenu pierścienia laktonowego MPA, a amidowym wodorem Gly 326 oraz łańcuchem bocznym Thr 333 (Rysunek 3). Grupa fenolowa pierścienia aromatycznego tworzy wiązania wodorowe z Thr 333 oraz Gln 441. Wykazano, że konfiguracja *trans* wiązania podwójnego w łańcuchu bocznym MPA umożliwia tworzenie wiązań wodorowych pomiędzy atomami tlenu grupy karboksylowej MPA a wodorem amidowym oraz grupą hydroksylową Ser 276 [20].



Rysunek. 3. Schemat oddziaływań kwasu mykofenolowego z IMPDH [20]

Działanie MPA jest oparte nie tylko na inhibicji IMPDH. Ostatnie badania wykazały, że kwas mykofenolowy jest inhibitorem NOX2 w komórkach śródbłonna, spowodowane zmniejszeniem puli dostępnych nukleotydów guaninowych [53, 54]. MPA hamuje różnicowanie 3T3-L1 pre-adipocytów w dojrzałe adipocyty.

Efekt ten jest przypisywany inhibicji IMPDH, ale wykazano, że w tym przypadku kwas mykofenolowy działa również jako agonista receptora jednego z proliferatorów peroksysomów (PPAR γ). PPAR γ jest kluczowym receptorem w różnicowaniu adipocytów, jednej z głównych przyczyn rozwoju otyłości [55]. Ponadto prosta pochodna MPA z kwasem hydroksamowym (MAHA) prowadzi do otrzymania związku, będącego jednocześnie inhibitorem IMPDH i deacetylaz histonowych (HDACs) [50, 56]. Wykazano, że MAHA indukuje różnicowanie komórek białaczki K562 silniej, niż MPA [50].

2.4. Właściwości biologiczne kwasu mykofenolowego

2.4.1. Efekty biologiczne MPA powodowane inhibicją IMPDH

Kwas mykofenolowy powoduje zmniejszenie wewnątrzkomórkowych zasobów trifosforanu guanozyny poprzez inhibicję IMPDH. Obniżenie stężenia GTP w limfocytach i monocytach powoduje szereg efektów w komórkach, przede wszystkim zahamowanie ich proliferacji, ale także hamowanie glikozylacji protein błony komórkowej, w tym cząsteczek adhezyjnych (selektyn), grupami glukozy i mannozy. Są one odpowiedzialne za rekrutację limfocytów do źródeł zapalnych lub przy odrzucaniu przeszczepu. MPA hamuje syntezę przeciwciał proporcjonalnie do użytej dawki [57, 58].

Efekt ten został opisany m.in. na modelu szczurzym oraz mysim, gdzie zaobserwowano wydatne zmniejszenie wytwarzania IgG w odpowiedzi na zakażenie wirusem grypy [59]. Wykazano, że MPA hamuje ekspresję CD25, CD71 oraz proliferację limfocytów T [60, 61]. Inne badania potwierdzają inhibicję przez MPA produkcji przeciwciał limfocytów B indukowanych antygenem [62], dojrzewania komórek dendrytycznych DC [63] czy hamowania granulopoezy poprzez inhibicję Il-17 [64]. MPA osłabia produkcję endoteliny-1 (ET-1) indukowaną przez TNF w komórkach śródbłonna aorty, przyczyniając się do spowolnienia procesu powstawania miażdżycy [65, 66].

2.4.2. Mechanizm nekrotyczny działania MPA [67]

Ostatnie doniesienia literaturowe wskazują, że MPA wykazuje odmienny mechanizm działania na komórki niż inne, powszechnie stosowane immunosupresanty (azatiopryna, cyklosporyna A, takrolimus). Kwas mykofenolowy zapoczątkowuje silny i gwałtowny sygnał nekrotyczny, niezależny od obecności kaspaz (nieodwracalny przy użyciu inhibitorów kaspaz np. zVAD-fmk) [67].

Wcześniejsze badania dowodziły, że efekt cytotoksyczny MPA spowodowany jest sygnałem apoptycznym [68-70]. Jednak ostatnie doniesienia przeczą temu stwierdzeniu.

Testy przeprowadzone na liniach komórkowych z limfocytów T i B pokazują, że mechanizm działania MPA jest niezależny od obecności kaspaz, które są objawem sygnału apoptozy [67]. Badania przeprowadzono między innymi na linii komórkowej Jurkat, charakteryzującej się komórkami o dużych jądrach, homogennej cytoplazmie i brakiem wakuoli. Stymulacja przy użyciu FasL prowadziła do drastycznej zmiany w morfologii komórek - nagromadzenia wakuoli i kondensacji chromatyny na peryferiach jądra - zmian charakterystycznych dla komórek apoptycznych (stanowiły 10-30% ogólnej puli komórek). W przypadku nieobecności kaspaz w układzie, komórki ulegały śmierci na skutek procesu autofagii. Większość komórek (70-90%) wykazywała utratę integralności błony komórkowej, obrzęk mitochondriów i brak śladów kondensacji chromatyny. Takie zmiany morfologiczne są typowe dla komórek nekrotycznych.

W celu potwierdzenia mechanizmu nekrotycznego badano kinetykę procesu nekrozy i apoptozy w komórkach poddanych działaniu MPA, mierząc jednocześnie fragmentację DNA (apoptoza) i zmiany morfologiczne (nekroza). Pojawienie się komórek apoptycznych było znacznie opóźnione w stosunku do nekrotycznych. Okres 10-20 godzin wystarcza by wyeliminować 20% komórek na drodze nekrozy, podczas gdy eliminacja takiej samej ilości komórek na drodze apoptozy wymagała wydłużenia czasu inkubacji do 35-55 godzin. Ponieważ nekroza jest często wiązana z wysokim stężeniem użytego związku, wykazano że w przypadku MPA stężenia 0,1-0,4µg/ml wystarczały do eliminacji 20-25% komórek na drodze nekrozy, taka sama ilość komórek eliminowanych na drodze apoptozy wymagała stężenia MPA 14µg/ml [67]. Większość publikowanych prac wskazuje jednak, że MPA wykazuje raczej działanie apoptyczne [71, 72].

2.4.3. Zastosowanie MPA w medycynie

W 1969 roku Planterose dokonał obserwacji, że w przypadku mięsaka mysiego kwas mykofenolowy działa jako immunosupresant [73]. W tym samym roku, Mitsui i Suzuki donieśli, że MPA zmniejsza reakcję immunologiczną u myszy, w odpowiedzi na owcze erythrocyty [74]. Naukowcy już wówczas sugerowali, że „kwas mykofenolowy może być użytecznym lekiem immunosupresyjnym”. Pierwsze badania wskazywały, że MPA tylko nieznacznie hamuje odrzucanie przeszczepu skóry u myszy. Późniejsze testy na szczurach pokazały jednak, że MPA silnie hamuje epizody ostrego i przewlekłego odrzucania przeszczepu serca [75]. Ponadto zauważono, że hamuje on reakcję już zachodzącego odrzucania przeszczepu.

Kwas mykofenolowy, w postaci proleku mykofenolanu mofetylu (MMF), był początkowo stosowany w wyselekcjonowanych przypadkach u pacjentów po przeszczepach nerki. Przeprowadzone na szeroką skalę badania kliniczne potwierdziły efektywność działania MMF [75, 76]. Jednocześnie bardzo korzystny profil skutków ubocznych spowodował, że związek ten stanowi obecnie standardowy lek stosowany u pacjentów po przeszczepach nerki, serca i wątroby [1]. W 1995 roku MMF został zaakceptowany do stosowania przez FDA jako lek immunosupresyjny po przeszczepie nerki, a w roku 1998 serca. W USA i Europie odsetek pacjentów po przeszczepie nerki otrzymujących MMF wynosi 80%, w Polsce 62% i obserwuje się tendencję do coraz częstszego stosowania tego leku. MMF znacznie zmniejsza częstość ostrego i przewlekłego odrzucania przeszczepu nerki, wątroby i serca w porównaniu do AZA [1].

2.4.4. Proleki zawierające MPA jako substancję aktywną - mykofenolan mofetylu (MMF) i mykofenolan sodu (MPS)

Obecnie w terapii immunosupresyjnej stosuje się dwa leki oparte o kwas mykofenolowy jako składnik aktywny - mykofenolan mofetylu (MMF) oraz mykofenolan sodu (EC-MPS). W latach 80 i 90' w Japonii otrzymano inny prolek MPA, początkowo jako potencjalny lek przeciwnowotworowy - mykofenolan etyl-[N-(p-karboksyfenyl)]karbamoilu (CAM) [77]. Z badań przeprowadzonych na szczurach wynika, że związek ten jest bardziej efektywny w wydłużaniu przeżycia po przeszczepie serca niż MMF [78]. Sugeruje się, że CAM może okazać się użyteczny w długoterminowej terapii immunosupresyjnej w zapaleniach centralnego układu nerwowego.

Wstępne badania nad przydatnością CAM jako leku po przeszczepie jelita były obiecujące [79]. Jednak w ostatnich latach brak jest doniesień literaturowych na temat tego związku.

2.4.4.1. Mykofenolan mofetylu (CellCept, Roche, MMF)

Mykofenolan mofetylu jest estrem 2-morfolinoetylowym kwasu mykofenolowego o działaniu cytostatycznym na limfocyty T i B. Związek ten testowany był na modelach zwierzęcych i wykazano, że przedłużał przeżycie po przeszczepie (nerka, serce, wątroba, jelita, wyspy trzustkowe, szpik kostny). MMF hamował epizody ostrego odrzucania przeszczepów (szczury, psy) [80]. Mykofenolan mofetylu jest podawany doustnie lub dożylnie w postaci chlorowodoru (postać dożylna nie jest zarejestrowana w Polsce).

Dobowa zalecana dawka wynosi 1-3 g [3]. Lek podawany doustnie jest gwałtownie hydrolizowany do MPA przez esterazy (głównie transferazę glukuronową) w żołądku, jelicie cienkim, krwi, wątrobie i tkankach. Wpływ na stężenie wolnej formy MPA w krwi i plazmie ma wiele czynników i waha się w szerokich granicach, zależnie od pacjenta. Znaczenie mają: funkcje nerek, stężenie albumin, towarzyszące leki immunosupresyjne, czas po przeszczepie i zróżnicowanie genetyczne [1]. Różnice częściowo tłumaczy się czynnikami farmakokinetycznymi i farmakodynamicznymi. Ostatnio pojawiły się doniesienia na temat wzrostu stężenia wolnej formy MPA w obecności kwasów tłuszczowych i bilirubiny. Może to sugerować, że u pacjentów z hipertrójglicydemią i cholestazą powinno się obserwować wyższe stężenia niezwiązanego kwasu mykofenolowego we krwi [81]. Istotną kwestią jest pomiar stężenia MPA w krwi. Obecnie najbardziej popularną metodą jest oznaczanie AUC_{0-12} [82, 83]. Wymaga to częstego pobierania próbek krwi od pacjenta i dokonywania oznaczeń w krótkim czasie. Próbuje się zoptymalizować tą metodę, np. określając przydatność w praktyce klinicznej pomiarów AUC_{0-2} [84].

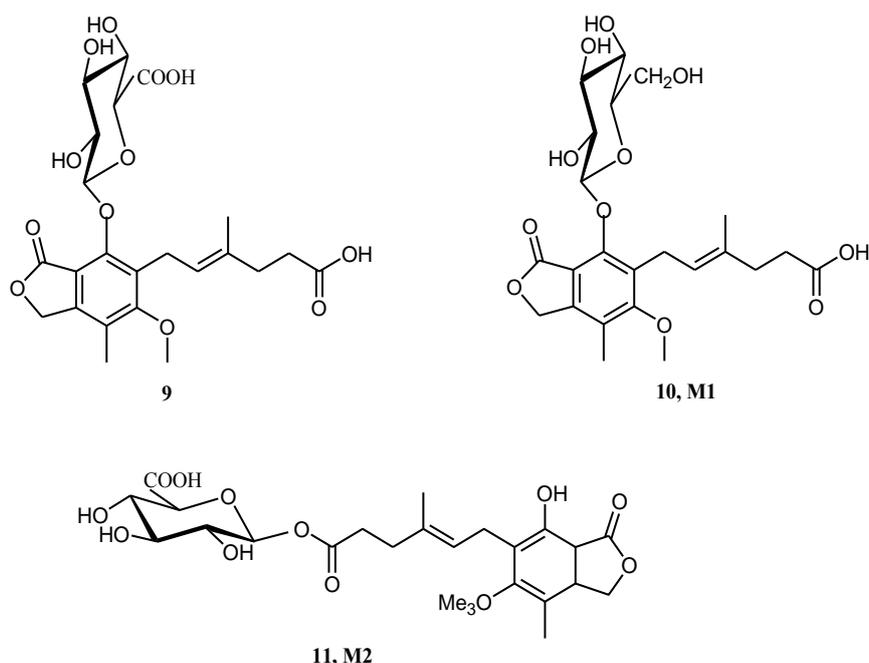
Ostatnio zidentyfikowano cztery geny odpowiedzialne za różnicę w odpowiedzi na leczenie prolekami MPA [85], co może ułatwić zindywidualizowaną terapię. Zdarzają się przypadki pacjentów z nietolerancją na MPA, ale generalnie jest dobrze tolerowany. Efekty uboczne stosowania mykofenolanu mofetylu są głównie związane z dolegliwościami ze strony układu pokarmowym (biegunka, bole brzucha, nudności, wymioty) [86]. Nasilenie tych objawów jest skorelowane z dawką leku i szybko odpowiada na jej redukcję [87].

2.4.4.2. Mykofenolan sodu (Myfortic, Novartis, EC-MPS) [88-91]

Mykofenolan mofetylu wywołuje efekty uboczne, które u części pacjentów uniemożliwiają stosowanie jego optymalnej ilości. Redukcja dawki o połowę znacznie podnosi ryzyko odrzucenia przeszczepu. MPS został zaprojektowany, by zredukować ilość objawów ubocznych w porównaniu do MMF. Mykofenolan sodu jest lekiem o przedłużonym czasie działania w stosunku do MMF. Nie ulega hydrolizie w warunkach kwasowych panujących w żołądku (pH<5), natomiast jest bardzo dobrze rozpuszczalny w pH 7 [89]. Niektóre badania wykazują, że EC-MPS i MMF wykazują taką samą skuteczność działania [88, 90]. Inne natomiast, że w przypadku występowania uporczywych efektów ubocznych ze strony układu pokarmowego zamiana MMF na EC-MPS może złagodzić te objawy [91-93].

2.4.5. Metabolizm *in vivo* MPA, MMF i MPS

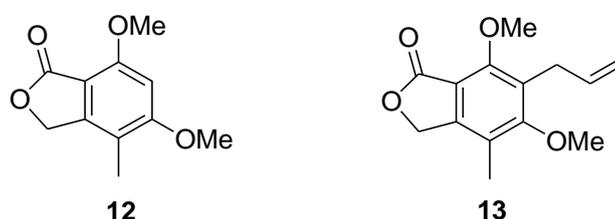
Pomimo niewątpliwych zalet terapeutycznych, niekorzystny metabolizm kwasu mykofenolowego ogranicza jego zastosowanie w terapii. MPA ulega glukuronidacji *in vivo* do nieaktywnego 7-*O*-glukuronianu **9** (MPAG). Wymusza to stosowanie dużych, leku w terapii immunosupresyjnej i ogranicza potencjalne zastosowanie kwasu mykofenolowego jako chemoterapeutyka. MPAG tworzący się on drodze przeniesienia grupy glukuronowej z glukuronianu UDP, może ulegać deglukuronidacji i reabsorpcji *in vivo* [94]. MPAG został zidentyfikowany jako główny metabolit w plazmie [95]. Pozostałe metabolity: M1 **10**, M2 **11** (Rysunek 4), M3 wyizolowane zostały z plazmy z nerek, wątroby i serca pacjentów poddanych terapii mykofenolanem mofetylu. Scharakteryzowano struktury metabolitów **10** (7-*O*-glukozyd MPA) i **11** (acylowany glukuronid MPA) [95]. Metabolit M3, obecny w plazmie w śladowych ilościach, nie został zidentyfikowany. Podejrzewa się, że jest to produkt metabolizmu MPA za pomocą cytochromu P₄₅₀. Acylowany glukuronid, M2, powstający w ilości ok. 1,25% zachowuje aktywność immunosupresyjną przeciw aktywowanym ludzkim limfocytom [86]. Wykazano, że aktywność M2 jest jedynie częściowo jest oparta o inhibicję IMPDH. Ostatnie badania wskazują, że metabolit **11** wywołuje zdeorganizowaną polimeryzację tubuliny i uniemożliwia kontynuację normalnego cyklu komórkowego [97].



Rysunek. 4. Metabolity kwasu mykofenolowego [95]

2.5. Metody syntezy kwasu mykofenolowego [98-109]

W literaturze opisano kilka metod syntezy MPA [98-107] oraz kluczowych dla jego otrzymywania intermediatów **12** [108-110] i **13** [111]. Kwas mykofenolowy do celów medycznych jest pozyskiwany obecnie głównie na drodze procesów biotechnologicznych. Otrzymywanie MPA na drodze syntezy ma jednak zastosowanie praktyczne dla pozyskiwania pochodnych tego związku. Tylko niektóre analogi można otrzymać przez proste modyfikacje MPA. Bardziej skomplikowane pochodne otrzymuje się na drodze syntetycznej i wykorzystuje do tego celu dostępne metody syntezy MPA, odpowiednio je modyfikując.

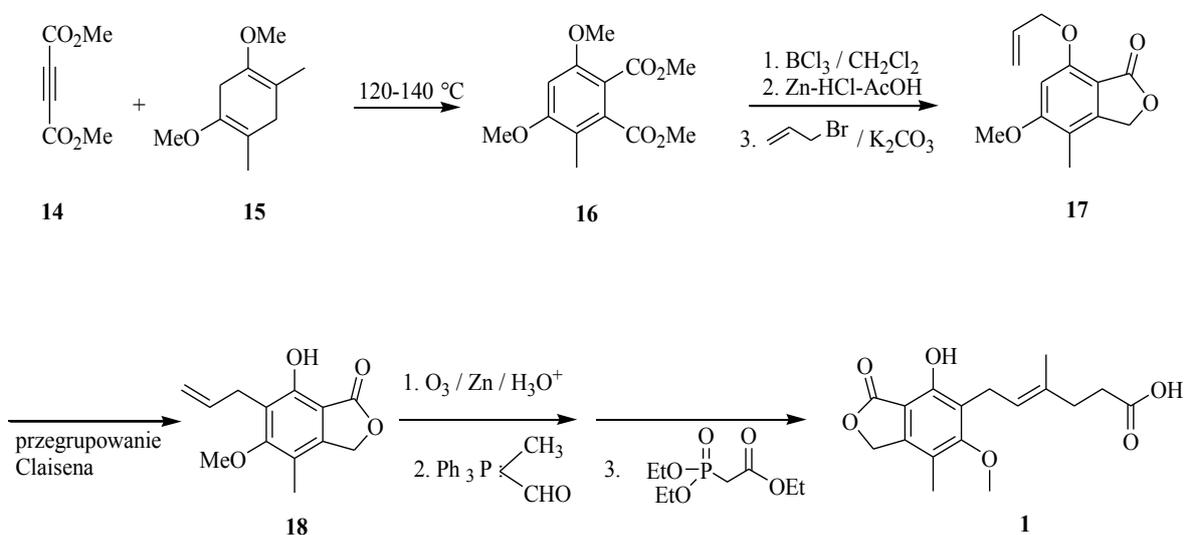


Rysunek 5. Kluczowe intermediaty w syntezy MPA **12**, **13** [108-111]

MPA, kwas (4*E*)-6-(4-hydroksy-6-metoksy-7-metyl-3-okso-5-ftalanyl)-4-metyl-heksenowy, zawiera w swej strukturze 6-podstawiony układ ftalidowy. Standardowo tego typu związki otrzymuje się stosując substrat pozwalający wprowadzić do pierścienia aromatycznego jednocześnie pięć lub sześć wymaganych podstawników. Opisane są jednak w literaturze metody syntezy MPA z prostych, komercyjnie dostępnych odczynników, np. [99, 106].

2.5.1. Synteza MPA wg Bircha i Wrighta [98]

Najstarsza metoda syntezy MPA została zaproponowana przez Bircha i Wrighta [98] (Schemat 3). Kluczową etapem tej metody jest cykloaddycja Aldera-Rickerta 1,3-dimetoksy-4,6-dimetyl-1,3-cykloheksadienu **15** z DMAD **14** pozwalająca na otrzymanie aromatycznego estru **16**. Kolejnymi etapami są: wprowadzenie szóstego podstawnika do pierścienia aromatycznego oraz uzyskanie wolnej grupy hydroksylowej na drodze przegrupowania Claisena ftalidu **17** prowadzącego do fenolu **18** [98]. Związek ten poddaje się następnie: ozonolizie, reakcji Wittiga i reakcji Hornera-Wadswortha-Emmonsa (HWE) otrzymując MPA **1**.

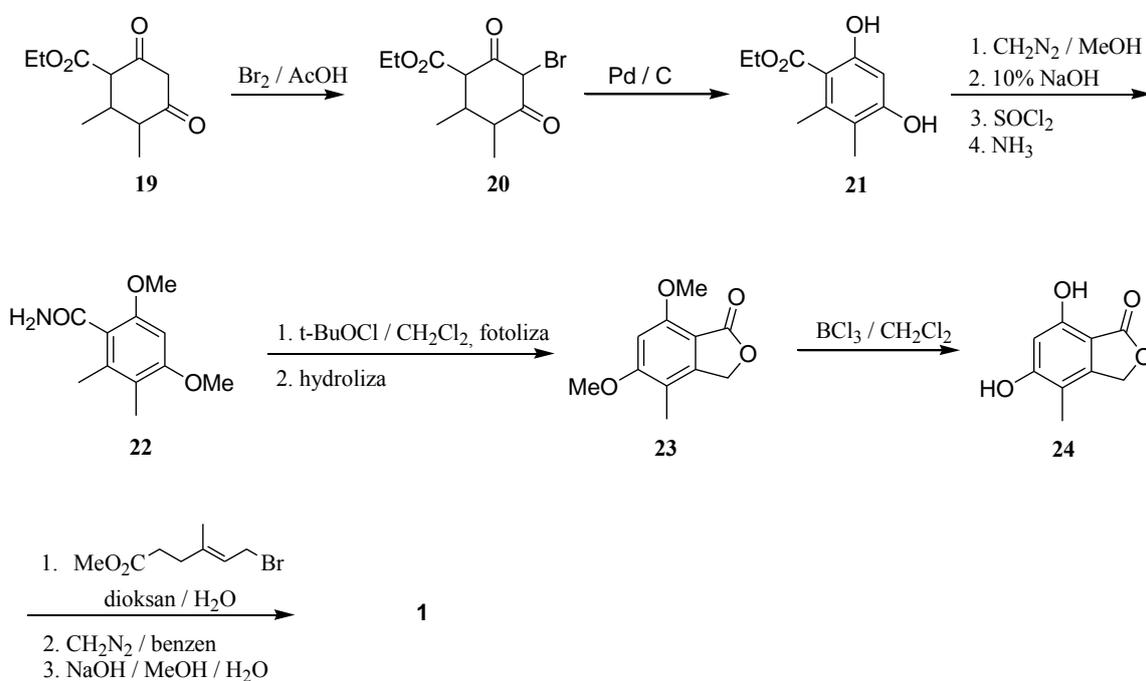


Schemat 3. Synteza kwasu mykofenolowego wg Bircha i Wrighta [98]

2.5.2. Synteza MPA wg Canonica i in. [99]

Syntezę zaproponowaną przez Canonica i in. [99] przedstawia Schemat 4. Kluczową reakcją w tej metodzie jest aromatyzacja cykloheksadienonu **20** prowadząca do otrzymania estru **21**. Związek ten przeprowadza się w amid i po przeprowadzeniu reakcji fotolizy oraz selektywnej demetylacji za pomocą BCl_3 otrzymuje się ftalid **24**.

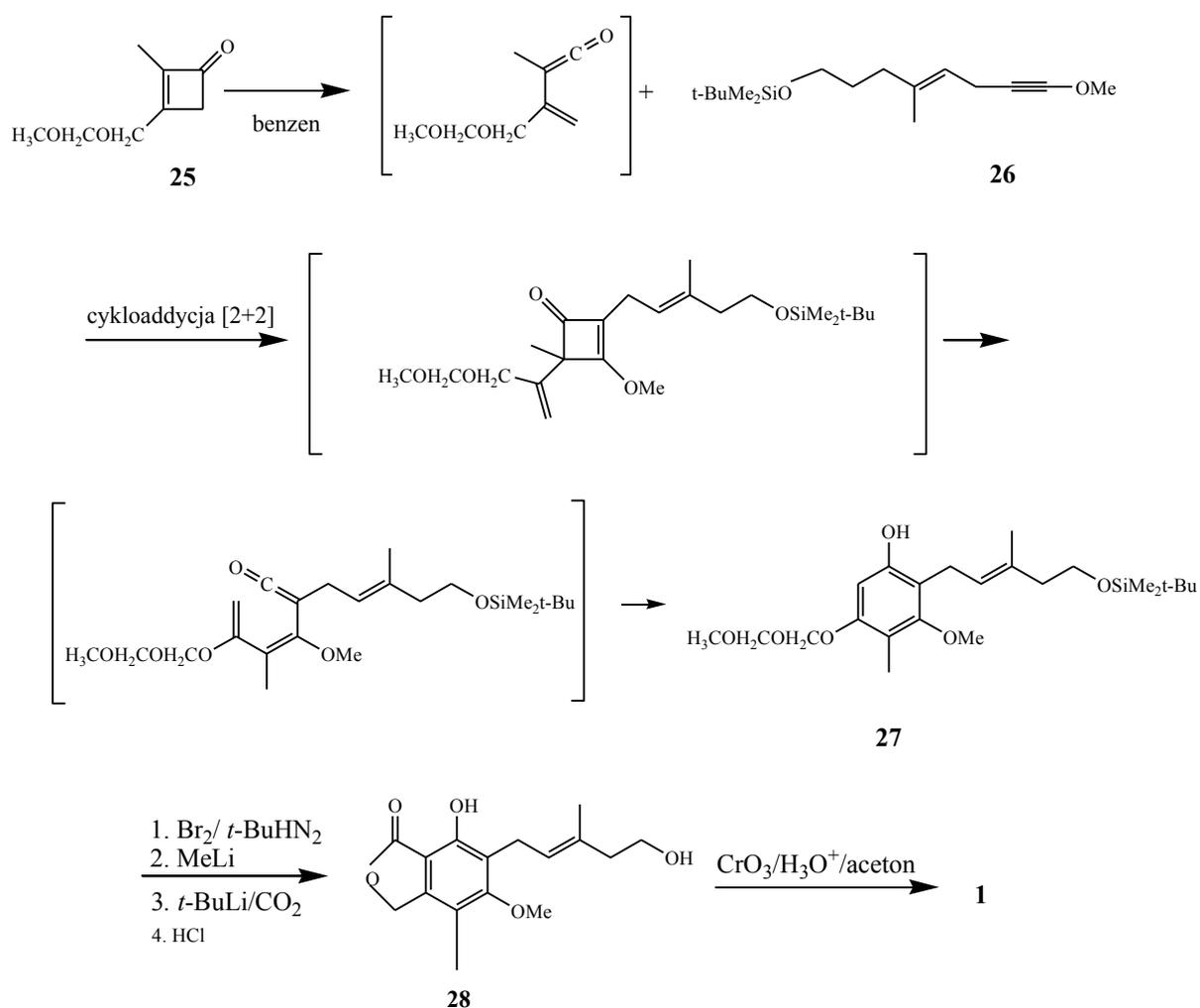
Wprowadzenie łańcucha bocznego, selektywna metylacja w pozycji C5 oraz hydroliza estru prowadzą do otrzymania MPA **1**. Zaletą tej syntezy jest możliwość uzyskania zarówno kwasu mykofenolowego, jak i różnych jego pochodnych zawierających modyfikacje w łańcuchu bocznym [99].



Schemat 4. Synteza MPA zaproponowana przez Canonica i in. [99]

2.5.3. Synteza MPA wg Danheiser i in. [100]

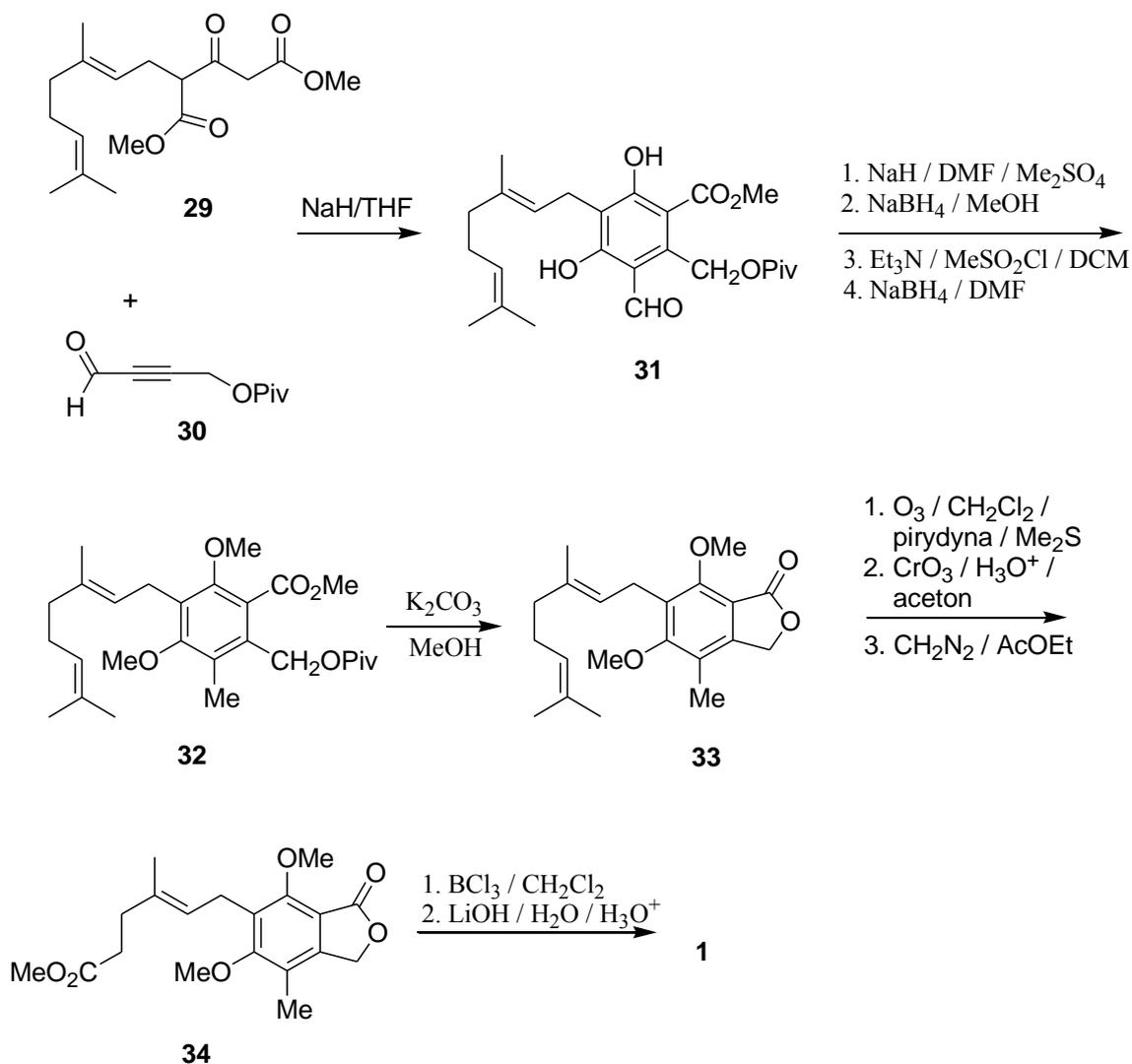
Kluczowymi substratami w tej syntezie są heteropodstawiony acetylen **26** oraz pochodne cyklobutenonu **25** (Schemat 5). Związki te ulegają annulacji na drodze czterech reakcji pericyklicznych, dając jako produkt fenol **27**. Wprowadzenie pierścienia laktonowego odbywa się w reakcjach: bromowania pierścienia aromatycznego w pozycji C6, wytworzenia soli fenolu za pomocą MeLi, wymiany halogen-metal za pomocą *t*-BuLi, karboksylacji za pomocą CO₂ i cyklizacji w obecności katalitycznej ilości stężonego HCl. Utlenianie alkoholu mykofenolowego **28** odczynnikami Jonesa daje MPA **1**. Zaletą syntezy wg Danheiser i in., podobnie jak metody Canonica i in., jest możliwość zastosowania różnych pochodnych acetyleny i uzyskania pochodnych MPA modyfikowanych w łańcuchu bocznym.



Schemat 5. Synteza MPA wg Danheiser i in.[100]

2.5.4. Synteza MPA wg Covarrubias-Zúñiga i in. [101, 102]

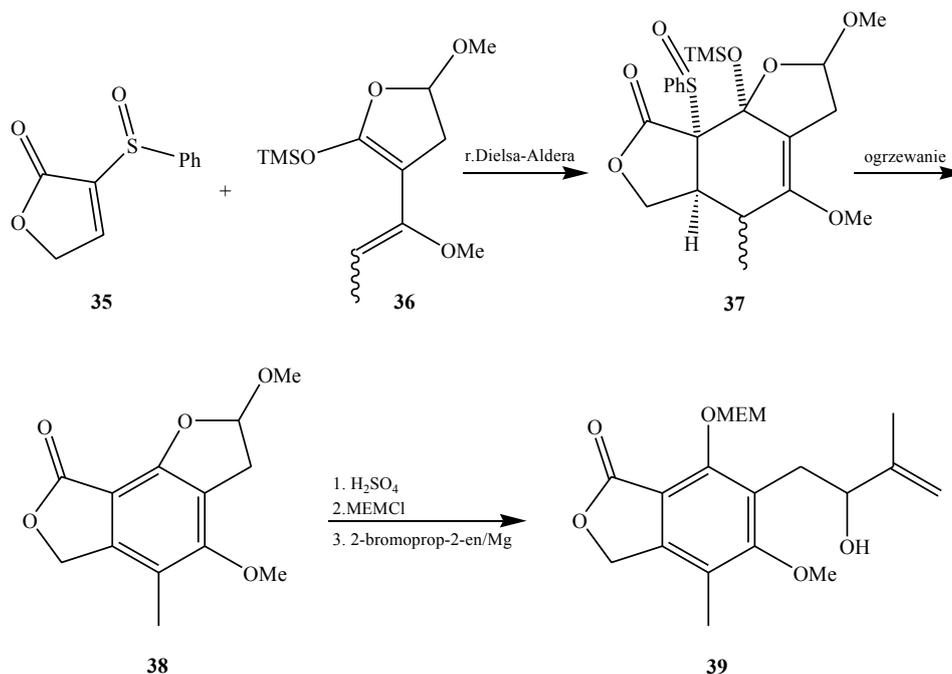
Cykl reakcji zaproponowany przez Covarrubias-Zúñiga i in. [101, 102] przedstawia Schemat 6. Zaletą tej metody jest wprowadzenie do pierścienia aromatycznego wszystkich sześciu podstawników w jednym etapie. Substratami kluczowej reakcji są tutaj ester **29** oraz 4-piwaliloksy-2-butylnal **30**. Zachodząca pomiędzy tymi związkami addycja Michaela, a następnie wewnątrzcząsteczkowa cyklizacja Dieckmanna są najważniejszymi etapami tej metody. Otrzymany sześciopodstawiony fenol **31** ulega reakcjom: metylowania za pomocą Me_2SO_4 , redukcji NaBH_4 grupy formylowej oraz reakcji z MeSO_2Cl prowadząc do otrzymania związku **32**. Następnie ulega on cyklizacji do ftalidu **33**, który poddany ozonolizii, utlenianiu i estryfikacji diazometanem daje związek **34**. Po selektywnej demetylacji otrzymuje się MPA **1**.



Schemat 6. Synteza MPA wg Covarrubias-Zúñiga i in. [101, 102]

2.5.5. Synteza MPA wg R.A. de la Cruz i in. [103]

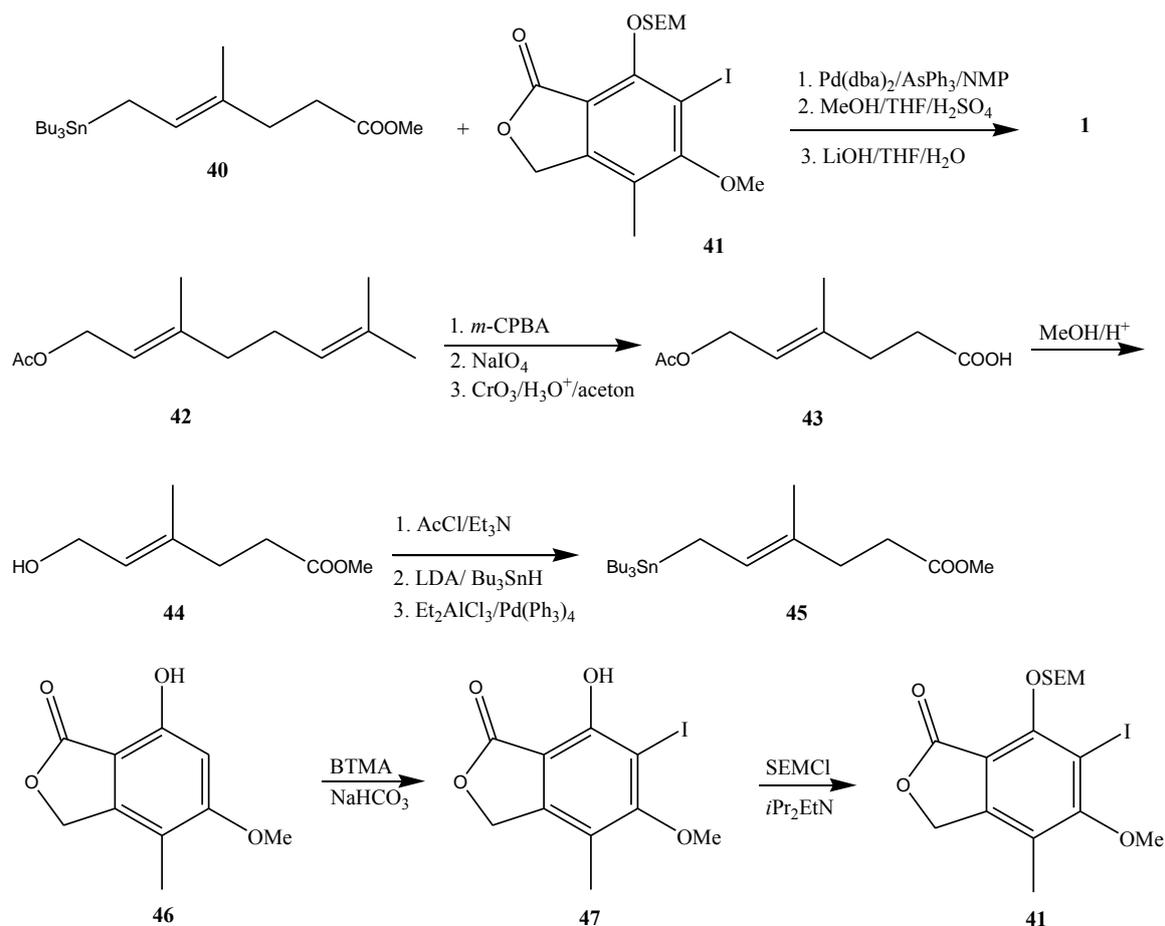
W syntezie zaproponowanej przez R.A. de la Cruz i in. kluczowym produktem jest alkohol allilowy **39**. W pierwszym etapie reakcja Dielsa-Aldera związków **35** i **36** prowadzi do otrzymania cyklicznego produktu **37**. Jego aromatyzacja pod wpływem ogrzewania prowadzi do utworzenia acetalu **38**. Hydroliza, ochrona grupy hydroksylowej i reakcja Grignarda prowadzą do otrzymania alkoholu **39**.



Schemat 7. Synteza MPA wg R.A. de la Cruz i in. [103]

2.5.6. Synteza MPA wg Plé i in. [104]

Metoda zaproponowana przez Plé i in. opiera się na sprzęganiu w kluczowym etapie pochodnej kwasu 4-metyloheks-4-enowego **40** z chronionym ftalidem **41**. Deprotekcja grupy fenolowej i hydroliza estru metylowego prowadzi do kwasu mykofenolowego **1** (Schemat 8). Synteza prekursora łańcucha bocznego MPA **45** przebiega w kilku etapach. Wyjściowym substratem jest naturalnie występujący alifatyczny terpen - octan geranylu **42**. Związek ten utlenia się selektywnie za pomocą *m*-CPBA do epoksydu, rozszczepia NaIO_4 i utlenia odczynnikami Jonesa do pochodnej kwasu karboksylowego **43**. Estryfikacja tego związku i reakcja z tributyllocyną wg procedury opisanej przez Trosta [105] prowadzi do otrzymania pochodnej allilocyny **45**. Ftalid **41** otrzymuje się na drodze reakcji: jodowania związku **46** za pomocą BTMA i ochrony grupy fenolowej stosując SEM-Cl.

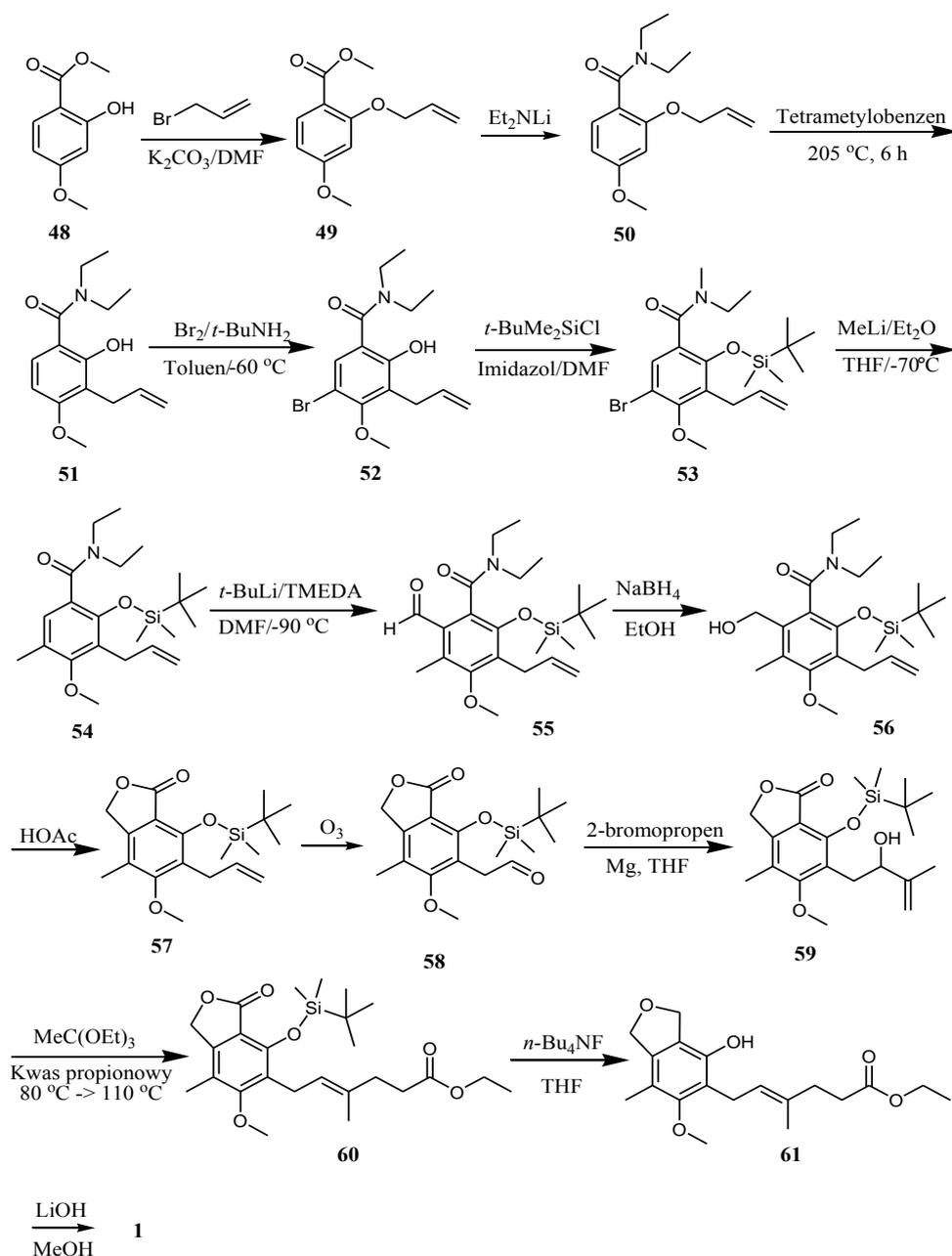


Schemat 8. Synteza MPA wg Plé i in. [104]

2.5.7. Syntezy MPA wg Pattersona [106]

Wyjściowym substratem w metodzie zaproponowanej przez Pattersona [106] jest ester metylowy kwasu 2-hydroksy-4-metoksybenzoesowego **48** (Schemat 9). Związek ten jest stosunkowo tani oraz zawiera w pierścieniu aromatycznym trzy odpowiednie podstawniki, w tym grupę hydroksylową. Trzy inne podstawniki, które trzeba wprowadzić to: grupa allilowa na C-3, metylowa na C-5 oraz hydroksymetylowa na C-6. Wiadomo, że alkirowanie kwasu 2,4-dihydroksybenzoesowego za pomocą jodku metylu jest reakcją selektywną dla pozycji 4 [107]. Ponadto ze względu na fakt, że kwas ten posiada tylko jedną wolną pozycję *ortho* wprowadzenie grupy hydroksymetylowej zachodzi regioselektywnie w pozycję 6. Wprowadzenie grupy allilowej do związku **49** za pomocą bromku allilu, a następnie przegrupowanie Claisena eteru allilowego **50** prowadzi do otrzymania fenolu **51**. Reakcja została przeprowadzona dla estru **49**, prowadząc do otrzymania mieszaniny *o* i *p*-allilofenoli w stosunku 87:13. Reakcja Claisena amidu **50** w identycznych warunkach pozwala na

otrzymanie mieszaniny produktów w stosunku 96:4. Po zablokowaniu dwóch pozycji *orto*, bromowanie zachodzi jedynie w pozycji *para*. Ochrona grupy hydroksylowej za pomocą *t*-BuMe₂SiCl oraz kolejno reakcja wymiany atomu bromu na grupę metylową pozwala na uzyskanie amidu **54**. Formylowanie tego związku za pomocą DMF i redukcja z użyciem NaBH₄ prowadzi do otrzymania alkoholu **56**. Następująca po tym cyklizacja, ozonoliza oraz reakcja Grignarda pozwala na uzyskanie alkoholu **59**. Wydłużenie łańcucha bocznego odbywa się na drodze przegrupowania Claisena-Johnsona. Zdjęcie ochrony grupy hydroksylowej pozwala na otrzymanie estru metylowego MPA **61**, który po hydrolizie daje wolny kwas mykofenolowy **1**.

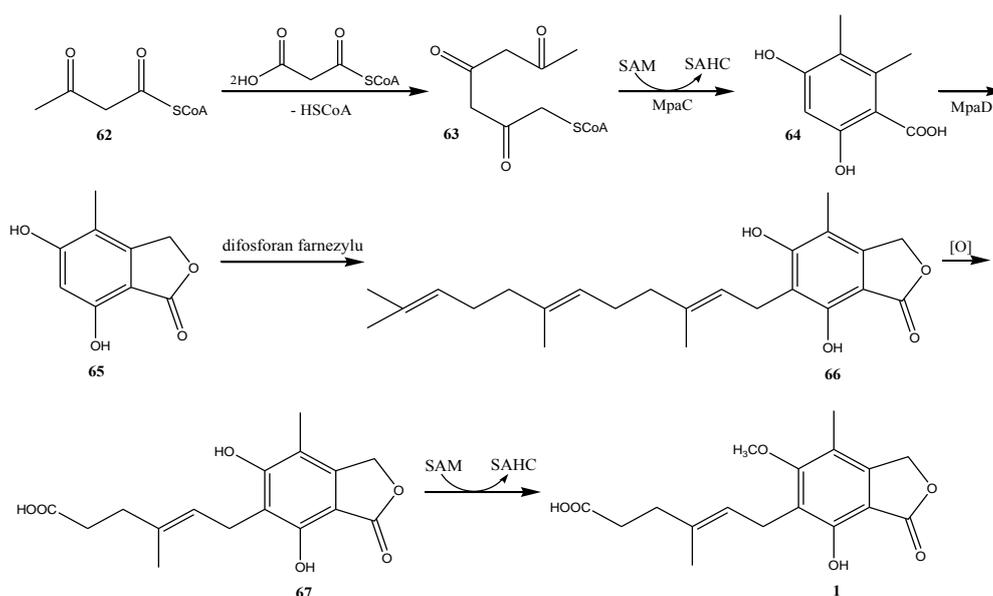


Schemat 9. Synteza MPA wg Pattersona [106]

2.6. Biosynteza kwasu mykofenolowego [112-120]

Kwas mykofenolowy jest wtórnym metabolitem kilku gatunków z rodzaju *Penicillium* (*P. stoloniferum*, *P. roqueforti*, *P. patris-mei*, *P. griseobrunneum*, *P. viridicatum*, *P. nagemi*, *P. viridicatum*, *P. scabrum*, *P. szaferei*) [112-117]. Po raz pierwszy został wyizolowany z *Penicillium brevicompactum*. MPA jest produkowany również przez niektóre inne szczepy np. *Byssoschlamys nivea* [117].

Biosynteza kwasu mykofenolowego opiera się na dwóch podstawowych szlakach-poliketydowym i izoprenoidowym, charakterystycznych dla powstawania metabolitów wtórnych [112, 118]. Podłoże molekularne procesu nie jest do końca wyjaśnione i pozostaje obiektem badań. Najnowsze doniesienia literaturowe informują np. o odkryciu enzymu katalizującego syntezę kwasu 5-metylorsellinowego [118]. Należy on do klasy syntaz poliketydowych (PKs) i został nazwany mpaC. W procesie biosyntezy MPA prekursorem układu ftalidowego jest AcCoA i malonylo-CoA (Schemat 10). Kondensacja tych związków prowadzi do otrzymania poliketonu **63**. Związek ten ulega cyklizacji do kwasu 5-metylorsellinowego **64**, a następnie wewnątrzcząsteczkowej estryfikacji z wytworzeniem pierścienia laktonowego (związek **65**). Prekursorem łańcucha bocznego jest difosforan farnezylu i jego przeniesienie na ftalidowy intermediat **65** prowadzi do otrzymania związku **66**. Skrócenie łańcucha bocznego zachodzi na drodze utleniania i rozszczepienia wiązania podwójnego. Ostatni etap biosyntezy polega na przeniesieniu grupy metylowej z *S*-adenylometioniny (SAM) na grupę hydroksylową węgla C3 pierścienia aromatycznego, katalizowany przez *O*-metyltransferazę.



Schemat 10. Biosynteza kwasu mykofenolowego [112]

Produkcja kwasu mykofenolowego przez gatunki z rodzaju *Penicillium* może być procesem niekorzystnym. MPA najczęściej występuje w nieodpowiednio przechowywanych produktach spożywczych - zbożach, chlebie, mleku i owocach. W niektórych przypadkach istotne jest oznaczanie poziomu MPA, by zapobiegać jego immunosupresyjnemu działaniu na zdrowych ludzi. W tym celu zaprojektowane zostały techniki analityczne służące analizie MPA np. w kukurydzy [119] czy mleku [120].

2.7. Pochodne kwasu mykofenolowego [121-138]

MPA wykazuje bardzo dobrą aktywność cytotoksyczną przy stosunkowo niskiej ogólnej toksyczności. Standardowo jest stosowany jako lek immunosupresyjny, jednak jego zastosowanie w medycynie stale się poszerza. MMF stosowany jest w dermatologii np. w chorobach zapalnych skóry [121] i łuszczycy [122] u pacjentów opornych na standardowe leczenie. Kwas mykofenolowy używany jest w leczeniu zespołu nerczycowego, w postaci MMF i MPS [123-126]. Głównym ograniczeniem związanym ze stosowaniem MPA jest jego duża tendencja do ulegania glukuronidacji *in vivo* do nieaktywnego metabolitu. Prawdopodobnie jest to przyczyną ograniczonej skuteczności MPA (MMF) w pierwszej fazie badań klinicznych przeciw szpiczakowi mnogiemu (niemożność osiągnięcia stężenia terapeutycznego leku) [127].

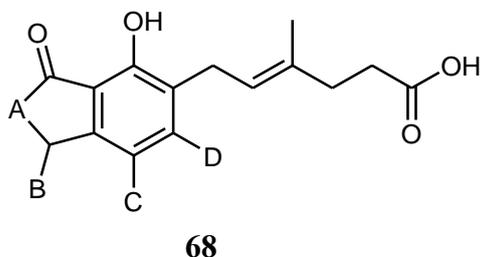
Recyrkulacja MPA w układzie pokarmowym, spowodowana rozpadem MPAG, jest częściowo odpowiedzialna za występowanie efektów ubocznych. W związku z tym poszukuje się pochodnych MPA o ulepszonych właściwościach fizykochemicznych i farmakologicznych. Spośród wielu otrzymanych analogów MPA jedynie kilka wykazało lepszą aktywność, niż kwas mykofenolowy. Większość pochodnych charakteryzowała się zmniejszoną aktywnością w porównaniu z MPA lub była całkowicie jej pozbawiona.

Obecnie podejmowane są badania SAR zmierzające do zastosowania pochodnych kwasu mykofenolowego jako leków przeciwnowotworowych [128]. Otrzymane pochodne MPA znacznie różnią się strukturą. Ogólnie można przeprowadzić podział analogów na trzy grupy: pochodne modyfikowane w pierścieniu aromatycznym bądź laktonowym, pochodne typu fenoli oraz pochodne modyfikowane w łańcuchu bocznym [129].

2.7.1. Pochodne modyfikowane w pierścieniu aromatycznym lub laktonowym [129]

2.7.1.1. Pochodne modyfikowane w pierścieniu aromatycznym [129]

Otrzymano liczne pochodne modyfikowane w pierścieniu aromatycznym. Ogólny ich wzór przedstawia Rysunek 6. Większość związków charakteryzowała się znacznym spadkiem aktywności w porównaniu do MPA. Wyjątek stanowiły pochodne, w których grupa metoksylova w pozycji 6 pierścienia aromatycznego została zastąpiona grupami: winylową, etylową oraz metylową. Były one 2÷4 razy bardziej aktywne niż kwas mykofenolowy [129]. Uważa się, że grupa metoksylova nie wiąże się z centrum aktywnym enzymu, a jej funkcja polega na wymuszaniu dogodnej konformacji (orientacji) łańcucha bocznego MPA. Podstawienie większymi grupami, np. etoksy, cyklopropylo czy fenylova okazały się mniej aktywne, niż oczekiwano. Najprawdopodobniej z powodu utrudnionej penetracji przez błony komórkowe [129]. Wykazano, że kluczowe dla zachowania aktywności biologicznej elementy struktury to grupa metylowa w pozycji C7 oraz grupa hydroksylova. Podstawienie w pozycję C6 pierścienia aromatycznego grupy cyjankowej czy amidowej powodowało spadek aktywności, przypisywany niekorzystnemu charakterowi dipolarnemu tych grup i redukcji gęstości elektronowej w pobliżu grupy karbonylovej pierścienia laktonowego.



np. A = S; B = H; C = CH₃; D = OCH₃

A = NH; B = H; C = CH₃; D = OCH₃

A = O; B = H; C = CH₃; D = OH

A = O; B = H; C = CH₃; D = CH=CH

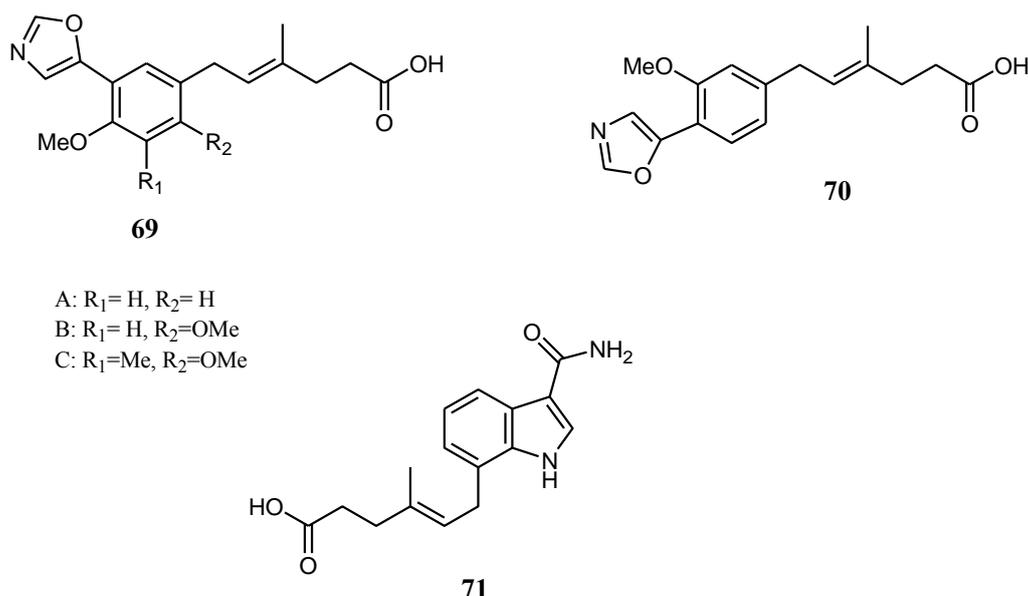
A = O; B = H; C = CH₃; D = C₆H₅

A = O; B = H; C = CH₃; D = CN

Rysunek 6. Pochodne MPA modyfikowane w pierścieniu laktonowym i aromatycznym [113]

2.7.1.2. Pochodne modyfikowane w pierścieniu laktonowym [129-131]

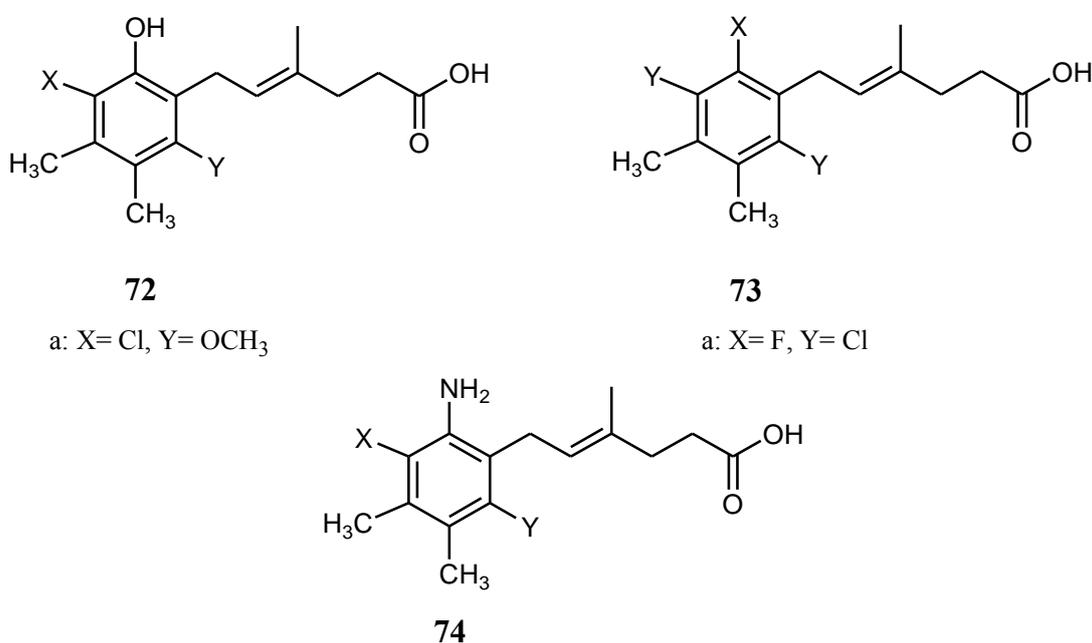
Otrzymanych zostało wiele pochodnych zawierających modyfikacje w pierścieniu laktonowym, polegających przykładowo na zmianie jego wielkości lub wprowadzeniu grupy NCH_3 w miejsce atomu tlenu (**68**, Rysunek 6). Wszystkie związki z tej grupy były mniej aktywne, niż MPA. Zastąpienie tlenu pierścienia laktonowego atomem siarki, grupą metylenową lub NH prowadziło do uzyskania związków 5÷10 razy mniej aktywnych, niż MPA. Zastąpienie ugrupowania NH większą objętościowo grupą NCH_3 spowodowało kolejny czterystukrotny spadek aktywności. Wskazuje to na dużą wrażliwość tego obszaru na zawadę steryczną. Powiększenie pierścienia laktonowego do sześcioczłonowego skutkowało 25-krotnym spadkiem aktywności [129]. Analogi posiadające w miejscu benzofuranowej części MPA grupę metoksy-(5-oksazolilo)-fenyłową (MOP) **69**, **70** (Rysunek 7) zachowują aktywność biologiczną, jednak dużo słabszą niż MPA [130]. Pochodne te wiążą się z IMPDH w sposób podobny do benzofuranowej części MPA. Wykazano, że grupa oksazolilowa tworzy wiązania wodorowe z Gly 326 i Thr 333 hIMPDH. Pochodne te wykazują słabą aktywność przeciw obu izoformom IMPDH i ludzkiej białaczce K562 [130]. Aby otrzymać pochodne odporne na glukuronidyzację, zaprojektowano indolowe pochodne MPA, posiadające w miejsce grupy hydroksylowej fenolu grupę NH indolu, z których pochodna **71** (Rysunek 7) wykazywała aktywność przeciwko rakowi jajnika i została wyselekcjonowana do dalszych badań przeciwko rakowi prostaty [131, 132].



Rysunek 7. Analogi MPA z grupą MOP **69**, **70** [130] oraz pochodna indolowa **71** [131, 132]

2.7.2. Monocykliczne fenole i niefenole oraz monocykliczne aminy [129]

Modyfikacje strukturalne w obrębie pierścienia laktonowego nie przyniosły oczekiwanych rezultatów. W poszukiwaniu bardziej aktywnych związków otrzymano kolejną grupę pochodnych - monocykliczne fenole **72**, niefenole **73** oraz monocykliczne aminy **74** (Rysunek 8). Przy projektowaniu związków kierowano się kryterium, by wprowadzone do pierścienia aromatycznego podstawniki nie były większe niż pierścień laktonowy. Najczęściej zachowano grupy metylową i metoksyową dla określenia wpływu braku pierścienia laktonowego na aktywność związków.



Rysunek 8. Pochodne o strukturze monocyklicznych fenoli **72**, niefenoli **73** i amin **74** [129]

2.7.2.1. Pochodne typu fenoli [129]

Ogólny wzór tego typu analogów przedstawia wzór **72** (Rysunek 8). Wszystkie związki o strukturze fenoli były mniej aktywne, niż MPA. Chlorofenol **72a** zachował 70% aktywności kwasu mykofenolowego, jednocześnie będąc najbardziej aktywnym nieftalidowym analogiem MPA. Na podstawie analizy struktura - aktywność (SAR) pochodnych typu fenoli wykazano, że dla zachowania aktywności podstawnik X powinien działać jako akceptor wiązań wodorowych i musi mieć optymalną wielkość.

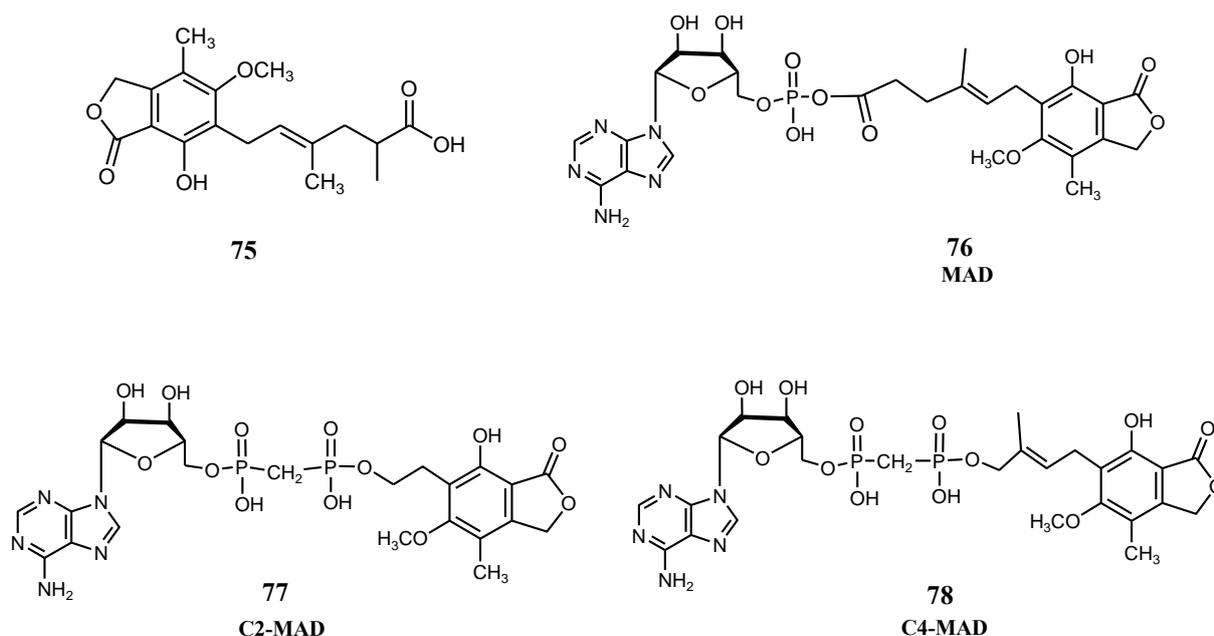
2.7.2.2. Pochodne typu niefenoli i monocyklicznych amin [129]

Dla pochodnych typu niefenoli **73** wartości IC_{50} oznaczone dla aktywowanych PBMC różniły się o 3 rzędy wielkości, w zależności od wprowadzonych podstawników. Zastąpienie grupy OH grupą tiolową dało nieaktywny związek. Zsyntetyzowano pochodne zawierające w miejscu grupy hydroksylowej grupę aminową **74**, wszystkie te pochodne były mniej aktywne niż odpowiadające im fenole **72** [129]. Podstawienie grupy hydroksylowej pierścienia aromatycznego atomem wodoru skutkowało spadkiem aktywności 3÷20 razy, zależnie od otaczającego podstawnika. Analogicznie jak w przypadku fenoli **72** podstawnik w pozycji Y musi mieć optymalną wielkość. Wszystkie związki były mniej aktywne niż MPA, a najbardziej aktywny z otrzymanych pochodnych był związek **73a**.

Na podstawie analizy SAR wykazano, że grupa hydroksylowa nie może być zastąpiona inną bez znaczącego spadku aktywności. Otaczający ją podstawnik musi być akceptorem wiązania wodorowego (atom chloru ma optymalną wielkość) i/lub musi być akceptorem wiązań wodorowych. Lipofilowe, małe (większe niż wodór) grupy są niezbędne w pozycjach 6 i 7. Rola podstawnika w pozycji 7 pierścienia aromatycznego polega prawdopodobnie na wymuszaniu odpowiedniej konformacji łańcucha bocznego MPA [129].

2.7.3. Pochodne MPA modyfikowane w łańcuchu bocznym [19, 31, 37, 42, 133-136]

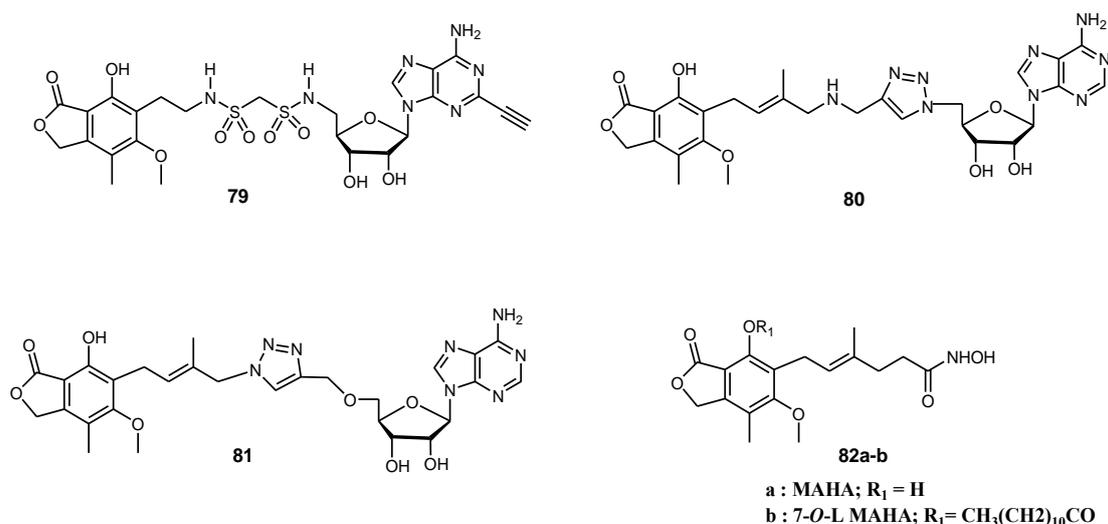
Grupa pochodnych modyfikowanych w łańcuchu bocznym zawiera związki bardzo zróżnicowane pod względem struktury. Podobnie jak w przypadku innych typów pochodnych, większość otrzymanych związków charakteryzowała się gorszą aktywnością niż MPA. Wprowadzenie do łańcucha bocznego małych alkilowych podstawników w pozycji α w stosunku do grupy karboksylowej pozwoliło na uzyskanie bardziej aktywnych analogów [133]. Przykładem jest kwas α -metylomykofenolowy **75** (Rysunek 9), dwukrotnie bardziej aktywny niż MPA. Modyfikacje łańcucha bocznego polegały na zastąpieniu podwójnego wiązania różnymi grupami, wprowadzeniem wiązania potrójnego, atomów bromu, fluoru, zmiana na wiązanie o konfiguracji *cis*, niepodstawionego cyklopropanu. Nawet niewielkie zmiany strukturalne w tym obszarze prowadziły do znacznej utraty aktywności [134].



Rysunek 9. Pochodne modyfikowane w łańcuchu bocznym MPA [42, 133, 136]

Pankiewicz i in. otrzymali związki przypominające budową NAD, które w założeniu miały charakteryzować się zwiększoną siłą wiązania do enzymu [135]. Pochodne te nie posiadają zdolności przenoszenia wodoru, co skutkuje aktywnością inhibicyjną wobec IMPDH (**76**, MAD, Rysunek 9). Sukcesem było otrzymanie pochodnych MPA odpornych na glukuronidyzację *in vitro*. W 2002 roku Pankiewicz i in. otrzymali [mykofenolowo-adenino-bis(fosforanowe) analogi (MAD)] zastępując ugrupowanie [P(O)-O-C(O)] stabilną resztą metylenobisfosforanową [P(O)-CH₂-P(O)] np. **77**, **78**. Udowodniono, że C2-MAD jest złym substratem dla UDP-glukuronozylotransferazy, prawdopodobnie z powodu zawady sterycznej spowodowanej obecnością adenozyiny w łańcuchu bocznym MPA oraz obecności ujemnego ładunku na reszcie fosforanowej [42]. C2-MAD i analogi wykazują silną aktywność inhibicyjną i indukują różnicowanie komórek ludzkiej białaczki K562. Analogi C2-MAD postawione w pozycji 2 adeniny grupą fenylową wykazywały pięciokrotnie, a grupą etylową szesnastokrotnie silniejszą inhibicję IMPDH w porównaniu do niepodstawionego związku [37]. Wbrew oczekiwaniom analogi MAD nie charakteryzują się zwiększoną siłą wiązania do IMPDH. Niezależnie od długości łącznika pomiędzy adenozyną, a MPA ich aktywność jest o rząd wielkości słabsza niż kwasu mykofenolowego. Związki te pozbawione są również specyficzności w stosunku do izoform enzymu. W 2008 Pankiewicz i in. otrzymali mykofenolowo-adenino(sulfoamidowe) pochodne MPA (MABS) **79** (Rysunek 9) [37].

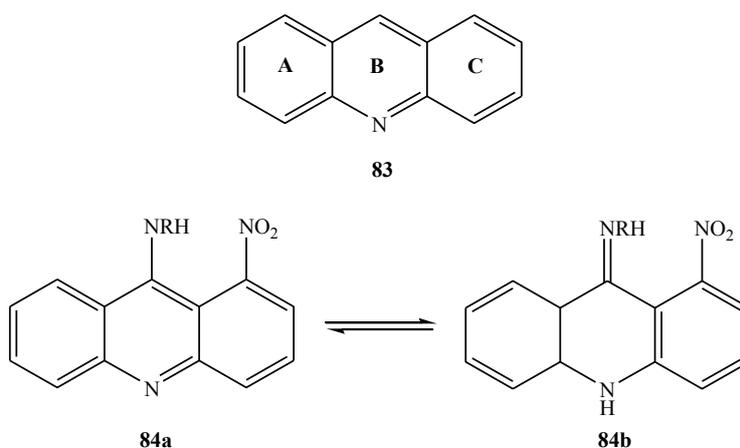
MABS zaprojektowane zostały z myślą, że słabo kwasowe bis(sulfamidy) nie będą jonizować w warunkach fizjologicznych. Częściowy ładunek ujemny zlokalizowany na tlenie łącznika powinien zastępować naturalnie występującą resztę pirofosforową. Pochodne MABS podstawione w pozycji 2, np. **79** były mniej aktywne niż niepodstawione analogi. Zaprojektowano i otrzymano analogi MAD np. **80**, **81**, w których reszta fosforanowa została zastąpiona grupą 1,2,3-triazolową. Miało to zachować ogólną geometrię wpasowania kwasu mykofenolowego i reszty adenozyiny w odpowiednich dla nich subdomenach N i A. Związki te okazały się być silnymi inhibitorami IMPDH i pierwszymi inhibitorami IMPDH z *Mycobacterium tuberculosis* (*mt*IMPDH) [18]. Inne analogi MPA, zawierające resztę kwasu fosforowego w łańcuchu bocznym MPA otrzymali W. Watkins i in. Wszystkie pochodne były mniej aktywne niż kwas mykofenolowy [136]. W poszukiwaniu związków aktywnych przeciw CML, będących jednocześnie inhibitorami IMPDH i deacetylaz histonowych (HDACs, enzymy katalizujące usuwanie grup acetylowych z reszt lizyny histonów) otrzymano pochodne MPA z suberoiloanilidem kwasu hydroksamowego (SAHA). SAHA (Vorinostat) jest silnym inhibitorem HDACs, zatwierdzonym jako terapia w leczeniu ostrej białaczki. MAHA (mykofenolowy analog SAHA) okazał się efektywnym inhibitorem wobec obu enzymów [49]. Oczekuje się, że będzie też aktywny wobec linii nowotworowych dla których SAHA wykazuje skuteczność. W 2008 roku Batovska i in. otrzymali MAHA **82a**, 7-*O*-acetyl oraz 7-*O*-lauronyl-MAHA **82b**. Związki te testowane były jako potencjalne inhibitory HDACs oraz komórek białaczki K-562. Najbardziej aktywna pochodna 7-*O*-lauronyl MAHA **82b**, wykazała pięciokrotnie słabsze działanie inhibicyjne przeciw HDACs niż MAHA [56].



Rysunek 10. Pochodne MABS **79**, analogi MAD z łącznikiem triazolowym **80**, **81** i inhibitory HDACs **82a-b**

2.8. Akrydyny – struktura i aktywność biologiczna [139-147]

Akrydyny zalicza się do klasy policyklicznych związków heteroaromatycznych (**83**, Rysunek 11). Strukturalnie są analogami antracenu, zawierającymi atom azotu w pierścieniu B. Pochodne akrydyn wykazują szerokie spektrum aktywności biologicznej: przeciwgrzybową, przeciw pasożytniczą, przeciwdrobnoustrojową, antynowotworową, przeciwzapalną [139-142]. Związki o działaniu przeciwnowotworowym dzieli się na pięć grup: nitroakrydyny, 9-anilinoakrydyny, pirazoloakrydyny, imidazoakrydony oraz triazoloakrydony [140].

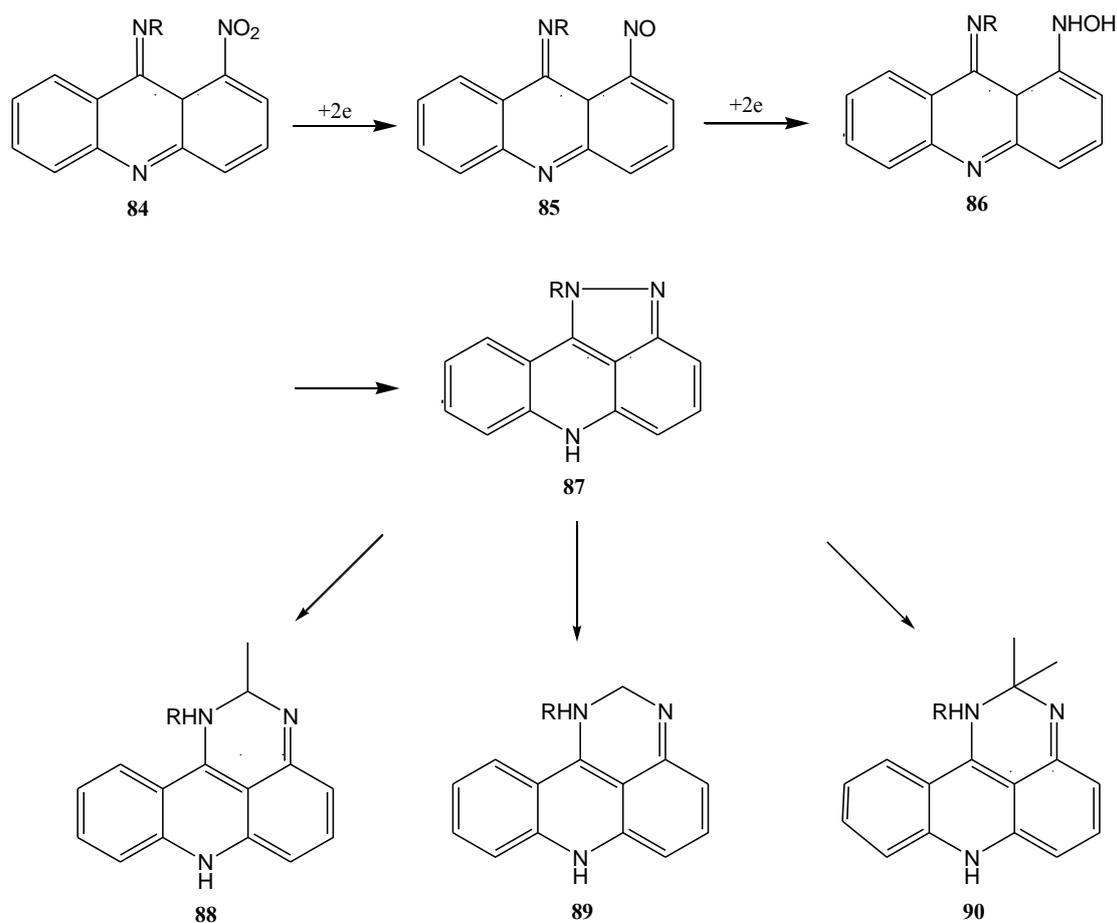


Rysunek 11. Struktura akrydyny **83** i równowaga tautomeryczna pochodnych 1-nitro-9-aminoakrydyny **84a-b**

2.8.1. Nitroakrydyny - zależność SAR

9-Alkiloamino-1-nitroakrydyny należą do związków o działaniu przeciwnowotworowym. Zostały otrzymane w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej w latach sześćdziesiątych przez zespół prof. Z. Ledóchowskiego [143]. Zsyntetyzowano liczne, różniące się budową pochodne i na tej podstawie ustalono zależności między strukturą, a aktywnością biologiczną. Modyfikacje strukturalne polegały głównie na wprowadzaniu grupy nitrowej w różne pozycje pierścienia oraz zmianach w alkiowym łańcuchu bocznym (różna długość i rzędowość) [143]. Najaktywniejsze były pochodne z grupą nitrową w pozycji 1. Wykazano, że na aktywność cytotoksyczną 1-nitroakrydyn wpływ mają: zawada steryczna pomiędzy grupą nitrową a łańcuchem bocznym w pozycji 9, równowaga tautomeryczna pomiędzy aminoakrydyną a iminoakrydyną (**84a-b**, Rysunek 11) [144] oraz duża podatność grupy nitrowej na redukcję.

W grupie 9-alkiloamino-1-nitroakrydyn najaktywniejsza była 1-nitro-9-(3-dimetyloaminopropylamino)-akrydyna. Związek ten, znany jako Ledakrin (Nitracrine), był pierwszym polskim zarejestrowanym lekiem przeciwnowotworowym. Ledakrin nie wywołuje efektu mielosupresyjnego, ale działa silnie toksycznie. Wywoływał uciążliwe efekty uboczne u pacjentów i został wycofany z praktyki klinicznej [143]. Mechanizm działania 9-alkiloamino-1-nitroakrydyn oparty jest na interkalacji do DNA akrydynowego fragmentu związku. Wiązania kowalencyjne z DNA tworzą produkty metabolizmu 1-nitroakrydyn *in vivo*. Powstające początkowo związki **85** i **86** są nietrwałe i szybko ulegają przemianie do trwalszych produktów **87-90** (Schemat 12). Posiadają one zdolność wiązania się i sieciowania kwasów nukleinowych i innych makromolekuł komórkowych [145-146]. Udowodniono, że zdolność do sieciowania DNA jest najważniejszym czynnikiem odpowiedzialnym za działanie cytotoksyczne pochodnych 9-alkiloamino-1-nitroakrydyny. Wykazano, że aktywacja metaboliczna w komórkach polega głównie na redukcji grupy nitrowej w pozycji 1 lub utlenianiu grupy aminowej łańcucha bocznego (Schemat 11) [147].



Schemat 11. Produkty metabolizmu pochodnych 1-nitroakrydy **85-90**

3. CEL I ZAKRES PRACY

Celem mojej rozprawy doktorskiej jest synteza i badania aktywności biologicznej analogów kwasu mykofenolowego z pochodnymi amino-akrydyny/akrydonu **91a-e**, **92a-e** (Rysunek 12) jako związków o potencjalnym działaniu immunosupresyjnym.

MPA działa selektywnie, hamując proliferację limfocytów T i B oraz komórek nowotworowych *in vitro*. Wiele naturalnych i syntetycznych związków przeciwnowotworowych, np. 9-alkiloamino-1-nitroakrydyny, wykazuje zdolność do silnej interkalacji do DNA i charakteryzuje się dobrą aktywnością cytotoksyczną. Jednak z powodu słabej selektywności są one toksyczne zarówno dla komórek nowotworowych, jak i zdrowych. Poszukując związków, które będą charakteryzowały się dobrą selektywnością i obniżoną toksycznością, zaprojektowałam analogi MPA, składające się z wybiórczo działającego kwasu mykofenolowego i pochodnych amino-akrydyny/akrydonu. Połączenie cząsteczek o komplementarnych funkcjach biologicznych i wykazujących odmienny mechanizm działania, często skutkuje bardziej aktywnymi związkami, zgodnie z efektem synergicznym [148-150].

Praca syntetyczna obejmowała:

- otrzymanie MPA **1**, pochodnych amino-akrydyny/akrydonu **93a-e**, **94a-e** oraz analogów **91a-e**, **92a-e**. Kwas mykofenolowy uzyskałam na drodze syntezy opisanej w literaturze przez Pattersona [106], wprowadzając kilka modyfikacji. Pochodne amino-1-nitroakrydyny/4-nitroakrydonu otrzymałam na drodze kondensacji Ullmanna z kwasu *o*-chlorobenzoesowego, *m*-nitroaniliny lub 3-amino-4-nitrochlorobenzenu w obecności pyłu miedzi jako katalizatora, cyklizacji oraz łączenia z odpowiednimi alkiloaminami. W celu otrzymania analogów MPA, przetestowałam różne metody tworzenia wiązania amidowego.

Badania biologiczne obejmowały:

- testy aktywności antyproliferacyjnej metodą inkorporacji TdR-3H związków **91a-e**, **92a-e**, **93a-e**, **94a-e**, **1** wobec limfoidalnych linii komórkowych i komórek docelowych dla związków immunosupresyjnych (PBMC)
- badania żywołności komórek (metoda MTT) poddanych działaniu związków **91a-e**, **92a-e**, **93a-e**, **94a-e**, **1** wobec linii białaczkowych i komórek PBMC,
- określenie cytotoksyczności analogów MPA w stosunku do ich związków natywnych,
- selekcję związków do badań *in vivo*,

4. WYNIKI I WNIOSKI

4.1. Prace syntetyczne

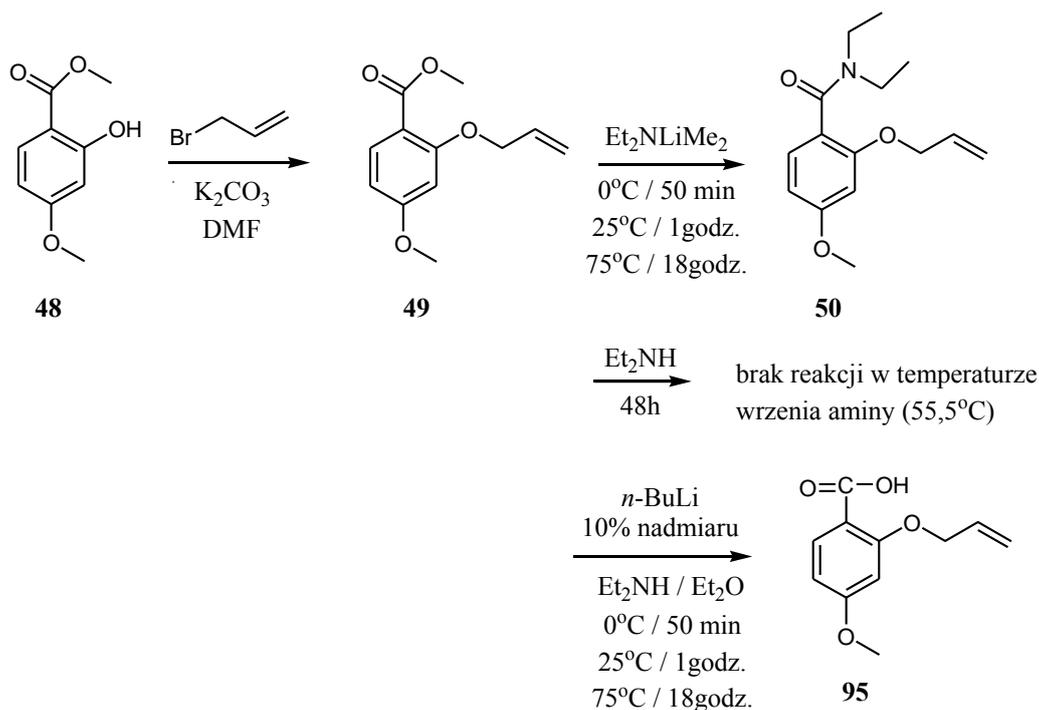
Część syntetyczna pracy obejmowała otrzymanie: kwasu mykofenolowego **1**, pochodnych amino-akrydyny/akrydonu **93a-e**, **94a-e** oraz analogów **91a-e**, **92a-e** (Rysunek 12).

4.1.1. Synteza kwasu mykofenolowego [106]

W literaturze opisano kilka metod otrzymywania kwasu mykofenolowego (rozdziały 2.5.1.-2.5.7.). Syntezę MPA przeprowadziłam zgodnie z opisem Pattersona (Schemat 9) [106]. Metodę wybrałam kierując się: prostym i tanim substratem (kwas 2,4-dihydrobenzoesowy) oraz możliwością uzyskania odpowiednich ilości MPA, niezbędnych do syntezy analogów **91a-e**, **92a-e**.

4.1.1.1. Synteza *N,N*-dietylo-4-metoksy-2-(prop-2-enyloksy)benzamidu **50**

Opisana przez Pattersona reakcja otrzymywania związku **50** (Schemat 12) zakłada użycie $(\text{CH}_3)_3\text{Al}$ i $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{NH}$, prowadzące do otrzymania reaktywnego kompleksu $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{NAl}(\text{CH}_3)_2$. Próbowałam zmodyfikować ten etap poprzez zastąpienie $(\text{CH}_3)_3\text{Al}$ znacznie tańszym roztworem *n*-BuLi w heksanie. Przeprowadziłam reakcję postępując zgodnie z procedurą opisaną w literaturze [151]. Otrzymałam złożoną mieszaninę produktów, z której wydzieliłam tylko związek **95**. Następnie próbowałam otrzymać benzamid **50** ogrzewając do wrzenia ester **49** z nadmiarem Et_2NH w obecności kwasu *p*-toluenosulfonowego jako katalizatora. Po upływie 48 godz. nie zaobserwowałam tworzenia się produktu. Wobec tych niepowodzeń syntezę związku **50** przeprowadziłam zgodnie z metodą opisaną przez Pattersona [106].

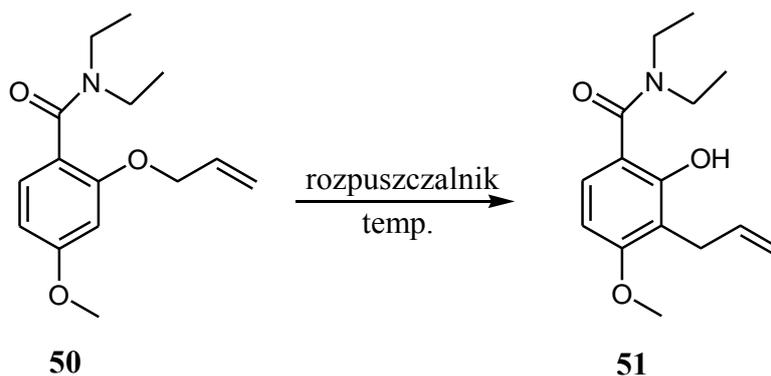


Schemat 12. Synteza *N,N*-dietylo-4-metoksy-2-(prop-2-enyloksy)benzamidu **50**

4.1.1.2. Synteza *N,N*-dietylo-2-hydroksy-4-metoksy-3-(prop-2-enyl)benzamidu **51**

Przegrupowanie Claisena eterów allilowo-aromatycznych w dużym stopniu zależy od warunków reakcji: temperatury, rozpuszczalnika i stosowanych katalizatorów [152, 153].

Reakcja przegrupowania benzamidu **50** do **51** opisana przez Pattersona zakłada zastosowanie 1,3,4,5-tetrametylobenzenu jako rozpuszczalnika (Schemat 13). Ze względu na wysoką cenę tego związku, postanowiłam zastąpić go tańszym, niżej wrzącym izomerem: 1,2,4,5-tetrametylobenzenem. Wydajność reakcji przy zastosowaniu tego izomeru wyniosła 15%. W związku z tym wytypowałam inne rozpuszczalniki. Przy wyborze kierowałam się temperaturą wrzenia oraz polarnością zbliżoną do 1,3,4,5-tetrametylobenzenu. Przetestowałam trzy rozpuszczalniki: tetralinę, 4-chloro-*o*-ksylen oraz nitrobenzen. We wszystkich przypadkach obserwowałam po upływie dwóch godzin zanik substratu. Otrzymałam mieszaniny izomerów *orto* i *para* allilofenoli w różnych stosunkach. Najlepszą wydajność reakcji otrzymywania izomeru *orto* uzyskałam z zastosowaniem tetraliny i ten rozpuszczalnik wybrałam do przeprowadzenia reakcji w większej skali (Tabela 1).



Schemat 13. Przegrupowanie Claisena związku **50**

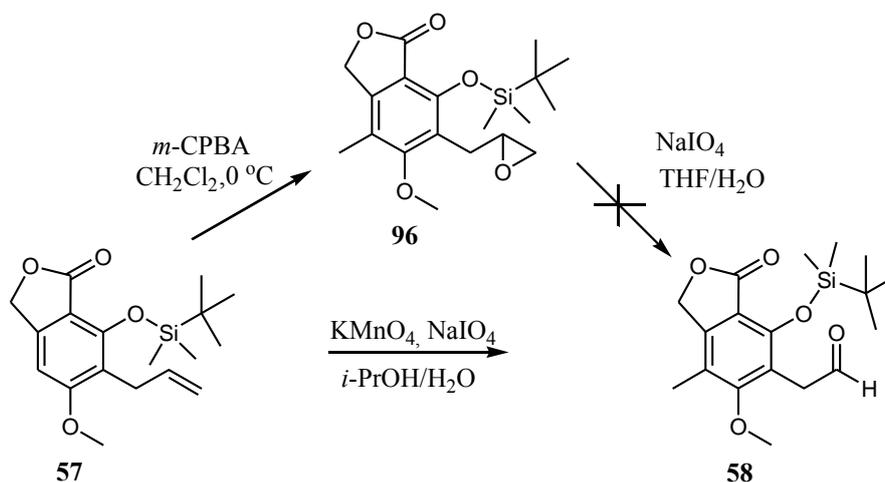
Tabela 1. Wydajności przegrupowania Claisena związku **50** w zależności od warunków reakcji

Rozpuszczalnik	Temp. reakcji [°C]	Wyd. [%]	Czas reakcji [godz.]
1,2,4,5-tetrametylobenzen	193-197	15	2×6
tetralina	206-208	73	1,5-2
4-chloro- <i>o</i> -ksylen	221-223	55,6	1,5-2
nitrobenzen	210	72	1,5-2

4.1.1.3. Synteza 1,3-dihydro-4-[(*tert*-butylodimetylosililo)oksy]-6-metoksy-7-metylo-3-okso-5-(prop-2,3-epoksy)izobenzofuranu **96** i związku **58**

W metodzie Pattersona otrzymanie aldehydu **58** przebiega na drodze ozonolizy alkenu **57** (Schemat 9). Alternatywnie, związek **58** można otrzymać w dwóch etapach: epoksydowania i utleniania do odpowiedniego aldehydu (Schemat 14). Syntezę epoksydu **96** planowałam przeprowadzić utleniając **57** za pomocą *m*-CPBA w temp. -70°C, w obecności octanu sodu, przy użyciu DCM jako rozpuszczalnika. Metoda ta została opisana w literaturze dla związków o podobnej strukturze [109]. Z powodu braku postępu reakcji (TLC) zastosowałam inną procedurę: mieszaninę reakcyjną schłodziłam do 0°C, dodałam jeden ekwiwalent *m*-CPBA i kontynuowałam mieszanie w temp. pok. przez 24 godz. [154]. Po tym czasie zaobserwowałam tworzenie się produktu, jednak przereagowanie substratu było niecałkowite. Dodanie drugiego ekwiwalentu *m*-CPBA w 0°C i kontynuacja mieszania przez kolejne 24 godz. prowadziła do otrzymania oczekiwanego epoksydu jako jedyne produktu.

Następnie zaplanowałam rozszczepienie epoksydu połączone z utlenianiem, prowadzące do uzyskania aldehydu **58** [101, 104]. Standardowo w tej reakcji używana jest mieszanina rozpuszczalników woda/THF, woda/dioksan, woda/acetonitryl. Pomimo wielu prób i modyfikacji metody nie udało mi się przeprowadzić epoksydu **96** w aldehyd **58**. Najprawdopodobniej odpowiedzialna jest za to duża objętościowo grupa TBS, utrudniająca otwieranie pierścienia oksiranowego. Dla związku **96** została wykonana i opublikowana struktura krystalograficzna [155]. Kolejnym krokiem było otrzymanie aldehydu **58** z użyciem KMnO_4 oraz NaIO_4 [156]. Alken **57** rozpuściłam w *i*-PrOH i dodawałam porcjami wodny roztwór KMnO_4 do zaniku substratu (TLC). Następnie dodałam NaIO_4 i po zakończeniu reakcji aldehyd **58** wyizolowałam na drodze SPE w układzie A, pobrałam próbkę do analizy $^1\text{HNMR}$, a resztę produktu poddałam od razu reakcji Grignarda (Schemat 9).

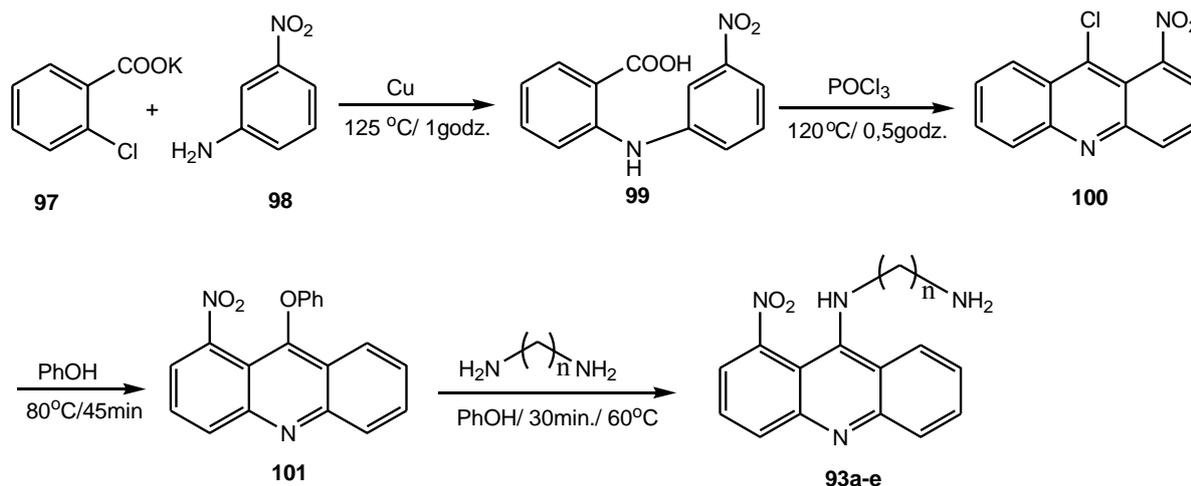


Schemat 14. Synteza związku **96** i **58**

Syntezy związków **59-61** wykonałam zgodnie z opisem podanym przez Pattersona [106]. Reakcja Grignarda w THF, przegrupowanie Claisena-Johnsona, zdjęcie osłony grupy hydroksylowej za pomocą $n\text{-Bu}_4\text{NF}$ i hydroliza estru metylowego pozwoliła na otrzymanie kwasu mykofenolowego **1**.

4.1.2. Synteza 9-(ω -alkiloamino)-1-nitroakrydyn 93a-e [139, 160-164, 168]

W celu otrzymania 9-(ω -alkiloamino)-1-nitroakrydyn **93a-e** przeprowadziłam reakcje przedstawione na Schemacie 15. Synteza obejmowała: reakcję Ullmanna pomiędzy związkami **97** i **98**, cyklizację POCl_3 , otrzymanie 9-fenoksy-1-nitroakrydyny **101** oraz kondensację z odpowiednimi dichlorowodorkami diamin alifatycznych.

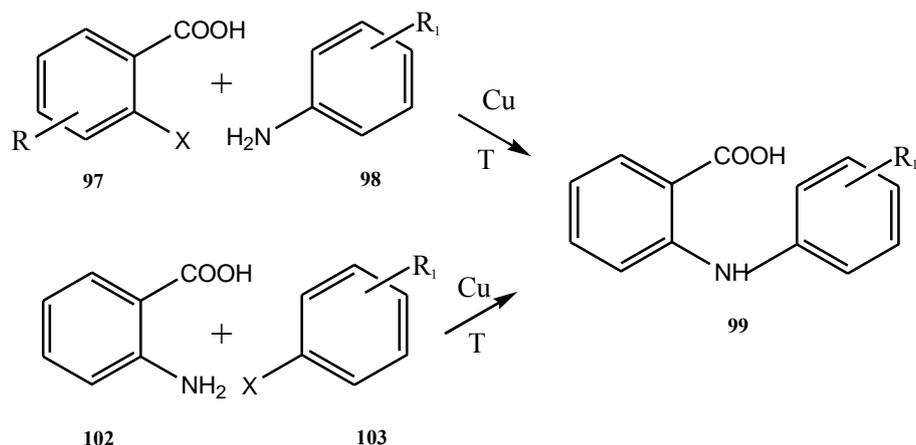


$n = 2\div 6$

Schemat 15. Synteza 9-alkiloamino-1-nitroakrydyn **93a-e**

4.1.2.1. Synteza kwasu *N*-(3'-nitrofenylo)antranilowego **99**

W literaturze opisano kilka metod syntezy pochodnych akrydyny [139, 157, 158]. Zdecydowana większość oparta jest na otrzymaniu w pierwszym etapie pochodnych kwasu *N*-fenyloantranilowego **99**. Najpopularniejszą metodą jest reakcja Ullmanna-Jourdana [159]. Procedurę tą zastosowałam w mojej pracy. Reakcja przebiega pomiędzy pochodną kwasu *o*-halogenobenzoesowego **97** i pochodną aniliny **98** lub pomiędzy kwasem antranilowym **102** i pochodnymi halogenobenzenu **103** w obecności katalitycznych ilości miedzi (Schemat 16) [160].



Schemat 16. Synteza pochodnych kwasu *N*-fenyloantranilowego **99** [139]

Na przebieg reakcji Ullmanna ma wpływ wiele czynników [139]:

a) rodzaj substratów - obecność grup elektroakceptorowych w pozycji *orto* i *para* do atomu chlorowca w pochodnych kwasu benzoowego oraz elektronodonorowych w aminie w tych pozycjach powodują wzrost wydajności. Obecność w pozycji *orto* lub *para* grup elektronodonorowych w pochodnej kwasu benzoowego i elektroakceptorowych w aminie utrudniają reakcję. Użycie jako substratu benzoesu sodu lub potasu powoduje wzrost wydajności.

b) katalizator - najczęściej stosowane są różne związki miedzi: sole miedzi - bromek, węglan, siarczan, octan, tlenek miedzi, miedź Raneya. Najlepsze wydajności osiąga się zazwyczaj stosując świeżo strąconą miedź i miedź aktywną. Związki żelaza, niklu, platyny i cynku są mniej reaktywne, a cyny i manganu nie wykazują żadnej aktywności katalitycznej.

c) środowisko reakcji - stosowanymi rozpuszczalnikami są alkohole: izoamylowy, amylowy, butylowy, cykloheksanol, a także nitrobenzen, chlorgen, DMSO, DMF, DMA. Wybór rozpuszczalnika jest uwarunkowany wymaganą temperaturą reakcji. Udoskonaleniem metody Ullmanna jest prowadzenie reakcji w stopie, bez użycia rozpuszczalników.

d) zasady - zwykle stosuje się węglan sodu lub potasu, który wiąże wydzielający się w reakcji halogenowódor.

e) temperatura i czas reakcji - zarówno zbyt wysoka temperatura, jak i przedłużanie czasu reakcji może prowadzić do otrzymania produktów smolistych, co obniża wydajność.

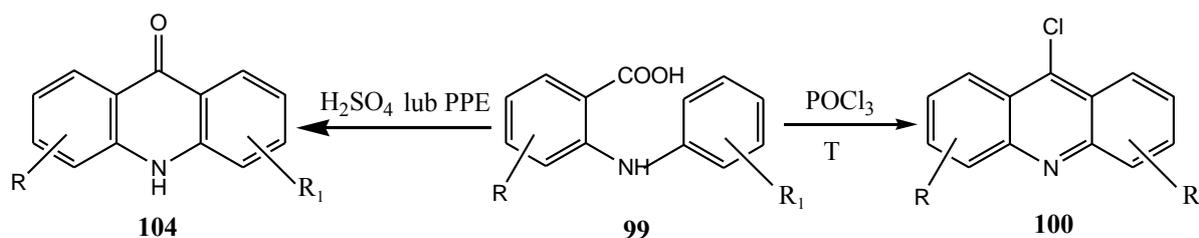
Ponieważ użycie soli potasowej kwasu *o*-halogenobenzoowego, prowadzenie reakcji w stopie oraz stosowanie świeżo strąconej miedzi jako katalizatora poprawiają wydajność reakcji Ullmanna, zastosowałam te warunki w przeprowadzonej przeze mnie syntezie (Schemat 15).

Do reakcji stosowałam dwukrotny nadmiar *m*-nitroaniliny w stosunku do soli potasowej kwasu *o*-chlorobenzoesowego. Początkowo syntezę prowadziłam w temperaturze 150°C przez 0,5 godz., uzyskując wydajności surowego produktu rzędu 30%. W warunkach tych powstają produkty smoliste. W następnej próbie, przeprowadzonej w temp. 125°C w czasie 1 godz., wydajność reakcji wzrosła do 50% dla surowego produktu i 35-38% po krystalizacji z etanolu. Katalizator przygotowywałam bezpośrednio przed reakcją.

4.1.2.2. Cyklizacja kwasu *N*-(3'-nitrofenylo)antranilowego **99** [139, 161]

Cyklizacja kwasów *N*-fenyloantranilowych zachodzi pod wpływem kwasów protonowych lub kwasów Lewisa. Najczęściej stosuje się: POCl₃, H₂SO₄, PCl₅, SOCl₂, AlCl₃ [139, 161]. Reakcja może przebiegać w dwóch kierunkach: do otrzymania pochodnych akrydyny albo akrydonu, zależnie od użytego odczynnika cyklizującego (Schemat 17). Zastosowanie POCl₃ prowadzi do otrzymania pochodnych 9-chloroakrydyny **100**. Odczynnikiem cyklizującym jest kwas protonowy, ponieważ reakcja nie zachodzi pod wpływem świeżo destylowanego POCl₃, lecz dopiero po dodaniu śladowych ilości wody lub halogenowodoru.

Do syntezy pochodnych akrydonu najczęściej używa się stężony kwas siarkowy. Zastosowanie H₂SO₄ jest ograniczone do związków nie posiadających w cząsteczce grup wrażliwych na jego działanie. W takim przypadku jako odczynnik dehydratujący stosuje się PPE w chloroformie [139].

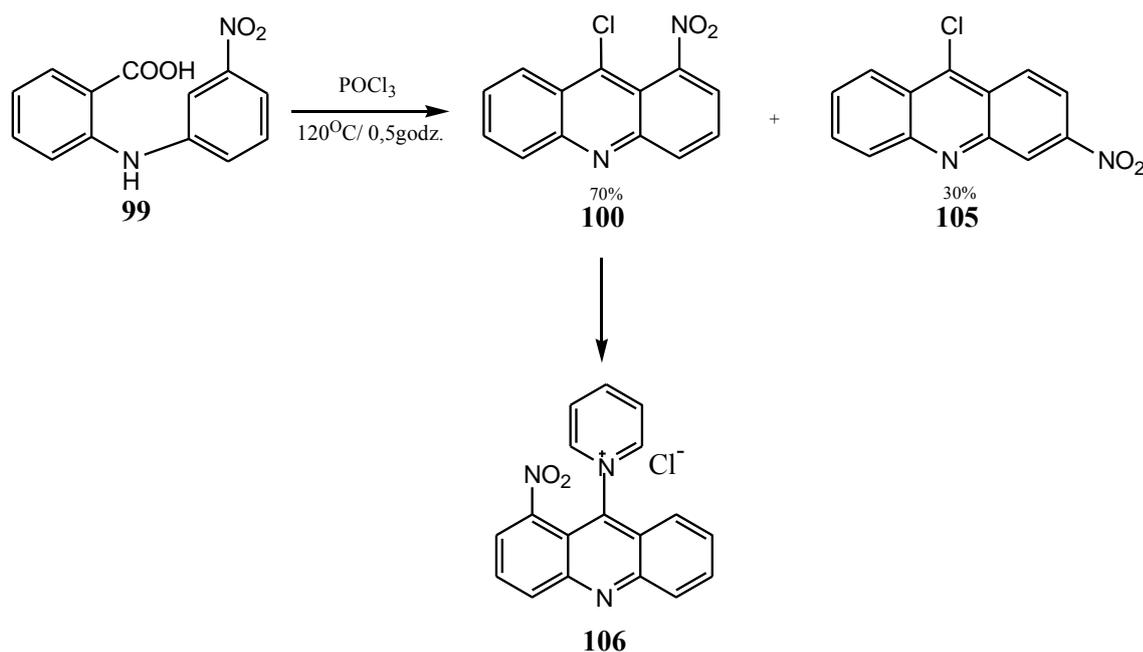


Schemat 17. Cyklizacja pochodnych kwasu *N*-(3'-nitrofenylo)antranilowego [139]

Cyklizację kwasu *N*-(3'-nitrofenylo)antranilowego **99** prowadziłam z nadmiarem POCl₃, służącym jako odczynnik kondensujący i środowisko reakcji. Substraty ogrzewałam 30 min. W temp. 125°C. Przedłużanie w czasie reakcji powodowało obniżenie wydajności.

Po zakończeniu syntezy i oddestylowaniu nadmiaru POCl₃ pod zmniejszonym ciśnieniem, rozcieńczyłam otrzymaną masę chloroformem. Roztwór ten wylałam do mieszaniny amoniak:chloroform (1:3, v/v), by usunąć pozostałości POCl₃.

Po rozdzieleniu faz, wysuszeniu warstwy organicznej MgSO₄ i odparowaniu rozpuszczalnika do sucha otrzymałam osad, będący mieszaniną izomerów: 1-nitro- (**100**) i 3-nitro-9-chloroakrydyny **105** (Schemat 18). Ich rozdział opiera się na różnej rozpuszczalności w pirydynie: izomer 1-nitro **100** tworzy rozpuszczalny kompleks, natomiast **105** jest nierozpuszczalna w tym rozpuszczalniku [162]. Do osadu dodałam pirydynę i odsączyłam związek **105**. Przesącz ogrzewałam w temp. 60°C przez 20 min., po czym oziębiłam. Wytrącony osad 1-nitro-9-chloroakrydyny odsączyłam pod zmniejszonym ciśnieniem. W reakcji cyklizacji izomery 1-nitro- i 3-nitro-9-chloroakrydyny powstają w stosunku 70:30, a jej wydajność jest ilościowa. Efektywność wydzielenia izomeru 1-nitro-9-chloroakrydyny **100** z kompleksu z pirydyną zależy od ilości użytej pirydyny. Oba izomery są bardzo nietrwałe i następny etap syntezy przeprowadzałam natychmiast po ich rozdziale.



Schemat 18. Synteza 1-nitro-9-chloroakrydyny **100** [162]

4.1.2.3. Synteza 9-fenoksy-1-nitroakrydyny **101** [163, 164]

1-Nitro-9-chloroakrydyna jest związkami nietrwałymi, dlatego poddaje się ją reakcji z fenolem (Schemat 15). Produktem reakcji jest 9-fenoksy-1-nitroakrydyna **101**, która może być przechowywana przez dłuższy czas.

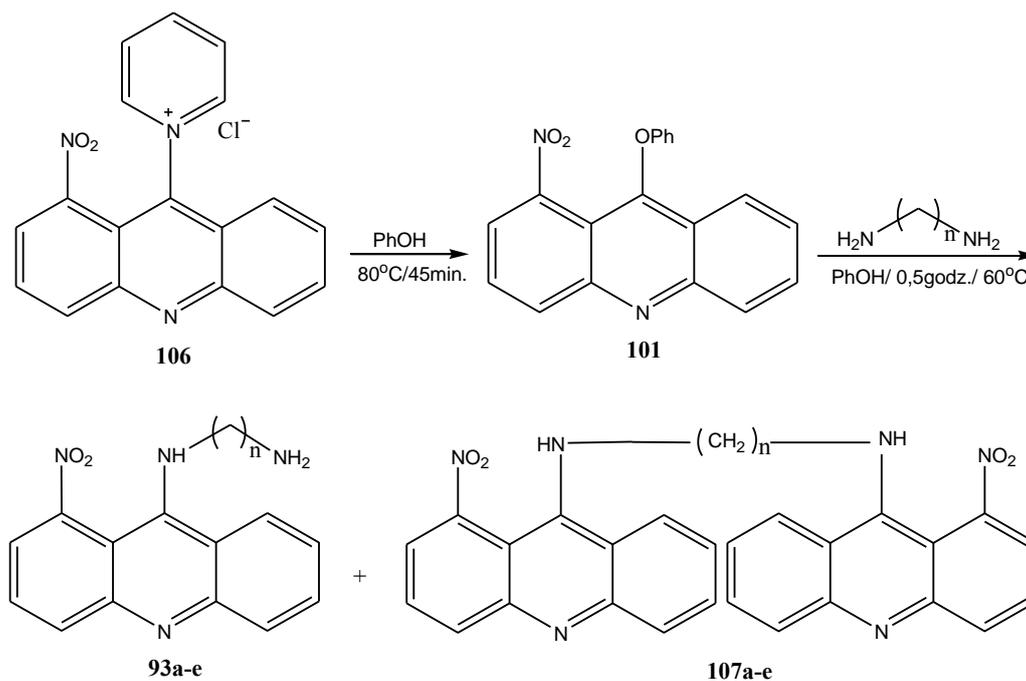
Ponadto, -OPh jest dobrą grupą odchodzącą, co ułatwia przeprowadzenie kondensacji **101** z dichlorowodorkami diamin alifatycznych. 1-Nitro-9-chloroakrydynę **100** ogrzewałam z fenolem (w stosunku 1:3) w temperaturze 80°C i czasie 30-45 min. (Schemat 15). Następnie gorący roztwór wylałam do mieszaniny benzen: 5% KOH (1:1, v/v), warstwy rozdzieliłam i warstwę organiczną wysuszyłam MgSO₄. Benzen odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem do sucha. Jeśli 9-fenoksy-1-nitroakrydyna nie wypadła od razu dodawałam eter dietylowy, który ułatwia wytrącenie czystego osadu.

4.1.2.4. Synteza 9-(ω -aminoetylo)amino-1-nitroakrydyn – metoda A

W literaturze opisane są dwie metody syntezy 9-(ω -aminoalkilo)amino-1-nitroakrydy: reakcja może zachodzić pomiędzy pochodną chloroakrydyny **100** i diaminą alifatyczną lub pochodną fenoksyakrydyny **101** i dichlorowodorkami diamin alifatycznych [160].

Kondensacja 9-fenoksy-1-nitroakrydyny **101** z dichlorowodorkami diamin alifatycznych prowadzi do uzyskania dwóch produktów: 9-(ω -aminoalkilo)amino-1-nitroakrydy **100** (40%) i dimeru **105** (60%) (Schemat 19). Syntezę prowadziłam z użyciem 2-krotnego nadmiaru dichlorowodorku w stosunku do 9-fenoksy-1-nitroakrydyny, w temp. 60°C przez 30 min. Temperatura reakcji uwarunkowana jest t.t. fenolu. Po zakończeniu syntezy mieszaninę reakcyjną rozcieńczyłam benzenem, zneutralizowałam fenol za pomocą zimnego KOH i otrzymane warstwy rozdzieliłam. Fazę organiczną wysuszyłam MgSO₄ i zakwasiłam HCl w eterze dietylowym. Wypadał osad dwóch chlorowodorków: 9-(ω -aminoalkilo)amino-1-nitroakrydy **93a-e** i dimeru **107a-e**. Mieszaninę rozdzielałam na kolumnie w układzie D.

9-(ω -Aminoalkilo)amino-1-nitroakrydyny są związkami nietrwałymi, pod wpływem światła i innych czynników szybko dimeryzują i ulegają utlenieniu do akrydonów.



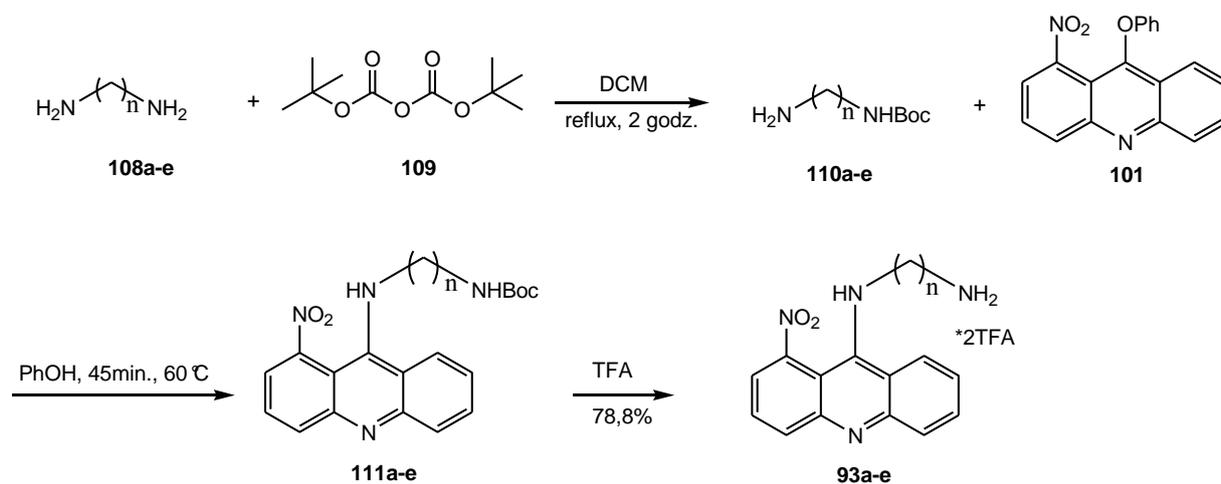
$n = 2-6$

Schemat 19. Synteza 9-(ω -aminoalkilo)amino-1-nitroakrydyn **93a-e** (metoda A)

4.1.2.5. Synteza 9-(ω -aminoetylo)amino-1-nitroakrydyn – metoda B

Kondensacja 9-fenoksy-1-nitroakrydyny **101** z dichlorowodorkami diamin alifatycznych prowadzi w przewadze do powstania niepożądanego dimeru **107**. Z tego powodu zaplanowałam i wykonałam syntezę związków **93a-e** z wykorzystaniem monochronionych diamin (Schemat 20). W pierwszym etapie jedną z grup aminowych etylenodiaminy **108a** selektywnie zabezpieczyłam za pomocą diwęglanu-di-*tert*-butylu **109** w DCM z wydajnością 71% [165]. Alternatywnie reakcję można przeprowadzić w THF [166] lub chloroformie [167].

Źródło literaturowe [165] podaje, że tak otrzymana *mono-N*-Boc-etylenodiamina ma czystość >99% (GC). Następnie aminę **110a** poddałam reakcji z 9-fenoksy-1-nitroakrydyną, otrzymując związek **111a**. Po usunięciu grupy ochronnej TFA, związek oczyszczałam za pomocą SPE. Sumaryczna wydajność reakcji 9-fenoksy-1-nitroakrydyny z *mono-N*-Boc-etylenodiaminą, zdjęcie osłony i oczyszczanie na kolumnie wyniosła 78,8%. W analogiczny sposób otrzymałam związki **111b-e** (Tabela 2). Metoda syntezy 9-(ω -aminoetylo)amino-1-nitroakrydyn z udziałem monochronionych diamin pozwala na znacznie wydajniejszą syntezę związków **93a-e** niż metoda A.



n = 2÷6

Schemat 20. Synteza 9-(ω-aminoalkilo)amino-1-nitroakrydyn **93a-e** (metoda B)

Tabela 2. Porównanie wydajności metod A i B otrzymywania związków **93a-e**

Nr związku	Metoda A [%]	Metoda B [%]	T.t. [°C] ¹
93a	41	79	227-229
93b	39	73	232-233
93c	46	75	189-191
93d	47	69	217-219
93e	49	71	216-217

¹ temp.top. zmierzone dla związków otrzymanych wg metody A

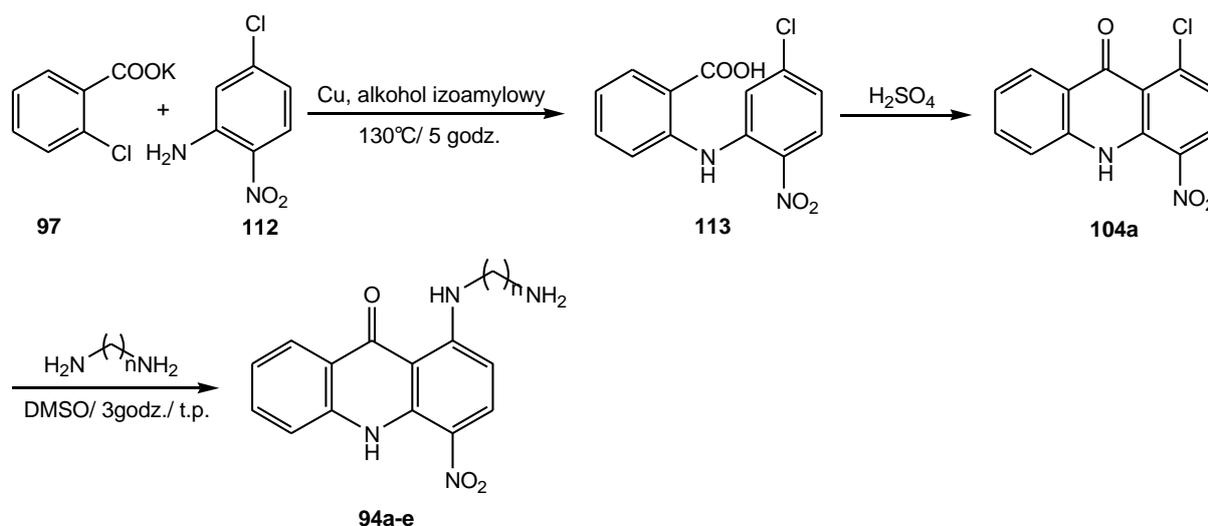
4.1.3. Synteza 1-(ω-aminoalkilo)-4-nitro-9(10H)akrydonów **94a-e**

Schemat 21 przedstawia syntezę 1-(ω-aminoalkilo)-4-nitro-9(10H)akrydonów **94a-e**. Analogicznie jak w przypadku pochodnych akrydyn **93a-e**, reakcja Ullmanna stanowi pierwszy etap syntezy. Substratami są: sól potasowa kwasu *o*-chlorobenzoesowego **97** i 3-nitro-5-chloroanilina **112**.

Cyklizacja związku **113** za pomocą H_2SO_4 i kondensacja akrydonu **104a** z odpowiednimi dichlorowodorkami diamin alifatycznych prowadzi do otrzymania 1-(ω -aminoalkilo)-4-nitro-9(10H)akrydonów **94a-e**. W odróżnieniu od syntezy pochodnych amino-akrydyny **93a-e**, reakcja otrzymywania pochodnych amino-akrydonu przebiega wyłącznie w kierunku tworzenia monomeru.

4.1.3.1. Synteza kwasu *N*-(3'-nitrochlorofenylo)antranilowego (Reakcja Ullmanna)

Reakcję Ullmanna soli potasowej kwasu *o*-chlorobenzoesowego **97** i 3-nitro-5-chloroaniliny **112** prowadziłam w świeżo destylowanym alkoholu izoamyłowym w temp. $130^\circ C$ przez 5 godz., w obecności katalitycznych ilości pyłu miedzi. Następnie alkohol oddestylowałam z parą wodną, a z pozostałości podestylacyjnej wytraciłam kwas *N*-(3'-nitrochlorofenylo)antranilowy **113** rozcieńczonym kwasem solnym z wydajnością 70% (Schemat 21).



Schemat 21. Synteza 1-(ω -aminoalkilo)-4-nitro-9(10H)akrydonów **94a-e**

4.1.3.2. Cyklizacja kwasu *N*-(3'-nitrochlorofenylo)antranilowego (Schemat 21)

Cyklizację kwasu *N*-(3'-nitrochlorofenylo)antranilowego **113** przeprowadziłam stężonym kwasem siarkowym lub oleum. Obecność wody w środowisku reakcji prowadzi do powstania mieszaniny: produktu i substratu. Cyklizację przeprowadzałam w czasie 1,5 godz. w temp. $95^\circ C$.

4.1.3.3. Kondensacja 1-chloro-4-nitro-9(10H)akrydonu z dichlorowodorkami diamin alifatycznych (Schemat 21) [165]

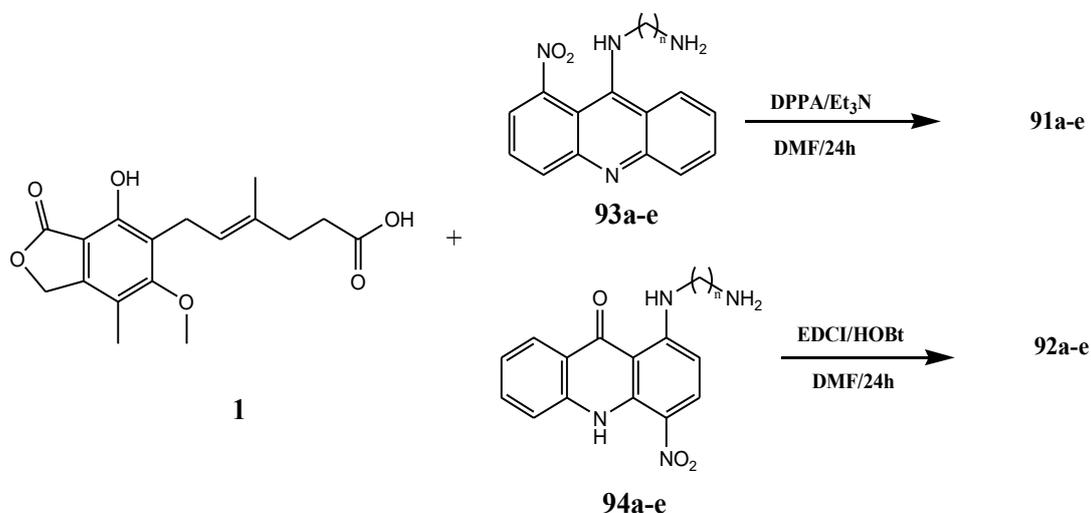
Reakcja kondensacji 1-chloro-4-nitro-9(10H)akrydonu **104a** z dichlorowodorkami diamin alifatycznych prowadzi do powstania 1-(ω -aminoalkilo)-4-nitro-9(10H)akrydonu **94a-e** jako jedyne go produktu. Do zawiesiny 1-chloro-4-nitro-9(10H)akrydonu **104a** w DMSO dodawałam dichlorowodorek diaminy alifatycznej oraz Et₃N. Reakcję prowadziłam 3 godz. w temp. pok. Po tym czasie rozcieńczyłam mieszaninę reakcyjną wodą i mieszałam 10 min. na mieszadle magnetycznym. Osad odsączyłam i przemyłam wodą. Surowy produkt przenieśliam do kolby, zakwasiłam rozcieńczonym HCl i mieszałam na mieszadle magnetycznym 10 minut. Osad odsączyłam i przesącz ekstrakowałam chloroformem. Warstwy rozdzieliłam, wysuszyłam MgSO₄ i rozpuszczalnik odparowałam. Za pomocą TLC stwierdziłam obecność produktu głównego **94a-e** oraz niewielką ilość substratu **104a**. Związki **94a-e** są trudno rozpuszczalne w powszechnie stosowanych rozpuszczalnikach. Stosunkowo dobrze rozpuszczają się w DMSO i DMF. Reakcje z ich udziałem często z konieczności biegają na granicy faz ciekłej i stałej. Słaba rozpuszczalność stanowi problem, gdy zachodzi konieczność ich oczyszczania. Zastosowanie tradycyjnej chromatografii kolumnowej nie jest możliwe, a opisana w literaturze krystalizacja nie jest wydajna, gdy oczyszcza się małe ilości akrydonu. Mieszaninę 1-chloro-4-nitro-9(10H)akrydonu **104a** i 1-(ω -aminoalkilo)-4-nitro-9(10H)akrydonu **94a-e** oczyszczałam stosując ekstrakcję do fazy stałej (SPE) w układzie faz „normalnych”. Metoda ta pozwala na naniesienie zawiesiny związku oczyszczanego. Zawiesinę związku **104a** i **94a-e** w chloroformie nanosiłam na kolumnę SPE o pojemności 15cm³ w ilości 50-70 mg. Po wprowadzeniu zawiesiny w złożę **104a** eluowałam chloroformem aż do całkowitego jego usunięcia. Następnie **94a-e** wymywałam metanolem (Tabela 3).

Tabela 3. Otrzymane 1-(ω -aminoalkilo)-4-nitro-9(10*H*)akrydony **94a-e**

Nr związku	wyd. [%]	t. t. [°C]
94a	66	122-124
94b	70	117-119
94c	73	133-135
94d	68	143-145
94e	65	149-151

4.1.4. Synteza analogów MPA z pochodnymi amino-akrydyny/akrydonu

Zaprojektowane analogi MPA **1** z pochodnymi amino-akrydyny/akrydonu **93a-e/94a-e** wymagają tworzenia wiązania amidowego pomiędzy tymi związkami (Schemat 22). W tym celu wytypowałam i przetestowałam następujące metody: mieszanych bezwodników, generowanie chlorku MPA *in situ* oraz zastosowanie odczynników kondensujących (DCC, EDCI, DPPA, EEDQ). Spośród nich do otrzymania analogów MPA z pochodnymi akrydyny wybrałam DPPA/Et₃N, w przypadku pochodnych akrydonu EDCI/HOBt. Wyselekcjonowane odczynniki kondensujące generowały produkty z najlepszymi wydajnościami i pozwalały na dokładne oczyszczenie związków **91a-e**, **92a-e** (Tabela 4). Próby otrzymania *in situ* chlorku MPA z użyciem (COCl)₂, w obecności DMF i dodawanie pochodnych akrydyn/akrydonów **93a-e**, **94a-e** nie prowadziły do powstawania produktów kondensacji.



Schemat 22. Synteza analogów MPA z pochodnymi akrydyny/akrydonu **91a-e**, **92a-e**

Tabela 4. Porównanie wydajności metod otrzymywania związków **91a**, **92a**

Nr związku	Metoda mieszanych bezwodników [%]	DCC [%]	EDCI [%]	DPPA [%]	EEDQ [%]
91a	53	31	35	72	41
92a	27	30	32	25	21,5

4.1.4.1. Synteza analogów MPA z pochodnymi amino-akrydyny (Schemat 22) [169, 170]

Roztwór MPA **1** i dichlorowodoru 9-(ω -aminoalkilo)amino-1-nitroakrydyny **93a-e** w DMF mieszałam na mieszadle magnetycznym w temp. 0°C. Dodałam DPPA, a następnie schłodzony roztwór Et₃N w DMF w ciągu 5 min. Mieszanie kontynuowałam w temp. 0°C przez 2 godz., a następnie 24 godz. w temp. pok. Po tym czasie DMF odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem, utrzymując możliwie niską temperaturę, ponieważ analogi MPA **91a-e** są wrażliwe na temperaturę i światło. Związki oczyszczałam za pomocą chromatografii kolumnowej lub SPE w układach D, E (Tabela 5).

Wyodrębnienie czystego analogu **91a-e** następuje kilka trudności: związek oczyszcza się kilkakrotnie metodą chromatografii kolumnowej. W przypadku użycia DPPA jako środka sprzęgającego powstaje mieszanina kilku produktów, niewiele różniących się R_f niezależnie od zastosowanego układu chromatograficznego.

Tabela 5. Analogi MPA z pochodnymi amino-akrydyny **91a-e**

Nr związku	n	Wzór cząsteczkowy	wyd. [%]
91a	2	C ₃₂ H ₃₂ N ₄ O ₇ (584,6)	72
91b	4	C ₃₃ H ₃₄ N ₄ O ₇ (598,6)	59
91c	4	C ₃₄ H ₃₆ N ₄ O ₇ (612,7)	55
91d	5	C ₃₅ H ₃₈ N ₄ O ₇ (626,7)	52
91e	6	C ₃₆ H ₄₀ N ₄ O ₇ (640,7)	49,5

4.1.4.2. Synteza analogów MPA z pochodnymi amino-akrydonu (Schemat 22)

[169, 171-172]

Na podstawie przeprowadzonych testów różnych metod tworzenia wiązania amidowego dla związku **92a** (Tabela 4) wybrałam EDCI jako odczynnik kondensujący do otrzymania serii analogów MPA z pochodnymi amino-akrydonu **92a-e**.

Roztwór MPA i HOBt w suchym DMF mieszałam w temp. pok. przez 10 minut. Następnie dodałam pochodnej amino-akrydonu **94a** w jednej porcji oraz EDCI. Stosunek MPA do akrydonu wynosił od 1:1 do 1:5. Nie zaobserwowałam wpływu stosowania nadmiaru akrydonu na wydajność reakcji. Syntezę prowadziłam kontrolując za pomocą TLC co dwie godziny przez 8 godz.(oraz po upływie 24 godz, 48 godz. i 72 godz). Po stwierdzeniu braku dalszego postępu reakcji po 24 godz., rozpuszczalnik odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem i związku oczyszczałam za pomocą SPE w układzie D. Wydajności reakcji wynosiły 27-32%. Spowodowane to było słabą rozpuszczalnością pochodnych nitroakrydonów i ich analogów z MPA. Zbliżone wydajności dla związków zawierających analogi akrydonów podają źródła literaturowe [171].

Tabela 6. Analogi MPA z pochodnymi amino-akrydonu **92a-e**

Nr związku	n	Wzór cząsteczkowy	wyd. [%]
92a	2	C ₃₂ H ₃₂ N ₄ O ₈ (600,6)	32
92b	3	C ₃₃ H ₃₄ N ₄ O ₈ (614,7)	33
92c	4	C ₃₄ H ₃₆ N ₄ O ₈ (628,8)	32
92d	5	C ₃₅ H ₃₇ N ₄ O ₈ (642,7)	29
92e	6	C ₃₆ H ₃₈ N ₄ O ₈ (656,8)	27

4.2. Badania biologiczne

Badania *in vitro* mające na celu testowanie potencjalnych terapeutyków powinny obejmować ocenę aktywności oraz toksyczności nowych związków. Wpływ substancji na proliferację (zdolność do replikacji DNA) komórek ocenia się stosując znakowane izotopowo prekursory np. metyl- ^3H -tymidynę, ^{14}C -urydynę, ^{14}C -adeninę, znakowany ^{32}P fosfor wbudowujące się do DNA podczas fazy S podziału komórkowego. Następnie przeprowadza się pomiar scyntylicyjny promieniowania β [173].

Alternatywnie, można zastosować bromodeoksyurydynę (BrdU), nieradioaktywny analog tymidyny, i dokonać pomiaru w cytometrze lub spektrofotometrze.

Do badania cytotoksyczności powszechnie stosuje się testy mające na celu określenie ilości żywych lub martwych komórek. Do metod bezpośrednich zalicza się: badania mikroskopowe, pomiary za pomocą elektronicznych liczników komórek oraz barwienie przyżyciowe, najczęściej z użyciem błękitu trypanu (BT) lub czerwieni obojętnej (NR). Do metod pośrednich należą pomiary oparte na badaniach aktywności enzymów, np. dehydrogenazy mleczanowej (LDH), *N*-acetylo- β -D-glukozaminidazy (test NAG), czy dehydrogenazy bursztynianowej (test MTT).

W wykonanych przeze mnie badaniach wykorzystałam test inkorporacji metyl- ^3H -tymidyny (TdR-3H) w celu oceny stopnia zahamowania proliferacji komórek pod wpływem związków **91a-e**, **92a-e**, **93a-e**, **94a-e**, **1** oraz metodę MTT do oceny żywotności komórek.

Pierwszą fazę badań aktywności antyproliferacyjnej i cytotoksycznej przeprowadziłam na kilku wyselekcjonowanych limfoidalnych liniach komórkowych.

Nieśmiertelne komórki ludzkich nowotworów hematologicznych stanowią dogodny model do wstępnych badań nowych związków immunosupresyjnych - wywodzą się z limfocytów i pozwalają na uzyskiwanie powtarzalnych wyników (standaryzacja). Dodatkowo każdy test wykonałam na jednej linii zwierzęcej (białaczka L1210 lub Yac-1).

Badania na liniach komórkowych pozwalają na wstępną ocenę, jaką aktywnością i cytotoksycznością charakteryzują się nowe analogi MPA w porównaniu do ich związków natywnych. W przypadku nowych substancji o potencjalnej aktywności biologicznej (dla związków **91a-e**, **92a-e** immunosupresyjnej) konieczne jest przeprowadzanie badań na komórkach docelowych. Dlatego w następnym kroku wykonałam testy antyproliferacyjne i żywotności z użyciem związków **91a-e**, **92a-e**, **93a-e**, **94a-e**, **1** wobec ludzkich limfocytów aktywowanych monoklonalnymi przeciwciałami anti-CD3/anti-CD28.

Badanie to stanowi model *in vitro* dla reakcji odpowiedzi immunologicznej, której wykładnikiem jest intensywne proliferacja limfocytów.

Testy na liniach komórkowych przeprowadziłam w trzech powtórzeniach dla sześciu stężeń badanych związków. Roztwory do badań przygotowywałam metodą seryjnych rozcieńczeń. We wszystkich przypadkach zależność pomiędzy stężeniem, a mierzonym parametrem (CPM w przypadku testu inkorporacji TdR-3H i absorbancji dla metody MTT) miała charakter liniowy lub do obliczeń wykorzystywałam tylko liniowy zakres wykresu. Wartości IC_{50} (dla testu MTT) i EC_{50} (dla testu inkorporacji TdR-3H) z wyznaczyłam na podstawie analizy regresji.

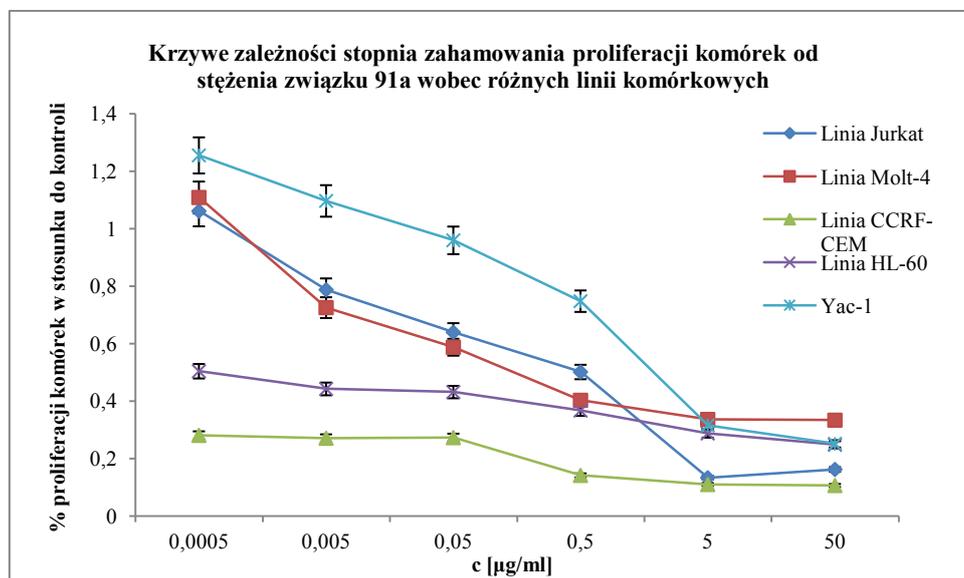
4.2.1. Oznaczanie aktywności antyproliferacyjnej badanych związków 91a-e, 92a-e, 93a-e, 94a-e, 1 metodą inkorporacji TdR-3H

W celu ilościowego określenia stopnia zahamowania proliferacji komórek pod wpływem badanych związków korzystne jest zastosowanie metody o dużej czułości np. wbudowywanie TdR-3H lub BrdU do DNA. Testy te dostarczają informacji na temat realnej aktywności badanych związków. Doniesienia literaturowe wskazują, że metody te mają zbliżoną efektywność [174]. Metaboliczna inkorporacja TdR-3H jest powszechnie używana do śledzenia szybkości biosyntezy DNA i proliferacji komórek. Stosując tą metodę trzeba mieć na uwadze, że inkorporacja TdR-3H może potencjalnie wywoływać zatrzymanie cyklu komórkowego, fragmentację DNA, aberracje chromosomalne, indukcję apoptozy *in vitro* oraz *in vivo*. Testy inkorporacji TdR-3H przeprowadziłam na liniach komórkowych (Jukrat, Molt-4, CCRF-CEM, HL-60, Yac-1) oraz komórkach PBMC.

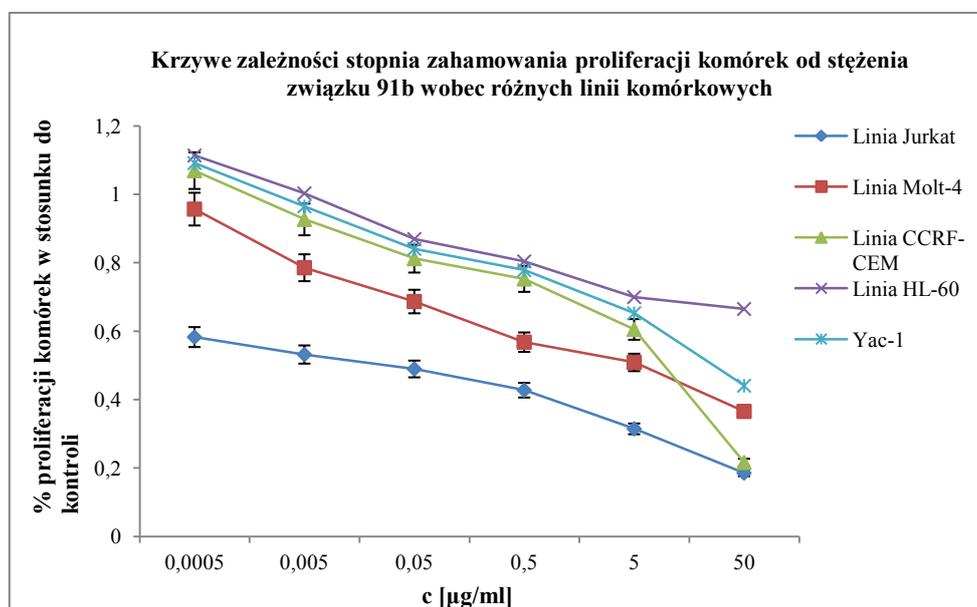
4.2.1.1. Oznaczanie aktywności antyproliferacyjnej badanych związków 91a-e, 92a-e, 93a-e, 94a-e, 1 metodą inkorporacji TdR-3H wobec linii komórkowych (Jukrat, Molt-4, CCRF-CEM, HL-60, Yac-1)

Linie komórkowe (Jukrat, Molt-4, CCRF-CEM, HL-60, Yac-1) inkubowałam na okrągłodennych płytkach 96-dółkowych ze związkami 91a-e, 92a-e, 93a-e, 94a-e, 1 przez 72 godz. Na ostatnie 18 godz. inkubacji dodawałam do każdego dołka TdR-3H. Komórki zbierałam na filtr celulozowy i dokonywałam pomiaru radioaktywności za pomocą licznika scyntylicyjnego fazy ciekłej. Metoda inkorporacji TdR-3H oparta jest o pomiar radioaktywności i mierzona jako CPM.

Na podstawie liniowej zależności CPM od stężenia badanego związku obliczałam wartości EC_{50} . Średnią z wartości CPM komórek kontrolnych przyjmowałam jako 100% i względem niej liczyłam procent zahamowania proliferacji (przykładowe krzywe: Wykres 1, 2).



Wykres 1. Przykładowe krzywe zależności stopnia zahamowania proliferacji komórek od stężenia (dla związku **91a** wobec różnych linii komórkowych – metoda inkorporacji TdR-3H)



Wykres 2. Przykładowe krzywe zależności stopnia zahamowania proliferacji komórek od stężenia (dla związku **92a** wobec różnych linii komórkowych - metoda inkorporacji TdR-3H)

Wyniki aktywności antyproliferacyjnej (wartości EC₅₀) związków **91a-e**, **92a-e**, **93a-e**, **94a-e**, **1** przedstawiają Tabela 7, 8.

Tabela 7. Wyniki aktywności antyproliferacyjnej (EC₅₀; µg/ml) związków **91a-e**, **93a-e**, **1** wyznaczone metodą inkorporacji TdR-3H (mediana±SD,); ¹ – związek najbardziej aktywny w serii

Nr związku	Jurkat	Molt-4	CCRF-CEM	HL-60	YAC-1
91a	0,29±0,054	0,56±0,046	0,029±0,0014	<0,0005 ¹	3,29±0,25
91b	0,24±0,048¹	0,6±0,02	<0,0005 ¹	0,0014±0,00043	1,24±0,095¹
91c	0,42±0,064	0,2±0,0049¹	<0,0005 ¹	0,0018±0,00033	2,16±0,34
91d	0,34±0,016	0,21±0,063	<0,0005 ¹	0,0077±0,00089	2,35±0,23
91e	0,32±0,078	1,86±0,43	0,037±0,0013	0,053±0,011	3,82±0,12
93a	0,5±0,17	0,086±0,01	0,016±0,0065	<0,0005	0,39±0,0067
93b	0,22±0,035	0,42±0,027	<0,0005	<0,0005	0,54±0,013
93c	0,014±0,008	0,71±0,096	<0,0005	<0,0005	0,46±0,0089
93d	0,016±0,003	0,39±0,0084	<0,0005	<0,0005	0,29±0,011
93e	0,09±0,024	0,56±0,029	0,0044±0,0026	<0,0005	0,36±0,08
1	0,53±0,082	0,41±0,053	0,013±0,0029	0,14±0,067	1,14±0,094

Tabela 7 przedstawia wartości EC₅₀ dla analogów kwasu mykofenolowego z pochodnymi amino-akrydyny **91a-e**, pochodnych amino-akrydyn **93a-e** oraz MPA **1**.

Wobec linii komórkowej Jurkat analogi **91a-e** charakteryzowały się niższą wartością EC₅₀ (0,24-0,42 µg/ml) niż MPA (0,53 µg/ml). Różnice w aktywności w porównaniu do kwasu mykofenolowego były statystycznie istotne (p w zakresie: 0,00014-0,0163) dla wszystkich związków **91a-e**. Najbardziej aktywny z serii - **91b** (p=0,00014) był ponad dwukrotnie bardziej aktywny niż MPA, natomiast najslabszą aktywność wykazywał analog **91c** (EC₅₀ 0,42 µg/ml; p=0,0163). Porównanie aktywności związków **91a-e** do ich natywnych pochodnych amino-akrydyn również wskazuje na statystycznie istotne różnice (Załącznik 1, Tabela 1), z wyjątkiem związku **91b** (p=0,619). Dla linii Molt-4 obserwowałam analogiczną tendencję, jak dla komórek Jurkat.

Aktywność analogów **91a-e** (EC_{50} w zakresie 0,2-1,86 $\mu\text{g/ml}$) była jednak nieco słabsza w porównaniu do kwasu mykofenolowego (EC_{50} 0,41 $\mu\text{g/ml}$). Obserwowane różnice aktywności w porównaniu do MPA nie były statystycznie istotne dla związków **91a-e**. Analogii **91c**, **91d** ($p=2 \times 10^{-4}$) były dwukrotnie bardziej aktywne niż MPA. Związek **91e** charakteryzował się znaczącym spadkiem aktywności ($p=0,0011$). Porównanie właściwości antyproliferacyjnych analogów **91b-e** do ich wyjściowych akrydyn pozwalały stwierdzić pomiędzy nimi statystycznie istotne różnice (p w zakresie $1,3 \times 10^{-4}$ - 8×10^{-6}).

Wobec komórek CCRF-CEM analogi **91a-e** (EC_{50} w zakresie 0,0005-0,037 $\mu\text{g/ml}$) wykazywały aktywność co najmniej tego samego rzędu co MPA (EC_{50} 0,013 $\mu\text{g/ml}$). Pochodne **91b-d** charakteryzowały się bardzo korzystnymi wartościami EC_{50} w porównaniu do MPA (EC_{50} poniżej 0,0005 $\mu\text{g/ml}$; $p=1,2 \times 10^{-5}$). Wynika to z wpływu składowych **93b-d**, które wykazywały najsilniejszą aktywność wobec tej linii w obrębie pochodnych amino-akrydyny.

Linia HL-60 była wrażliwa na działanie pochodnych akrydyny **93a-e** (EC_{50} poniżej 0,0005 $\mu\text{g/ml}$). Następstwem tego były dobre aktywności analogów **91a-e** (EC_{50} w zakresie 0,0005-0,053 $\mu\text{g/ml}$; $p=6,6 \times 10^{-3}$ - 7×10^{-4}) w porównaniu do MPA (EC_{50} 0,14 $\mu\text{g/ml}$). Zaobserwowałam tendencję, że aktywność związków **91a-e** malała w miarę wzrostu liczby atomów węgla (n) w łączniku.

Linia mysiej białaczki Yac-1 charakteryzowała się najsłabszą wrażliwością na działanie związków **91a-e**. Wartości EC_{50} analogów i kwasu mykofenolowego były tego samego rzędu (EC_{50} odpowiednio 1,24-3,82 $\mu\text{g/ml}$; 1,14 $\mu\text{g/ml}$). Jednak zanotowany spadek aktywności był istotny statystycznie (p w zakresie $0,0174$ - 2×10^{-7}). Najaktywniejszy związek w serii - **91b** miał tylko nieznacznie słabszą aktywność (EC_{50} 1,24 $\mu\text{g/ml}$; $p=0,0174$) w porównaniu do MPA (EC_{50} 1,14 $\mu\text{g/ml}$). W odniesieniu do wyjściowych amino-akrydyn **93a-e**, analogi **91a-e** charakteryzowały się znaczącym spadkiem aktywności.

Z przeprowadzonych testów screeningowych na liniach komórkowych wynikało, że pochodne **91a-e** zachowywały aktywność charakterystyczną dla ich związków natywnych. Konkretnie wartości EC_{50} zależały od wrażliwości linii komórkowej. Komórki Jurkat i Molt-4 charakteryzowały się zbliżoną wrażliwością na działanie analogów **91a-e**.

Tabela 8. Wyniki aktywności antyproliferacyjnej (EC_{50} ; $\mu\text{g/ml}$) związków **92a-e**, **94a-e**, **1** wyznaczone metodą inkorporacji TdR-3H (mediana \pm SD); ¹ – związek najbardziej aktywny w serii

Nr związku	Jurkat T	MOLT-4	CCRF-CEM	HL-60	YAC-1
92a	0,016 \pm 0,0043	3,17 \pm 0,25	5,3\pm0,5¹	>50	1,71\pm0,079¹
92b	0,0063 \pm 0,00088	5,92 \pm 0,8	>50	>50	1,9 \pm 0,049
92c	0,0022\pm0,00046¹	5,29 \pm 0,42	>50	>50	5,12 \pm 0,15
92d	0,0093 \pm 0,00024	7,12 \pm 0,64	>50	>50	6,77 \pm 0,23
92e	0,087 \pm 0,0053	1,86\pm0,55¹	6,7 \pm 0,59	>50	>50
94a	0,022 \pm 0,0071	1,97 \pm 0,23	<0,0005	0,59 \pm 0,088	0,26 \pm 0,08
94b	0,18 \pm 0,09	6,26 \pm 1,02	0,013 \pm 0,0036	0,63 \pm 0,043	2,33 \pm 0,16
94c	0,17 \pm 0,033	3,14 \pm 0,36	0,01 \pm 0,0069	1,83 \pm 0,051	>50
94d	0,089 \pm 0,029	2,31 \pm 0,72	0,047 \pm 0,005	0,84 \pm 0,032	>50
94e	0,091 \pm 0,0015	3,87 \pm 0,14	0,12 \pm 0,017	1,22 \pm 0,037	>50
1	0,53 \pm 0,082	0,41 \pm 0,053	0,013 \pm 0,0029	0,14 \pm 0,067	1,14 \pm 0,094

Tabela 8 przedstawia wartości EC_{50} uzyskane metodą inkorporacji TdR-3H dla analogów MPA **92a-e** i ich związków natywnych **94a-e**, **1** wobec linii komórkowych.

Komórki Jurkat były najbardziej wrażliwe spośród testowanych na działanie analogów MPA **92a-e**. Wszystkie pochodne były bardziej aktywne niż kwas mykofenolowy na poziomie istotnym statystycznie ($p=1,29 \times 10^{-4}$ - 10^{-6}). Związek **92c** wykazywał bardzo wysoką aktywność (wartość EC_{50} poniżej 0,0005 $\mu\text{g/ml}$; $p=10^{-6}$). W przypadku tej linii połączenie pochodnych amino-akrydonu **94a-e** (EC_{50} w zakresie 0,022-0,18 $\mu\text{g/ml}$) z MPA **1** (EC_{50} 0,53 $\mu\text{g/ml}$) wykazało efekt synergistyczny w aktywności antyproliferacyjnej.

Pozostałe linie komórkowe były mniej wrażliwe na analogi MPA **92a-e**. Spowodowane jest to znacznie słabszą aktywnością antyproliferacyjną pochodnych amino-akrydonu **94a-e** w porównaniu do pochodnych amino-akrydyny **93a-e**.

W przypadku linii Molt-4 wszystkie związki **92a-e** były mniej aktywne (p w zakresie $2,3 \times 10^{-4}$ - 2×10^{-7}) niż MPA (EC_{50} odpowiednio: 1,86-7,12 $\mu\text{g/ml}$; 0,41 $\mu\text{g/ml}$). Połączenie **1** z pochodnymi amino-akrydonu skutkowało spadkiem aktywności antyproliferacyjnej o rząd wielkości ($p=6-7,5 \times 10^{-5}$).

Wobec komórek linii CCRF-CEM spadek aktywności był bardziej znaczący. Tylko związki **92a**, **92e** zachowały aktywność (EC_{50} odpowiednio 5,81 $\mu\text{g/ml}$; 6,7 $\mu\text{g/ml}$), jednak o dwa rzędy wielkości słabszą ($p=0$), niż MPA (EC_{50} 0,013 $\mu\text{g/ml}$). Kwas mykofenolowy i pochodne amino-akrydonu (EC_{50} w zakresie 0,013-0,12 $\mu\text{g/ml}$) osobno wykazywały aktywność antyproliferacyjną przeciw CCRF-CEM. Połączenie tych związków skutkowało drastycznym spadkiem aktywności. Dla linii HL-60 zanotowałam analogiczną tendencję: istotny spadek aktywności analogów MPA **92a-e** (EC_{50} w zakresie: 201,53-627,22 $\mu\text{g/ml}$; $p=0$) w stosunku do MPA (EC_{50} 0,14 $\mu\text{g/ml}$) i pochodnych amino-akrydonu **94a-e** (EC_{50} w zakresie: 0,59-1,83 $\mu\text{g/ml}$; $p=0$). Dla linii mysiej białaczki Yac-1 analogi **92a-d** wykazywały aktywność (EC_{50} 1,71-6,77 $\mu\text{g/ml}$) tego samego rzędu co MPA (EC_{50} 1,14 $\mu\text{g/ml}$). Jednak spadek aktywności w porównaniu do MPA był istotny statystycznie ($p=1,2 \times 10^{-5}$ -0).

4.2.1.2. Oznaczanie aktywności antyproliferacyjnej badanych związków 91a-e, 92a-e, 93a-e, 94a-e, 1 metodą inkorporacji tymidyny znakowanej trytem (TdR-3H) wobec aktywowanych limfocytów

Po przeprowadzeniu wstępnych badań na liniach komórkowych wykazałam, że analogi MPA **91a-e**, **92a-e** w większości przypadków zachowały aktywność antyproliferacyjną. Następnie przystąpiłam do testowania tych związków na komórkach docelowych dla leków immunosupresyjnych – ludzkich limfocytach. Krew obwodową do testów proliferacyjnych pozyskiwałam z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Gdańsku (KCKiK). Komórki PBMC izolowałam drogą wirowania kożuszka leukocytarnego w gradiencie ficollu i uropoliny. Erytrocyty usuwałam za pomocą buforu lizującego. W celu oddzielenia monocytów wykorzystywałam zdolność tych komórek do adhezji. Limfocyty zbierałam z nadsączem, pozostawiając monocyty przylegające do dna szalek Petriego. Badania hamowania proliferacji aktywowanych limfocytów pod wpływem związków **91a-e**, **92a-e**, **93a-e**, **94a-e**, **1** przeprowadziłam w pięciu niezależnych testach, każdorazowo z trzema powtórzeniami. Limfocyty umieszczałam na 96-dołkowych U-kształtnych płytkach.

Do każdego dołka dodawałam monoklonalne przeciwciała anti-CD3/anti-CD28 (plastikowe kulki opłaszczane przeciwciałami) w celu stymulacji namnażania komórek w stosunku 1:1 (limfocyty:kulki). Limfocyty inkubowałam z badanymi związkami w czasie 96 godz., dodając na ostatnie 18 godz. do każdego dołka TdR-3H (0.5 μ Ci/dołek).

Następnie postępowalam w sposób opisany dla linii komórkowych (punkt 4.2.1.1.). Uzyskane przeze mnie wyniki aktywności antyproliferacyjnej (EC_{50}) przedstawiają: Tabela 9, 10.

Tabela 9. Wyniki aktywności antyproliferacyjnej (EC_{50}) związków **91a-e**, **93a-e**, **1** wyznaczone metodą inkorporacji TdR-3H wobec komórek PBMC (μ g/ml; mediana \pm SD); ¹ – związek najbardziej aktywny w serii, A-E –niezależne „kożuszki”

Nr związku	PBMC A	PBMC B	PBMC C	PBMC D	PBMC E
91a	< 0,0005 ¹	0,0086 \pm 0,0004	< 0,0005 ¹	< 0,0005 ¹	0,0084 \pm 0,00082
91b	0,0043 \pm 0,00011	0,0018 \pm 0,00044	< 0,0005 ¹	< 0,0005 ¹	0,0082 \pm 0,00096
91c	< 0,0005 ¹	< 0,0005 ¹	< 0,0005 ¹	< 0,0005 ¹	0,0013\pm0,0001 ¹
91d	< 0,0005 ¹	< 0,0005 ¹	< 0,0005 ¹	0,0041 \pm 0,00081	0,0091 \pm 0,00076
91e	< 0,0005 ¹	< 0,0005 ¹	< 0,0005 ¹	0,0026 \pm 0,00016	0,0086 \pm 0,00012
93a	<0,0005	<0,0005	<0,0005	0,0081 \pm 0,00015	0,0075 \pm 0,00096
93b	<0,0005	<0,0005	<0,0005	<0,0005	0,0089 \pm 0,00021
93c	<0,0005	<0,0005	<0,0005	<0,0005	0,0076 \pm 0,00064
93d	<0,0005	<0,0005	<0,0005	<0,0005	<0,0005
93e	<0,0005	<0,0005	<0,0005	0,0034 \pm 0,00099	0,0059 \pm 0,0017
1	0,0085 \pm 0,00028	0,029 \pm 0,001	0,0054 \pm 0,00095	0,035 \pm 0,0088	0,0092 \pm 0,033

Indywidualna odpowiedź na terapię z zastosowaniem MPA wykazuje znaczne zróżnicowanie u pacjentów (Rozdział 2.4.4.1.). Z tego powodu istotne było wykonanie testów nowych analogów MPA na „kożuszkach” pochodzących od kilku dawców.

Tabela 9 prezentuje wartości EC_{50} uzyskane dla związków **91a-e**, **93a-e**, **1**. Wszystkie analogi MPA wykazywały silne działanie antyproliferacyjne wobec ludzkich limfocytów, niezależnie od liczby atomów węgla w łączniku. Związki **91a-e** charakteryzują się wartościami EC_{50} zbliżonymi do ich natywnych amino-akrydyn **93a-e** (w przypadku „kożuszków” A-C $p=1$). Wartości te były korzystniejsze niż EC_{50} MPA o co najmniej rząd wielkości (z wyjątkiem „kożuszka” D) na poziomie statystycznie istotnym (w większości przypadków $p=0$). Dane z Tabeli 9 wskazują, że aktywność antyproliferacyjna MPA waha się w granicach 0,0054-0,035 $\mu\text{g/ml}$ (0,11-0,017 μM) i jest zgodna z danymi literaturowymi np. 0,058 μM [129] wyznaczanymi analogiczną metodą.

Tabela 10. Wyniki aktywności antyproliferacyjnej (EC_{50}) związków **92a-e**, **94a-e** wyznaczone metodą inkorporacji TdR-3H wobec komórek PBMC ($\mu\text{g/ml}$; mediana \pm SD);
¹ – związek najbardziej aktywny w serii, A-F –niezależne „kożuszki”

Nr związku	PBMC A	PBMC B	PBMC C	PBMC D	PBMC F
92a	<0,0005 ¹	0,0027\pm0,00089¹	0,0079 \pm 0,0015	0,0028\pm0,00066¹	0,01\pm0,00038¹
92b	<0,0005 ¹	0,054 \pm 0,009	0,0019\pm0,00004¹	0,033 \pm 0,0025	0,035 \pm 0,0059
92c	0,029 \pm 0,00074	0,061 \pm 0,098	0,0026 \pm 0,00066	0,052 \pm 0,0071	0,063 \pm 0,0035
92d	0,056 \pm 0,0001	0,068 \pm 0,0038	0,0043 \pm 0,0014	0,077 \pm 0,0042	0,078 \pm 0,0034
92e	0,19 \pm 0,0082	0,15 \pm 0,039	0,0082 \pm 0,0007	0,0047 \pm 0,36	0,013 \pm 0,0048
94a	0,0037 \pm 0,00046	0,0029 \pm 0,00081	0,013 \pm 0,004	0,018 \pm 0,0025	0,015 \pm 0,0012
94b	0,0013 \pm 0,00041	0,002 \pm 0,00047	0,027 \pm 0,0026	0,016 \pm 0,008	0,0038 \pm 0,00051
94c	<0,0005	0,043 \pm 0,0031	0,011 \pm 0,0048	0,026 \pm 0,0017	0,018 \pm 0,0063
94d	<0,0005	0,026 \pm 0,0026	0,0082 \pm 0,00077	0,032 \pm 0,0052	0,0032 \pm 0,00035
94e	<0,0005	0,013 \pm 0,0018	0,0049 \pm 0,00017	0,016 \pm 0,0022	0,0047 \pm 0,00035
1	0,0085 \pm 0,00028	0,029 \pm 0,001	0,0054 \pm 0,00095	0,035 \pm 0,0088	0,0094 \pm 0,00075

W Tabeli 10 przedstawiłam wartości EC_{50} dla analogów MPA **92a-e** oraz ich natywnych związków **94a-e**, **1**. Charakteryzowały się one słabszą aktywnością antyproliferacyjną niż analogi zawierające pochodne akrydyny w swojej strukturze.

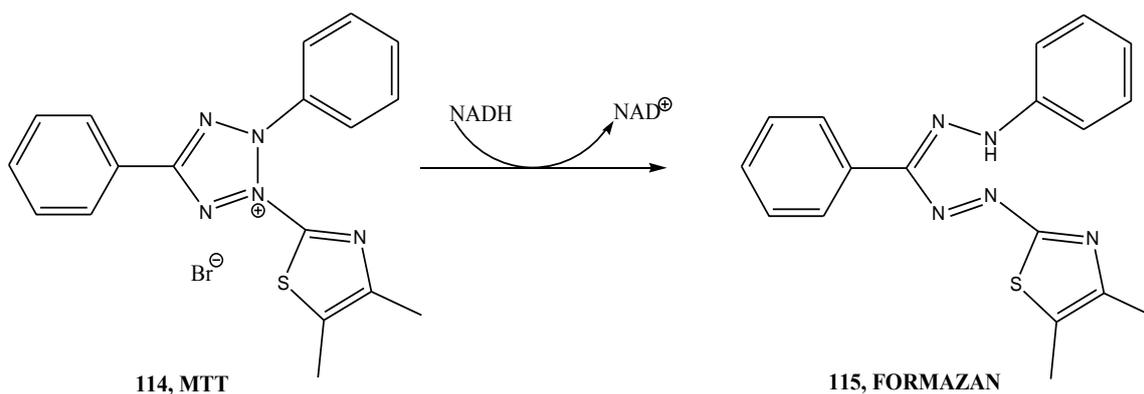
Aktywowane limfocyty były jednak znacznie bardziej wrażliwe na działanie analogów MPA **92a-e** niż limfoidalne linie komórkowe. Dane przedstawione w Tabeli 10 wskazują, że wartości EC_{50} dla najaktywniejszych analogów zawierały się w zakresie 0,0005 $\mu\text{g/ml}$ („kożuszek” A) - 0,01 $\mu\text{g/ml}$ („kożuszek” F). Widoczna jest tendencja, że najsilniejszą aktywność wykazywały związki **92a-b**, zawierające w łączniku odpowiednio 2 i 3 atomy węgla. Dla PBMC A-D najaktywniejsze analogi charakteryzowały się silniejszą aktywnością antyproliferacyjną niż MPA. Dla kożuszka F EC_{50} najaktywniejszego związku **92a** (EC_{50} 0,01 $\mu\text{g/ml}$) oraz MPA (EC_{50} 0,0094 $\mu\text{g/ml}$;) były zbliżone, pomimo notowanej istotności statystycznej ($p=0,023$).

4.2.2. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej badanych związków 91a-e, 92a-e, 93a-e, 94a-e, 1 metodą MTT

Po oznaczeniu aktywności antyproliferacyjnej, kolejnym istotnym do określenia parametrem jest cytotoksyczność badanych analogów. Może to prowadzić do wyselekcjonowania spośród związków o tej samej aktywności antyproliferacyjnej najmniej cytotoksycznego. W celu określenia żywotności komórek poddanych działaniu badanych analogów MPA i ich macierzystych związków posłużyłam się metodą MTT. Spośród ilościowych metod kolorymetrycznych test MTT jest jednym z najczęściej stosowanych i powszechnie zalecany jako referencyjny w badaniach cytotoksyczności [175, 176]. Użyteczność testów kolorymetrycznych, w tym MTT, polega na możliwości pomiaru dużej liczby próbek i zmniejszeniu kosztów podczas użycia 96-dołkowych płytek.

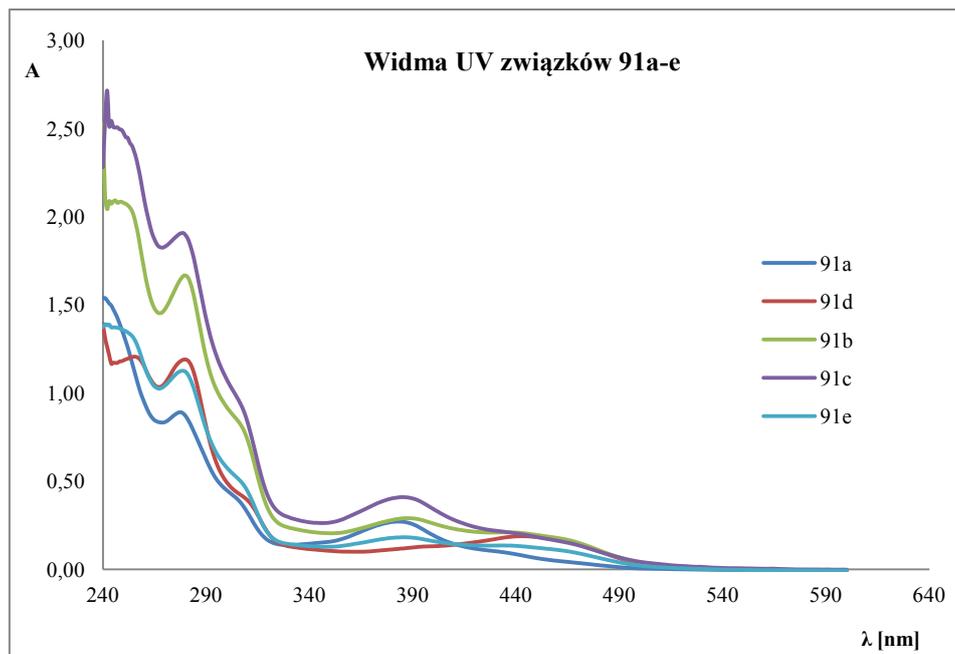
Metoda oparta jest na redukcji MTT (związek rozpuszczalny w wodzie) przez enzym mitochondrialny - dehydrogenazę bursztynianową do formazanu, wytrącającego się w postaci fioletowych kryształów (Schemat 23). Intensywność zabarwienia roztworu po rozpuszczeniu kryształów (DMSO, izopropanol, DMF), mierzona spektrofotometrycznie, jest proporcjonalna do liczby żywych komórek. Niedogodnością związaną ze stosowaniem testu MTT jest konieczność rozpuszczania wytrąconego formazanu za pomocą rozpuszczalników organicznych. Dostępna jest modyfikacja metody, w której MTT zastąpiono XTT. Związek ten tworzy produkt rozpuszczalny w wodzie [177], co upraszcza przeprowadzanie testu i zmniejsza wielkość popełnianego błędu.

MTT jest redukowany głównie przez dehydrogenazy mitochondrialne, jednak w niektórych liniach komórkowych ponad 50% MTT wnikałego przez błonę komórkową może być redukowane przez enzymy niemitochondrialne - cytoplazmatyczne i mikrosomalne [178, 179]. Niezależnie od tego, przyjmuje się, że szybkość redukcji MTT jest ściśle związana z liczbą aktywnych metabolicznie komórek, ponieważ ustanie funkcjonowania mitochondriów następuje kilka minut po śmierci komórki.

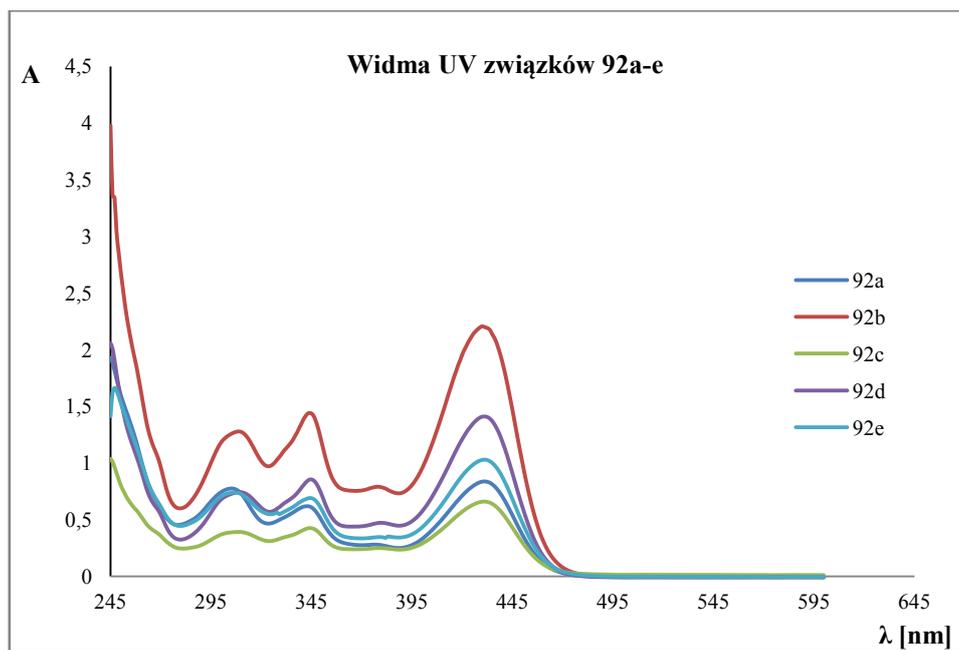


Schemat 23. Reakcja enzymatyczna katalizowana przez dehydrogenazę bursztynianową

Przed przystąpieniem do testów metodą MTT wykonałam widma UV związków **91a-e**, **92a-e** (w CHCl_3) i $c=0,005\%$ (Wykres 3, 4). Prezentowane zakresy absorpcji **91a-e**, **92a-e** stanowią sumę absorpcji MPA **1** (zakres poniżej 340 nm) oraz związków **93a-e**, **94a-e**. Pomiary dla testu MTT są dokonywane przy długości fali 570 nm. Widma UV wskazują, że badane związki nie absorbują promieniowania w zakresie pomiarów dla testu MTT.



Wykres 3. Widma UV związków **91a-e**

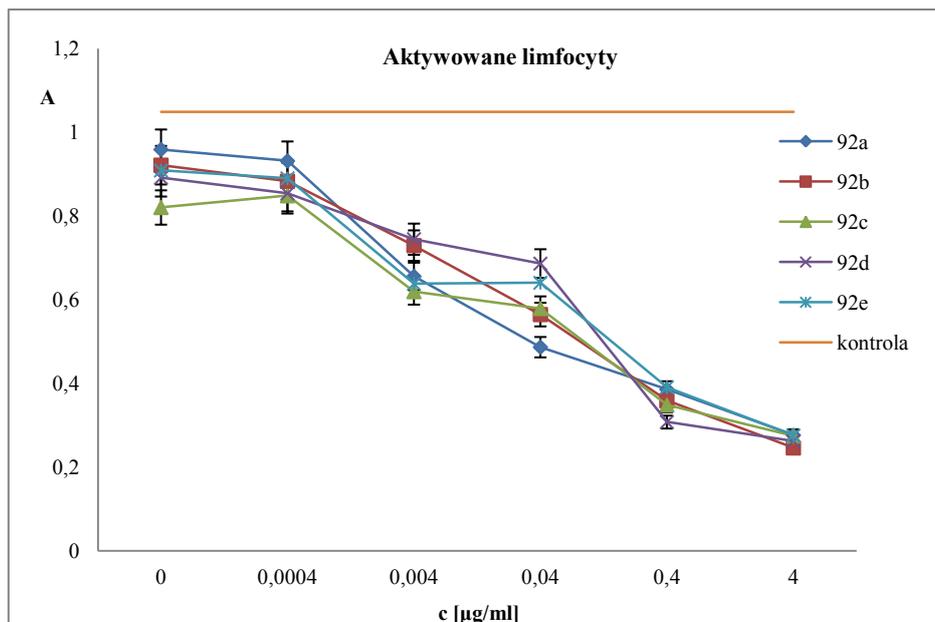


Wykres 4. Widma UV związków **92a-e**

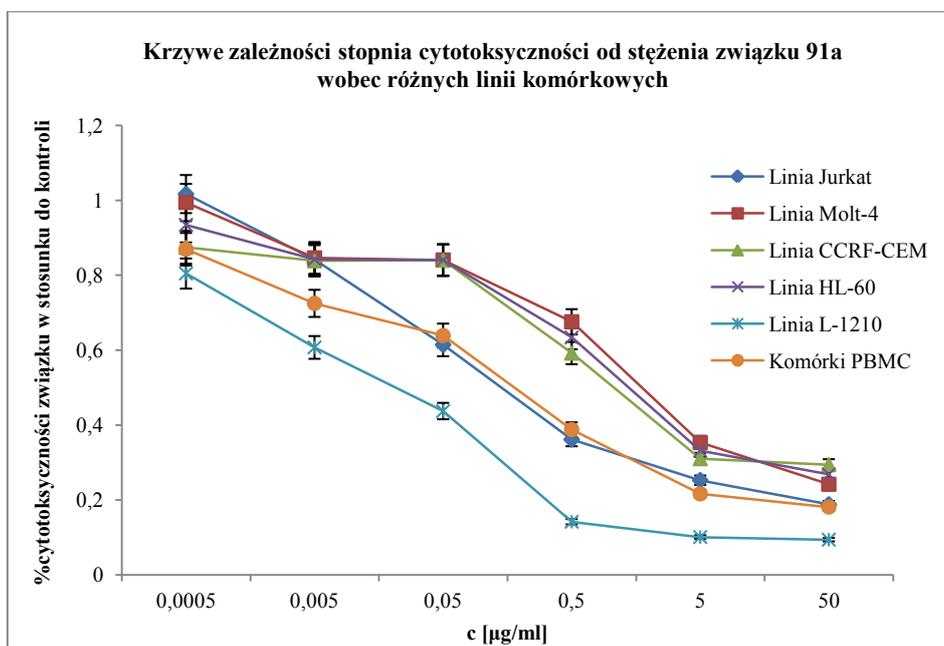
4.2.2.1. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej badanych związków 91a-e, 92a-e, 93a-e, 94a-e, 1 wobec linii komórkowych i PBMC metodą MTT

Do oznaczenia aktywności cytotoksycznej metodą MTT wyselekcjonowałam różne typy białaczek, reprezentowane przez następujące linie komórkowe: Jurkat (ALL), Molt-4 (ALL), CCRF-CEM (ALL), HL-60 (AML), L-1210 (mysia przewlekła białaczka). Badania przeprowadziłam również na komórkach PBMC.

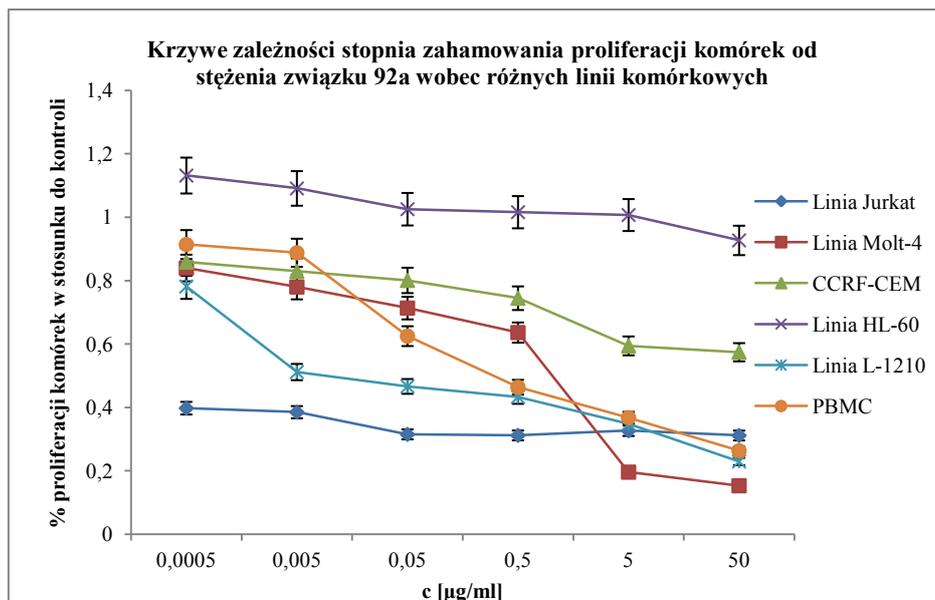
Linie komórkowe inkubowałam (w temp. 37°C, 5% CO₂) z badanymi związkami w sześciu różnych stężeniach (w zakresie 50-0,0005 µg/ml) przez 48 godz. Następnie dodawałam roztwór MTT i kontynuowałam inkubację przez 4 godz. Ludzkie limfocyty, których proliferacja stymulowana była przeciwciałami anti-CD3/anti-CD28, inkubowałam przez 96 godz. i następnie dodawałam roztwór MTT. W tym przypadku stosowałam stężenia badanych związków w zakresie 40-0,0004 µg/ml. Wytrącone kryształy formazanu rozpuszczałam 0,4 HCl w *i*-PrOH i dokonywałam pomiaru absorbancji przy długości fali 570 nm. Uzyskane przykładowe krzywe zależności absorbancji od stężenia badanych związków przedstawia Wykres 5 (dla ludzkich limfocytów, związki 92a-e). Wykresy 6 (Związek 91a) i 7 (Związek 92a) przedstawiają % zahamowania wzrostu komórek pod wpływem testowanych związków odniesionych do komórek kontrolnych. Tabela 11 (związki 91a-e, 93a-e, 1) i Tabela 12 (związki 92a-e, 94a-e, 1) zawierają wartości IC₅₀ uzyskane na podstawie krzywych zależności absorbancji od stężenia badanego związku. Wartości cytotoksyczności wyrażałam jako IC₅₀, co odpowiada zmniejszeniu żywotności komórek o 50% w stosunku do kontroli.



Wykres 5. Krzywe zależności cytotoksyczności od stężenia związków **92a-e** wobec aktywowanych limfocytów w teście MTT (wykres przykładowy)



Wykres 6. Krzywe zależności cytotoksyczności od stężenia związku **91a** wobec różnych linii komórkowych (metoda MTT)



Wykres 7. Krzywe zależności cytotoksyczności od stężenia związku **92a** wobec różnych linii komórkowych (metoda MTT)

Tabela 11. Wartości IC₅₀ obliczone na podstawie testu MTT dla związków **91a-e**, **93a-e**, **1** (µg/ml; mediana±SD); ¹ – związek najbardziej aktywny w serii

Nr związku	JURKAT	MOLT-4	CCRF-CEM	HL-60	L1210	PBMC
91a	0,29±0,016	2,72±0,13	1,33±0,095	5,24±0,073	0,021±0,00073	0,12±0,017
91b	0,48±0,035	2,01±0,67	1,14±0,091	1,6±0,12¹	0,034±0,0085	0,2±0,059
91c	0,25±0,093	0,076±0,0057	0,42±0,0095	2,02±0,11	0,012±0,0037¹	0,066±0,028¹
91d	0,3±0,0085	0,065±0,012¹	1,16±0,12	3,04±0,18	0,017±0,0076	0,12±0,071
91e	0,11±0,019¹	0,19±0,03	0,34±0,081¹	4,89±0,74	0,056±0,0098	0,24±0,15
93a	<0,0005	2,58±0,047	0,36±0,033	1,49±0,15	0,012±0,001	0,043±0,0081
93b	<0,0005	1,32±0,14	0,061±0,0083	0,72±0,072	<0,0005	0,018±0,0048
93c	<0,0005	0,059±0,0092	0,047±0,00075	0,69±0,016	<0,0005	0,019±0,0066
93d	<0,0005	0,0052±0,0011	0,095±0,00079	0,24±0,028	0,064±0,0065	0,014±0,0048
93e	<0,0005	0,0073±0,00078	0,12±0,013	1,02±0,085	0,0014±0,00016	0,023±0,0061
1	0,062±0,022	0,024±0,0053	50>	3,13±0,3	0,70±0,15	0,41±0,076

W Tabeli 11 przedstawiłam wartości IC_{50} dla analogów MPA z pochodnymi amino-akrydyny **91a-e** oraz ich natywnych składowych **93a-e**, **1**. Testowane związki wykazywały aktywność cytotoksyczną, o wartościach IC_{50} zależnych od wrażliwości danej linii komórkowej.

Wobec komórek Jurkat wartości IC_{50} analogów MPA **91a-e** znajdowały się w zakresie 0,11-0,48 $\mu\text{g/ml}$. Stanowiło to wyraźny spadek aktywności cytotoksycznej w stosunku do MPA (p w zakresie $3,46 \times 10^{-4}$ -0) i natywnych pochodnych amino-akrydyny ($p=1,93 \times 10^{-4}$ -0). Najbardziej aktywny związek - **91e** (IC_{50} 0,11 $\mu\text{g/ml}$; $p=3,46 \times 10^{-4}$) był o rząd wielkości słabszym cytostatykiem niż kwas mykofenolowy (IC_{50} 0,062 $\mu\text{g/ml}$).

Dla linii Molt-4 obserwowałam takie same prawidłowości, jak dla komórek Jurkat. Połączenie **93a-e** z kwasem mykofenolowym skutkowało spadkiem aktywności cytotoksycznej w porównaniu do wyjściowych związków. Analogi **91a-e** zachowały aktywność w zakresie IC_{50} 0,065-3,18 $\mu\text{g/ml}$. MPA niemal trzykrotnie silniej hamował żywotność komórek (IC_{50} 0,024 $\mu\text{g/ml}$), niż najaktywniejszy z serii związek **91d** (IC_{50} 0,065 $\mu\text{g/ml}$; $p=1,1 \times 10^{-4}$).

Dla białaczek CCRF-CEM i L-1210 analogi MPA wykazywały istotnie wyższą aktywność, niż MPA (Aneks 1, Tabela 3). Dla linii CCRF-CEM związek **91e** wykazywał najsilniejszą aktywność (IC_{50} 0,34 $\mu\text{g/ml}$; $p=10^{-7}$), natomiast MPA był nieaktywny (IC_{50} powyżej 50 $\mu\text{g/ml}$).

Linia najmniej wrażliwą na działanie badanych analogów MPA była białaczka HL-60. Najbardziej aktywny związek - **91b** (IC_{50} 1,6 $\mu\text{g/ml}$; $p=9 \times 10^{-6}$), charakteryzował się silniejszym działaniem niż MPA (IC_{50} 3,13 $\mu\text{g/ml}$). Analogi **91b-d** (IC_{50} w zakresie 1,6-3,04 $\mu\text{g/ml}$) były bardziej, natomiast **91a**, **91e** (IC_{50} odpowiednio 5,24; 4,89 $\mu\text{g/ml}$) mniej aktywne niż MPA. Linia najbardziej wrażliwą na działanie związków **91a-e** była mysia białaczka L-1210, z wartościami IC_{50} w zakresie 0,012-0,056 $\mu\text{g/ml}$. Najbardziej aktywny wobec tej linii związek - **91c** (IC_{50} 0,012 $\mu\text{g/ml}$; $p=1,1 \times 10^{-5}$) okazał się być niemal 60-krotnie bardziej aktywny niż MPA (IC_{50} 0,7 $\mu\text{g/ml}$).

Aktywowane limfocyty były wrażliwe na związki **91a-e**, **93a-e** (Tabela 7). Analogi **91a-e** wykazywały działanie cytotoksyczne - najsilniejszą aktywność wykazywał związek **91c** (IC_{50} 0,066 $\mu\text{g/ml}$; $p=10^{-4}$) - rząd wielkości wyższą niż MPA (IC_{50} 0,41 $\mu\text{g/ml}$). Najmniej cytotoksyczny był analog **91e** (IC_{50} 0,24 $\mu\text{g/ml}$; $p=0,014$). Porównanie cytotoksyczności związków **91a-e** do ich natywnych amino-akrydyn pozwala stwierdzić, że nie ma istotnych różnic w aktywności ($p=0,097$ -0,15). Wyjątek stanowi związek **91b** ($p=0,0078$).

Tabela 12. Wartości IC₅₀ obliczone na podstawie testu MTT dla związków **92a-e**, **94a-e**, **1** (µg/ml; mediana±SD); ¹ – związek najbardziej aktywny w serii

Nr związku	Jurkat T	MOLT-4	CCRF-CEM	HL-60	L1210	PBMC
92a	< 0,0005 ¹	0,36±0,063	>50	>50	0,063±0,0081	0,52±0,044
92b	< 0,0005 ¹	0,21±0,052	>50	>50	0,45±0,092	0,54±0,075
92c	< 0,0005 ¹	0,017±0,001 ¹	>50	>50	0,52±0,031	0,38±0,038 ¹
92d	< 0,0005 ¹	0,13±0,081	>50	>50	0,66±0,018	0,62±0,11
92e	< 0,0005 ¹	0,091±0,0047	>50	>50	0,02±0,00064 ¹	0,70±0,33
94a	<0,0005	0,0034±0,00033	0,077±0,0018	6,69±0,42	0,01±0,003	0,82±0,35
94b	<0,0005	0,003±0,00041	0,35±0,017	8,09±0,14	0,023±0,0034	0,34±0,07
94c	<0,0005	0,011±0,0066	0,78±0,061	56,06±6,31	0,066±0,0041	0,54±0,01
94d	0,0037±0,00028	0,0081±0,0013	0,54±0,093	13,78±1,01	0,043±0,0089	0,88±0,13
94e	0,0019±0,00014	0,046±0,0096	0,83±0,066	64,18±1,24	0,032±0,0058	1,21±0,18
1	0,062±0,022	0,024±0,0053	>50	3,13±0,3	0,70±0,15	0,41±0,076

Tabela 12 przedstawia wartości IC₅₀ dla związków **92a-e**, **94a-e**, **1**. Analogi MPA, zawierające w swej strukturze pochodne amino-akrydonu charakteryzowały się znacznie mniejszą cytotoksycznością, niż ich odpowiedniki zawierające pochodne amino-akrydyny.

Linia komórkowa Jurkat była najbardziej wrażliwa na działanie analogów **92a-e** (IC₅₀ poniżej 0,0005 µg/ml; p=0). Związki te były dwa rzędy wielkości aktywniejsze niż MPA (IC₅₀ 0,062 µg/ml). Wynika to z aktywności macierzystych akrydonów **94a-e**, charakteryzujących się działaniem cytotoksycznym na tym samym poziomie, co **92a-e** (p=1).

Wobec linii Molt-4 jedynie jeden związek wykazywał silniejszą aktywność cytotoksyczną w porównaniu do MPA (IC₅₀ 0,024 µg/ml) – analog **92c** (IC₅₀ 0,017 µg/ml), jednak różnica ta nie jest statystycznie istotna (p=0,123). Połączenie pochodnych amino-akrydonu **94a-e** z MPA prowadziło do spadku aktywności cytotoksycznej analogów o jeden rząd wielkości.

Linie komórkowe CCRF-CEM i HL-60 były odporne na działanie związków **92a-e**, wartości IC₅₀ przyjmowały wartości powyżej 50 µg/ml (Tabela 12).

Wobec linii CCRF-CEM MPA był nieaktywny ($>50 \mu\text{g/ml}$), co skutkowało brakiem aktywności cytotoksycznej analogów **92a-e** ($p=1$). Analogiczną sytuację obserwowałam dla linii HL-60, gdzie połączenie aktywnych pochodnych amino-akrydonu i MPA skutkowało otrzymaniem nieaktywnych związków **92a-e**. W przypadku linii L-1210 związki **92b-d** (IC_{50} w zakresie $0,45\text{-}0,66 \mu\text{g/ml}$) zachowywały aktywność cytotoksyczną tego samego rzędu, co MPA. Bardziej aktywne niż **1** były analogi: **92a** ($\text{IC}_{50} 0,061 \mu\text{g/ml}$; $p=1,7 \times 10^{-5}$) i **92e** ($\text{IC}_{50} 0,02 \mu\text{g/ml}$; $p=1,2 \times 10^{-5}$). Aktywowane limfocyty były wrażliwe na działanie wszystkich związków **92a-e** (IC_{50} w zakresie $0,38\text{-}0,70 \mu\text{g/ml}$). Związek **92c**, jako jedyny z testowanych analogów MPA z tej serii, wykazał silniejszą aktywność niż kwas mykofenolowy (IC_{50} odpowiednio: $0,38 \mu\text{g/ml}$, $0,41 \mu\text{g/ml}$; $p=0,016$). Pochodne **92a-e** wykazały aktywność cytotoksyczną, jednak znacznie słabszą niż **91a-e**.

4.2.2.2. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej mieszanin badanych związków **91a-e**, **92a-e**, **93a-e**, **94a-e**, **1** metodą MTT

Analogi MPA **91a-e**, **92a-e** powstały przez kowalencyjne połączenie wiązaniem amidowym dwóch aktywnych biologicznie składowych: kwasu mykofenolowego oraz pochodnej amino-akrydyny/akrydonu. W celu sprawdzenia wpływu, jaki utworzone połączenie wywiera na aktywność cytotoksyczną związków, przeprowadziłam test MTT podczas którego badałam jednocześnie aktywność związków **91a-e**, **92a-e** oraz ich składowych niepołączonych wiązaniem chemicznym (mieszanina) **93a-e/94a-e**, **1**. Test wykonałam na linii komórkowej Jurkat oraz aktywowanych limfocytach. Uzyskane wyniki przedstawiają: Tabela 13, 14.

Tabela 13. Porównanie wartości IC_{50} związków **91a-e** oraz mieszaniny ich składowych:

93a-e, **1** ($\mu\text{g/ml}$; mediana \pm SD)

Nr związku	JURKAT	93a-e + 1	Nr związku	PBMC	93a-e + 1
91a	0,33 \pm 0,0054	0,049 \pm 0,012	91a	0,1 \pm 0,038	0,13 \pm 0,014
91b	0,32 \pm 0,06	0,24 \pm 0,026	91b	0,2 \pm 0,066	0,19 \pm 0,068
91c	0,7 \pm 0,071	0,13 \pm 0,075	91c	0,065 \pm 0,05	0,016 \pm 0,0023
91d	0,26 \pm 0,02	0,041 \pm 0,0061	91d	0,16 \pm 0,023	0,021 \pm 0,009
91e	0,43 \pm 0,0074	0,26 \pm 0,031	91e	0,29 \pm 0,0019	0,079 \pm 0,002
1	1,25 \pm 0,18	-	1	0,54 \pm 0,046	-

Analiza danych z Tabeli 13 pozwala stwierdzić, że wartości IC_{50} otrzymane dla związków **91a-e** oraz mieszanin ich składowych różniły się istotnie dla testu wykonanego na komórkach Jurkat ($p=0,024$; test t -studenta dla próbek niezależnych, o różnej wariancji). Natomiast dla testu wykonanego wobec aktywowanych limfocytów można przyjąć, że mieszaniny związków **93a-e, 1** i ich kowalencyjne połączenia **91a-e** generowały zbliżone wartości IC_{50} . W niektórych przypadkach uzyskałam identyczne lub bardzo zbliżone wyniki IC_{50} dla analogu MPA oraz mieszaniny jego składowych (np. **91a, 91b** - komórki PBMC).

Tabela 14. Porównanie wartości IC_{50} związków **92a-e** oraz mieszaniny ich składowych:

94a-e,1 ($\mu\text{g/ml}$; mediana \pm SD)					
Nr związku	JURKAT	94a-e + 1	Nr związku	PBMC	93a-e + 1
92a	0,00079 \pm 0,0001	0,0022 \pm 0,0011	92a	0,54 \pm 0,053	0,15 \pm 0,014
92b	0,005 \pm 0,00013	<0,0005	92b	0,53 \pm 0,0065	0,24 \pm 0,0037
92c	0,0088 \pm 0,00052	<0,0005	92c	0,31 \pm 0,018	0,64 \pm 0,25
92d	0,0078 \pm 0,00025	0,039 \pm 0,0061	92d	0,62 \pm 0,17	0,18 \pm 0,075
92e	0,0064 \pm 0,0045	0,0093 \pm 0,0016	92e	0,16 \pm 0,011	0,16 \pm 0,009
1	1,11 \pm 0,12	-	1	0,54 \pm 0,046	-

Wyniki testów przeprowadzonych na linii komórkowej Jurkat ($p=0,56$) i aktywowanych limfocytach ($p=0,25$) prowadzą do wniosku, że nie ma istotnej różnicy w wartościach IC_{50} związków **92a-e** w porównaniu do mieszanin ich wyjściowych komponentów **94a-e, 1**.

4.2.3. Selekcja analogów MPA o najkorzystniejszych parametrach

Wyznaczanie aktywności antyproliferacyjnej (inkorporacja TdR-3H) oraz cytotoksyczności (metoda MTT) jest istotne z punktu widzenia selekcji analogów do dalszych badań. Daje możliwość porównywania związków między sobą, pozwalając na wybór tego o najlepszej aktywności i minimalnej toksyczności. Wyniki badań mogą dostarczyć również wskazówek przy planowaniu modyfikacji strukturalnych analogów MPA. W Tabelach 15, 16 przedstawiłam współczynniki selektywności (SI) dla wszystkich badanych związków wobec ludzkich linii białaczkowych. SI oznacza stosunek cytotoksyczności związku (IC_{50}) do jego efektu antyproliferacyjnego (EC_{50}).

Tabela 15. Współczynniki selektywności (SI) dla związków **91a-e, 93a-e, 1**. ¹ – związek najbardziej aktywny w serii

Nr związku	Jurkat T		MOLT-4		CCRF-CEM		HL-60	
	EC ₅₀	IC ₅₀ /ED ₅₀	EC ₅₀	IC ₅₀ /ED ₅₀	EC ₅₀	IC ₅₀ /ED ₅₀	EC ₅₀	IC ₅₀ /ED ₅₀
91a	0,29±0,054	1,000	0,56±0,046	4,857	0,029±0,0014	45,86	<0,0005 ¹	10480
91b	0,24±0,048¹	2,000	0,6±0,02	3,350	<0,0005 ¹	2280,00	0,0014±0,00043	1143
91c	0,42±0,064	0,595	0,2±0,0049¹	0,380	<0,0005 ¹	840,00	0,0018±0,00033	1122
91d	0,34±0,016	0,882	0,21±0,063	0,310	<0,0005 ¹	2320,00	0,0077±0,00089	395
91e	0,32±0,078	0,344	1,86±0,43	0,102	0,037±0,0013	9,19	0,053±0,011	92
93a	0,5±0,17	0,001	0,086±0,01	30,000	0,016±0,0065	22,50	<0,0005	2980
93b	0,22±0,035	0,002	0,42±0,027	3,143	<0,0005	120,00	<0,0005	1440
93c	0,014±0,008	0,036	0,71±0,096	0,083	<0,0005	94,00	<0,0005	1380
93d	0,016±0,003	0,031	0,39±0,0084	0,013	<0,0005	190,00	<0,0005	480
93e	0,09±0,024	0,006	0,56±0,029	0,013	0,0044±0,0026	27,27	<0,0005	2040
1	0,53±0,082	0,117	0,41±0,053	0,0585	0,013±0,0029	3846,15	0,14±0,067	22,36

Tabela 16. Współczynniki selektywności (SI) dla związków **92a-e, 94a-e, 1**. ¹ – związek najbardziej aktywny w serii

Nr związku	JURKAT		MOLT-4		CCRF-CEM		HL-60	
	EC ₅₀	IC ₅₀ /EC ₅₀	EC ₅₀	IC ₅₀ /EC ₅₀	EC ₅₀	IC ₅₀ /EC ₅₀	EC ₅₀	IC ₅₀ /EC ₅₀
92a	0,016±0,0043	0,031	3,17±0,25	0,11	5,3±0,5¹	9,43	>50	1,00
92b	0,0063±0,00088	0,079	5,92±0,8	0,04	>50	1,00	>50	1,00
92c	0,0022±0,00046¹	2,27	5,29±0,42	0,003	>50	1,00	>50	1,00
92d	0,0093±0,00024	0,054	7,12±0,64	0,02	>50	1,00	>50	1,00
92e	0,087±0,0053	0,006	1,86±0,55¹	0,05	6,7±0,59	7,46	>50	1,00
94a	0,022±0,0071	0,023	1,97±0,23	0,0017	<0,0005	154	0,59±0,088	11,34
94b	0,18±0,09	0,003	6,26±1,02	0,0005	0,013±0,0036	26,92	0,63±0,043	12,84
94c	0,17±0,033	0,003	3,14±0,36	0,0035	0,01±0,0069	78	1,83±0,051	30,63
94d	0,089±0,029	0,042	2,31±0,72	0,0035	0,047±0,005	11,49	0,84±0,032	16,40
94e	0,091±0,0015	0,021	3,87±0,14	0,012	0,12±0,017	6,92	1,22±0,037	52,61
1	0,53±0,082	0,117	0,41±0,053	0,059	0,013±0,0029	3846,15	0,14±0,067	22,36

Analiza danych zawartych w Tabelach 15, 16 pozwala stwierdzić, że wśród analogów MPA **91a-e**, **92a-e** istnieje bardzo korzystna tendencja, że najaktywniejszy związek (hamowanie proliferacji EC₅₀) charakteryzuje się jednocześnie najmniejszą toksycznością.

Wobec linii komórkowej Jurkat i Molt-4 związki **91a-e** nie charakteryzowały się korzystnymi wartościami SI (najkorzystniejsze wartości odpowiednio: 2; 0,38). Wobec linii CCRF-CEM związki **91b-d** wykazywały bardzo korzystne wartości SI, przekraczające 2000. Wobec komórek HL-60 związek **91a** posiadał jednocześnie bardzo dobrą aktywność antyproliferacyjną (EC₅₀ poniżej 0,0005 µg/ml) i selektywność (SI 10480). W serii analogów MPA **92a-e** nie obserwowaliśmy korzystnych korelacji aktywność-selektywność. Dla linii Jurkat i Molt-4 najaktywniejsze związki (odpowiednio **92c**, **92e**) wykazywały słabą selektywność. Wobec linii CCRF-CEM najaktywniejszy związek **92a** (EC₅₀ 5,3 µg/ml) charakteryzował się dobrą selektywnością (SI 9,43).

Współczynniki selektywności wobec aktywowanych limfocytów wahają się w bardzo szerokich granicach. Wyniki prezentowane w Tabeli 17 pokazują zakresy współczynników selektywności obliczone na podstawie analizy hodowli PBMC (n=5).

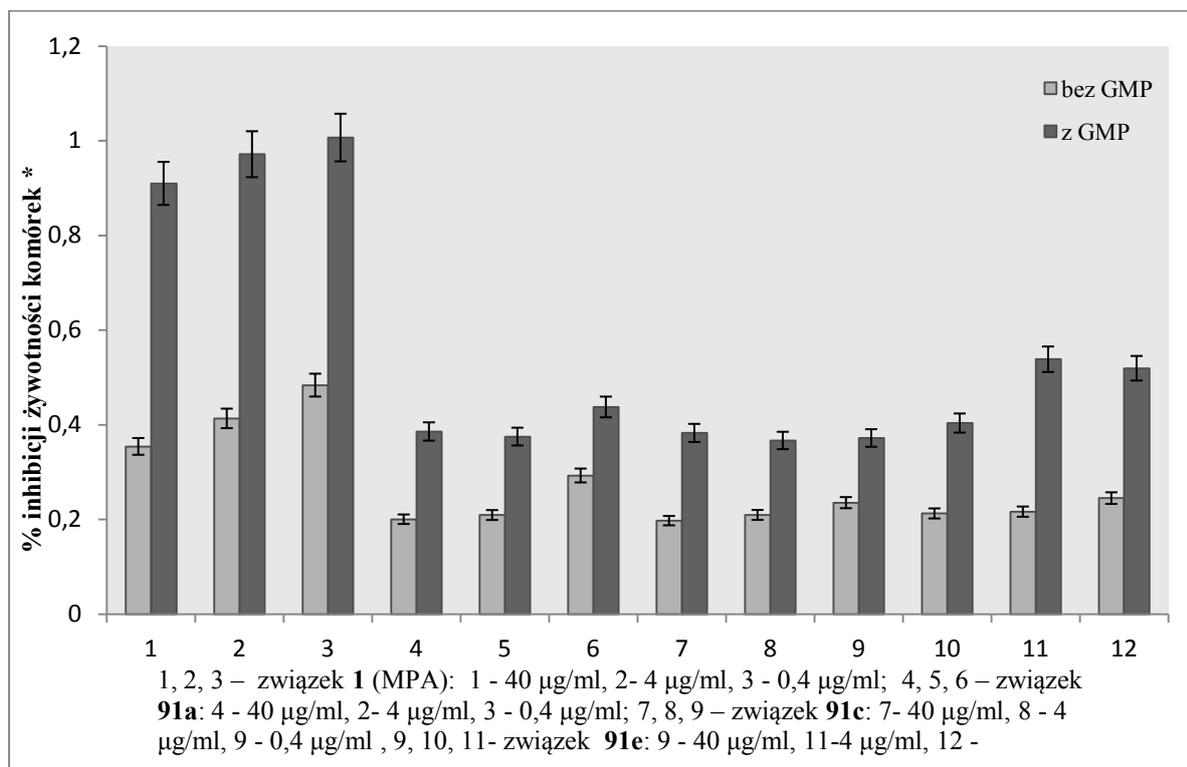
Tabela 17. Zakresy wartości współczynnika selektywności związków **91a-e**, **92a-e**, **93a-e**, **94a-e**, **1** wobec komórek PBMC

Nr związku	PBMC	Nr związku	PBMC
91a	14-240	92a	52-1040
91b	24,4-400	92b	10-1080
91c	50,77-132	92c	6,03-146,15
91d	13,2-240	92d	7,95-144,19
91e	27,9-480	92e	3,68-148,94
93a	5,3-86	94a	2,83-221,62
93b	20,2-36	94b	1,7-261,54
93c	25-38	94c	1,26-1080
93d	28	94d	2,75-1760
93e	3,9-46	94e	7,56-2420
1	11,71-48,24	1	11,71-48,24

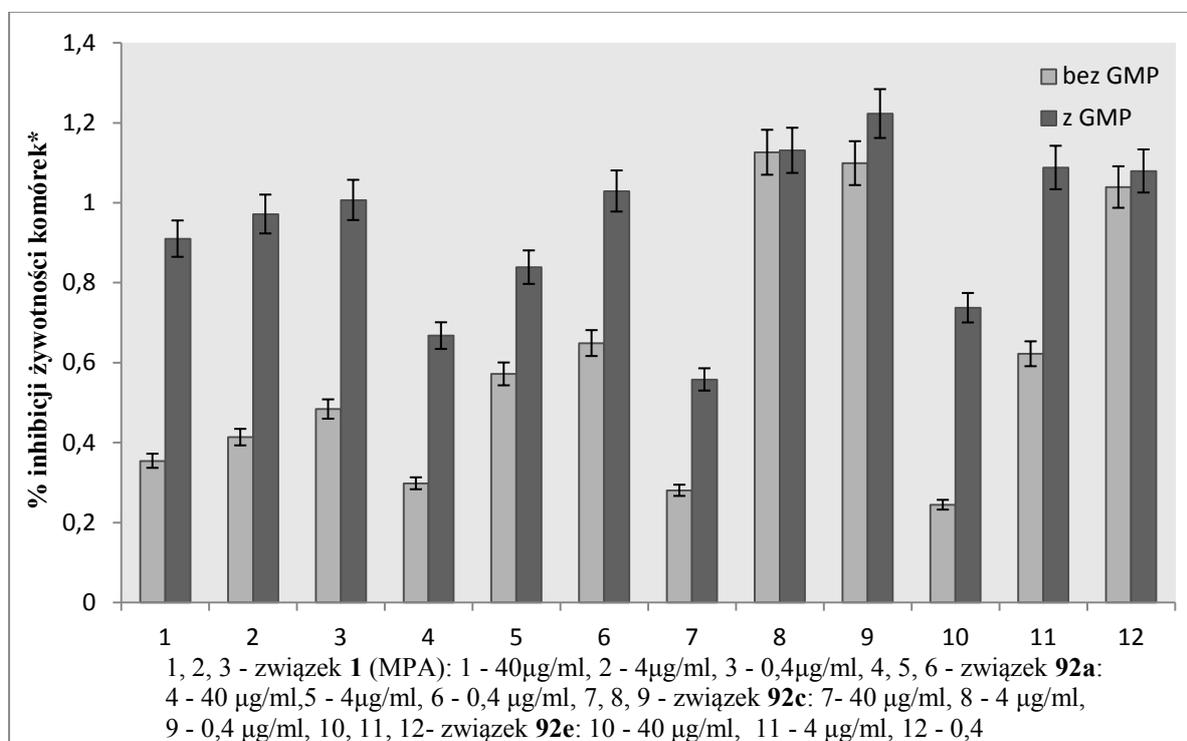
4.2.4. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej badanych związków **91a-e**, **92a-e**, **1** w obecności GMP

IMPDH hamuje biosyntezę nukleotydów purynowych *de novo*. Oznacza to, że supresja proliferacji komórek pod wpływem inhibitorów tego enzymu (np. MPA) jest odwracalna przez dodanie guanozyny, GMP, GTP, detoksy-GMP [4, 128]. W celu sprawdzenia, czy aktywność cytotoksyczna analogów **91a-e**, **92a-e** jest oparta o ten mechanizm działania, przeprowadziłam test MTT z dodatkiem 50 μM GMP. S. Mitsuhashi i in. donieśli, że przeprowadzając analogiczne doświadczenie dodatek 50 μM guanozyny nieoczekiwanie hamował proliferację komórek K562 o około 50% w stosunku do kontroli (komórki bez dodatku GMP) [128]. Zaobserwowałam ten sam efekt wobec linii komórkowej Molt-4. Do przeprowadzania testu wybrałam związki: **91 a-c-e**, **92 a-c-e**, **1** w stężeniach: 40, 4, 0,4 $\mu\text{g/ml}$. MPA poddałam badaniu w celu porównawczym i potwierdziłam, że jego działanie cytotoksyczne jest całkowicie odwracalne dodatkiem GMP (Wykres 8, 9; pozycje 1-3). Wyniki testów na linii Molt-4 poddanej działaniu związków **91**, **92** pokazują, że efekt inhibicyjny na żywotność komórek jest jedynie częściowo odwracalny przez GMP (Wykres 8, 9). Dane prezentowane na Wykresie 8 wskazują, że w przypadku komórek Molt-4 poddanych działaniu związków **91** w stężeniach 0,4-40 $\mu\text{g/ml}$ się spadek żywotności komórek wynosił 20% w porównaniu do kontroli. Dla związków **91a**, **91c** 50 μM GMP pozwalał na osiągnięcie wartości 40%, a dla związku **91e** 50% żywotności komórek kontrolnych. Co najmniej 50% tego spadku nie można odwrócić dodatkiem GMP. Sugeruje to, że mechanizm działania oparty o inhibicję IMPDH ma znaczenie drugorzędne w przypadku analogów zawierających w swej strukturze pochodne amino-akrydyny. Prawdopodobnie działanie cytotoksyczne oparte jest głównie na interkalacji do DNA reaktywnych produktów metabolizmu akrydyn. Analiza danych zawartych na Wykresie 9 wskazuje, że aktywność cytotoksyczna analogów MPA z pochodnymi amino-akrydonu jest w większym stopniu odwracana przez GMP, niż w przypadku związków **91a-e**. Dla komórek poddanych działaniu analogów **92a-c-e** w najwyższym badanym stężeniu (40 $\mu\text{g/ml}$) zanotowałam spadek żywotności do około 25% w odniesieniu do kontroli. W stężeniach 4 $\mu\text{g/ml}$ wartości te wynosiły około 50% dla związków **92a**, **92e**. Dla analogu **92c** stężenie 4 $\mu\text{g/ml}$ praktycznie nie wywierało już wpływu na żywotność badanych komórek. Z tego powodu analizę wpływu GMP na działanie analogów **92** należy przeprowadzić dla największych stężeń, dla których związki te wywołują działanie cytotoksyczne.

Dane przedstawione na Wykresie 9 pokazują, że dla związku **92a** GMP wywołał wzrost żywotności komórek do 65%, dla związku **92c** do 50% i dla związku **92e** do około 70%.



Wykres 8. Hamowanie aktywności analogów MPA **91a-c-e** dodatkiem 50 μM GMP



Wykres 9. Hamowanie aktywności analogów MPA **92a-c-e** dodatkiem 50 μM GMP

5. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

Widma ^1H NMR oraz ^{13}C NMR zostały wykonane na aparacie Varian Unity Plus 500 MHz lub Gemini 200MHz w Gdańskim Międzyuczelnianym Laboratorium NMR w Gdańsku.

Widma UV zarejestrowano na aparacie UV-VIS Lambda 45, Perkin Elmer (Politechnika Gdańska, Katedra Technologii Leków i Biochemii). Widma masowe były wykonywane na aparacie BIFLEX III Bruker w Pracowni Spektrometrii Mas MALDI-TOF (Uniwersytet Gdański), z zastosowaniem CCA lub DHB jako matrycy. Analizę elementarną wykonano na analizatorze elementarnym firmy Carlo Erba EA 1108 (Uniwersytet Gdański).

Pomiary scyntylicyjne wykonane zostały za pomocą czytnika scyntylicyjnego fazy płynnej (LSC-Beckman) w czasie 5 min/próbka w Katedrze i Zakładzie Biochemii, Gdański Uniwersytet Medyczny.

Do oczyszczania związków metodą chromatografii kolumnowej stosowałam żel krzemionkowy Merck 60 (0,063-0,2 mm). Do rozdzielania związków metodą SPE używałam kolumny do faz normalnych CHROMABOND[®] C₁₈, 15ml/2000mg, firmy MACHEREY-NAGEL. Do chromatografii cienkowarstwowej (TLC) stosowałam płytki pokryte żelem krzemionowym firmy Merck 60 F₂₅₄ oraz stosowałam następujące układy rozwijające:

- A - eter naftowy : octan etylu (5:1, v/v)
- B - eter naftowy : octan etylu (10:1, v/v)
- C - chloroform : metanol (4:1, v/v)
- D - chloroform : metanol (9:1, v/v)
- E - chloroform : metanol (40:1, v/v)

Temperatury topnienia mierzyłam w kapilarze (aparat Kohler) i nie były one korygowane.

5.1. Synteza kwasu mykofenolowego MPA (Schemat 9)

5.1.1. Synteza 4-metoksy-2-(prop-2-enyloksy)benzoesanu metylu 49

Mieszaninę 2-hydroksy-4-metoksybenzoesanu metylu **48** (50 g; 0,275 mola), węglanu potasu (43,23 g; 0,313 mola) oraz bromku allilu (29,2 ml; 0,341 mola) rozpuściłam w świeżo przedestylowanym DMF (90 ml) i mieszałam na mieszadle magnetycznym przez 16 godz. w temperaturze pokojowej.

Następnie mieszaninę reakcyjną wylałam na zimną wodę i ekstrahowałam kilkakrotnie eterem dietylowym. Połączone warstwy organiczne suszyłam bezwodnym siarczanem magnezu. Rozpuszczalnik odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość krystalizowałam z układu eter *tert*-butyloowo-metylowy/heksan. Otrzymałam 51,2 g produktu z wyd. 85%.

T. t. 46-48° C; lit. [106] 45,5-48°C.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 3,86 (s, 3H, OCH₃); 3,89 (s, 3H, OCH₃); 4,64 (m, 2H, OCH₂); 5,33 (dd, *J*=1,47Hz, *J*=1,46 Hz, 1H, CH=CH₂); 5,55 (dd, *J*=1,47Hz, *J*=1,46 Hz, 1H, CH=CH₂); 6,1 (m, 1H, CH=CH₂); 6,5 (m, 2H, C₆H₅); 7,86 (d, 1H, *J*=8,79 Hz, C₆H₅).

5.1.2. Synteza *N,N*-dietylo-4-metoksy-2-(prop-2-enyloksy)benzamidu 50

a) Mieszaninę związku **49** (60 mg; 0,27 mmola) oraz świeżo przedestylowanej dietyloaminy (3 ml, 29 mmoli) ogrzewałam do wrzenia przez 24 godz. Po tym czasie nie zaobserwowałam żadnego postępu reakcji (TLC). Po dodaniu katalitycznej ilości kwasu *p*-toluenosulfonowego oraz ogrzewaniu przez kolejne 24 godz. nie zaobserwowałam tworzenia się produktu.

b) Roztwór świeżo przedestylowanej dietyloaminy (19,4 ml; 0,188 mola) w bezwodnym eterze dietylowym schłodziłam w łaźni lodowej do 0°C i dodałam 10 M roztwór *n*-BuLi w heksanie (10,32 ml; 0,103 mola). Otrzymany roztwór mieszałam na mieszadle magnetycznym przez 15 minut, utrzymując temperaturę 0°C. Reakcję prowadziłam w atmosferze argonu. Następnie dodałam kroplami roztwór związku **49** eterze. Mieszaninę reakcyjną ogrzewałam do wrzenia przez godzinę. Po schłodzeniu do temperatury pokojowej, do mieszaniny reakcyjnej dodałam nasyconego roztworu chlorku amonu. Warstwy rozdzieliłam, fazę wodną ekstrahowałam chlorkiem metylenu. Połączone warstwy organiczne przemyłam wodą i suszyłam bezwodnym MgSO₄. Otrzymaną mieszaninę rozdzielałam za pomocą chromatografii kolumnowej w układzie A. Wyizolowałam niewielką ilość kwasu 2-alliloksy-4-metoksybenzoesowego **95**.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 3,92 (s, 3H, OCH₃); 4,64 (m, 2H, OCH₂); 4,99-5,06 (m, 2H, CH=CH₂); 5,99 (m, 1H, CH=CH₂); 6,47 (s, 1H, C₆H₅); 6,54 (d, 1H, *J*=9,28Hz); 7,86 (d, 1H, *J*=9,28Hz); 10,8 (s, 1H, COOH).

c) Do ochłodzonego w łaźni lodowej roztworu dietyloaminy (7,5 ml; 0,072 mola) w bezwodnym toluenie (12 ml) dodawałam kroplami $(\text{CH}_3)_3\text{Al}$ (36,22 ml; roztwór 2N w toluenie) w atmosferze argonu. Kontynuowałam mieszanie przez godzinę w temperaturze otoczenia. Następnie dodawałam kroplami roztwór związek **49** (7,71 g; 0,035 mola) w toluenie. Po zakończeniu wkraplania mieszaninę reakcyjną ogrzewałam przez 18 godz. w temperaturze 75°C.

Po tym czasie roztwór ochłodziłam do temperatury otoczenia i wylałam do mieszaniny stężonego kwasu solnego (27,2 ml), lodu (125 g) i octanu etylu (36,2 ml), następnie ekstrahowałam octanem etylu. Warstwę organiczną suszyłam bezwodnym siarczanem magnezu i rozpuszczalnik odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymałam 8,51g związku **50** w postaci żółtego oleju. Wydajność reakcji 93%.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 1,04 (t, 3H, $J=7,32\text{Hz}$, CH_2CH_3); 1,24 (t, 3H, $J=7,32\text{Hz}$, CH_2CH_3); 3,2 (m, 2H, CH_2CH_3); 3,3-3,6 (m, 2H, CH_2CH_3); 3,82 (s, 3H, OCH_3); 4,54 (m, 2H, OCH_2); 5,2-5,4 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2$); 6,01 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$); 6,44 (d, 1H, $J=2,3\text{Hz}$, C_6H_5); 6,54 (dd, 1H, $J=2,44\text{Hz}$, $J=8,3\text{Hz}$, C_6H_5); 7,15 (d, 1H, $J=8,31\text{Hz}$, C_6H_5).

5.1.3. Synteza *N,N*-dietylo-2-hydrokso-4-metokso-3-(prop-2-enyl)benzamidu **51**

a) Związek **50** (1,4 g; 5,31 mmola) rozpuściłam w 1,2,4,5-tetrametylobenzenie (2,75 ml) i ogrzewałam do wrzenia. Przebieg reakcji śledziłam za pomocą TLC. Po 6 godz. zaobserwowałam mały stopień przereagowania substratu. Kontynuowałam ogrzewanie przez 24 godz. Następnie mieszaninę reakcyjną schłodziłam i odparowałam rozpuszczalnik na drodze destylacji próżniowej. Rozdział mieszaniny reakcyjnej za pomocą chromatografii kolumnowej w układzie A pozwolił na otrzymanie 0,21 g produktu **51** w postaci oleju z wyd. 15%.

b) Związek **50** (0,44 g; 1,67 mmola) rozpuściłam w 2 ml tetraliny i ogrzewałam do wrzenia. Po dwóch godzinach stwierdziłam całkowite przereagowanie substratu. Rozpuszczalnik odparowałam na drodze destylacji próżniowej, mieszaninę reakcyjną rozdzielałam za pomocą chromatografii kolumnowej w układzie A. Otrzymałam 0,32 g produktu **51** z wyd. 73%.

Procedurę powtórzyłam stosując jako rozpuszczalnik świeżo przedestylowany nitrobenzen i 4-chloro-*o*-ksylen. W pierwszym przypadku otrzymałam produkt **51** z wydajnością 70%, a w drugim 56%. Reakcję przeprowadziłam w większej skali stosując tetralinę jako rozpuszczalnik.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 1,30 (t, 6H, $J=7,1\text{Hz}$, CH_2CH_3); 3,46 (d, 2H, $J=5,9\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{-CH}$); 3,53 (q, 4H, $J=7,1\text{Hz}$, CH_2CH_3); 3,87 (s, 3H, OCH_3); 5,0 (m, 2H, CH=CH_2); 6,0 (m, 1H, CH=CH_2); 6,42 (d, 1H, $J=8,3\text{Hz}$, C_6H_5); 7,18 (d, 1H, $J=8,8\text{Hz}$, C_6H_5); 10,55 (s, 1H, OH).

5.1.4. Synteza *N,N*-dietylo-5-bromo-2-hydroksy-4-metoksy-3-(prop-2-enyl)benzamidu

52

Roztwór *t*-BuNH₂ (5,24 ml; 0,05 mola) w bezwodnym toluenie (70 ml) schłodziłam do -20°C i dodawałam kroplami brom (1,28 ml; 0,025 mola). Następnie mieszaninę ochłodziłam do -60°C i dodawałam porcjami roztwór związku **51** (5,97 g; 0,023 mola) w toluenie. Mieszanina reakcyjna osiągnęła temp. -5°C w przeciągu 3 godz. Następnie wylałam ją na rozcieńczony roztwór tiosiarczanu sodu. Ekstrahowałam kilkakrotnie octanem etylu, przemyłam 5% kwasem solnym oraz rozcieńczonym roztworem wodorowęglanu sodu. Warstwy organiczne wysuszyłam siarczanem magnezu i rozpuszczalnik odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem. Mieszaninę rozdzielałam za pomocą chromatografii kolumnowej w układzie A. Otrzymałam 6,35 g produktu w postaci brązowego oleju z wyd. 82%.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 1,31 (t, 6H, $J=6,8\text{Hz}$, CH_2CH_3); 3,51 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}$); 3,53 (q, 4H, $J=6,8\text{ Hz}$, CH_2CH_3); 3,87 (s, 3H, OCH_3); 5,07 (m, 2H, CH=CH_2); 6,0 (m, 1H, CH=CH_2); 7,40 (s, 1H, C_6H_5); 10,26 (s, 1H, OH).

5.1.5. Synteza *N,N*-dietylo-5-bromo-2-[(*tert*-butylodimetylosililo)-oksy]-4-metoksy-3-(prop-2-enyl)benzamidu **53**

Do mieszaniny związku **52** (6,35 g; 0,019 mola) oraz imidazolu (2,52 g; 0,037 mola) w DMF dodawałam *t*-BuMe₂SiCl (3,44 g; 0,023 mola). Reakcję prowadziłam 2 godz. w temperaturze pokojowej. Następnie mieszaninę reakcyjną wylałam na zimną wodę i ekstrahowałam eterem dietylowym. Warstwy organiczne przemyłam wodą, wysuszyłam bezwodnym siarczanem magnezu. Rozpuszczalnik odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymałam 7,90 g krystalicznego produktu z wyd. 93%.

T. t. $75\text{-}77^\circ\text{C}$; lit. [106] $75,2\text{-}75,5^\circ\text{C}$.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 0,1 (s, 3H, SiCH_3); 0,13 (s, 3H, SiCH_3); 1,0 (s, 9H, Si-*t*-Bu); 1,02 (t, 3H, $J=6,8\text{Hz}$, CH_2CH_3); 1,24 (t, 3H, $J=6,8\text{Hz}$, CH_2CH_3); 3,46 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}$); 3,08-3,71(m, 4H, CH_2CH_3); 3,84 (s, 3H, OCH_3); 4,84 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2$); 5,92 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$); 7,29 (s, 1H).

5.1.6. Synteza *N,N*-dietylo-5-metylo-2-[(*tert*-butylodimetylosililo)-oksy]-4-metoksy-3-(prop-3-enyl)benzamidu 54

Do świeżo osuszonego i schłodzonego do -70°C THF dodawałam porcjami roztwór MeLi (12,1 ml; 1,6 N w eterze dietylowym) w atmosferze argonu. Następnie dodawałam kroplami roztwór związku **53** (7,9 g; 0,017 mola) w THF w przeciągu 30 min. Kontynuowałam mieszanie w -70°C przez kolejne 10 min., a następnie mieszaninę reakcyjną wylałam na zimną wodę i ekstrahowałam octanem etylu. Połączone warstwy organiczne suszyłam bezwodnym siarczanem magnezu, octan etylu odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem. Mieszaninę rozdzielałam za pomocą chromatografii kolumnowej w układzie A. Otrzymałam 4,61 g produktu, z wyd. 68%.

T. t. $61\text{-}63^\circ\text{C}$; lit. [106] $61,5\text{-}62,2^\circ\text{C}$.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 0,1 (s, 3H, SiCH_3); 0,18 (s, 3H, SiCH_3); 1,0 (m, 9H, Si-*t*-Bu); 1,25 (t, 6H, $J=6,8\text{Hz}$, CH_2CH_3); 2,24 (s, 3H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_3$); 3,06-3,69 (m, 4H, CH_2CH_3); 3,45 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}$); 3,71 (s, 3H, OCH_3); 4,8-4,99 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2$); 5,94 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$); 6,97 (s, 1H).

5.1.7. Synteza *N,N*-dietylo-5-metylo-2-[(*tert*-butylodimetylosililo)-oksy]-6-formylo-4-metoksy-5-metylo-3-(prop-2-enyl)benzamidu 55

Roztwór TMEDA (2,5 ml; 14,9 mmola) w bezwodnym THF schłodziłam do -90°C (w łaźni zawierającej mieszaninę suchego lodu i eteru dietylowego) i dodawałam porcjami *t*-BuLi (9,7 ml; 16,49 mmoli); roztwór 1,7N w pentanie. Reakcję prowadziłam w atmosferze argonu. Następnie roztwór związku **54** (4,61g; 11,78 mmola) w THF dodawałam porcjami przez 30 min. i kontynuowałam mieszanie w -90°C przez 40 min. Następnie dodałam roztwór DMF (2ml) w THF (0,9 ml). Mieszanina reakcyjna osiągnęła temperaturę -30°C w przeciągu 90 minut. Następnie wylałam ją na zimną wodę i ekstrahowałam octanem etylu.

Po wysuszeniu bezwodnym siarczanem magnezu, rozpuszczalnik odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem. Mieszaninę rozdzielałam za pomocą chromatografii kolumnowej w układzie A. Otrzymałam 4 g produktu z wyd. 81%.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ [ppm]: 0,16 (s, 3H, SiCH_3); 0,25 (s, 3H, SiCH_3); 1,0 (s, 9H, Si-*t*-Bu); 1,05 (t, 3H, $J=6,8\text{Hz}$, CH_2CH_3); 1,29 (t, 3H, $J=6,8\text{Hz}$, CH_2CH_3); 2,51 (s, 3H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_3$); 3,0-3,23 (m, 4H, CH_2CH_3); 3,72 (s, 3H, OCH_3); 3,97 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}$); 4,83-5,03 (m, 2H, CH=CH_2); 5,92 (m, 1H, CH=CH_2); 10,16 (s, 1H, CHO).

5.1.8. Synteza *N,N*-dietylo-2-[(*tert*-butylodimetylosililo)-oksy]-6-(hydroksymetylo)-4-metoksy-5-metylo-3-(prop-2-enyl)benzamidu 56

Do roztworu związku 55 (4 g; 9,52 mmola) w bezwodnym etanolu schłodzonym w łaźni lodowej dodałam NaBH_4 (0,12g; 3,22 mmola). Reakcję prowadziłam 30 min., następnie nadmiar NaBH_4 rozłożyłam za pomocą kwasu octowego. Mieszaninę wylałam na zimną wodę i ekstrahowałam octanem etylu. Połączone warstwy organiczne suszyłam bezwodnym siarczanem magnezu i rozpuszczalnik oddestylowałam pod zmniejszonym ciśnieniem.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 0,09 (s, 3H, SiCH_3); 0,18 (s, 3H, SiCH_3); 0,98 (s, 9H, Si-*t*-Bu); 1,01 (t, 3H, $J=6,8\text{Hz}$, CH_2CH_3); 1,31 (t, 3H, $J=6,8\text{Hz}$, CH_2CH_3); 2,35 (s, 3H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_3$); 3,1 (m, 1H, OH); 3,29 (m, 2H, CH_2CH_3); 3,44 (m, 2H, CH_2CH_3); 3,72 (s, 3H, OCH_3); 3,87 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}$); 4,28 (d, 1H, $J=12,2\text{Hz}$, CH_2OH); 4,57 (d, 1H, $J=12,2\text{Hz}$, CH_2OH); 4,98 (m, 2H, CH=CH_2); 5,95 (m, 1H, CH=CH_2).

5.1.9. Synteza 1,3-dihydro-4-[(*tert*-butylodimetylosililo)-oksy]-6-metoksy-7-metylo-3-okso-5-(prop-2-enyl)izobenzofuranu 57

Surową mieszaninę 56 rozpuściłam w octanie etylu oraz kwasie octowym i mieszałam na mieszadle magnetycznym przez 15 godz. w temperaturze otoczenia. Mieszaninę reakcyjną wylałam na rozcieńczony roztwór NaCl , przemyłam roztworem NaHCO_3 i ekstrahowałam octanem etylu. Po wysuszeniu bezwodnym MgSO_4 oraz odparowaniu rozpuszczalnika mieszaninę rozdzielałam za pomocą chromatografii kolumnowej w układzie A. Otrzymałam 2,27 g krystalicznego produktu z wyd. 68%.

T. t. 93-95°C; lit. [106] 93,2-93,9°C.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 0,08(s, 6H, SiCH_3); 0,28 (s, 6H, SiCH_3); 1,06 (s, 9H, Si-*t*-Bu); 2,19 (s, 3H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_3$); 3,48 (dt, 2H, $J=5,8$; $J=1,4$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}$); 3,80 (s, 3H, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}$); 5,0 (m, 2H, CH_2O); 5,11 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2$); 5,96 (m,1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$).

5.1.10. Synteza 1,3-dihydro-4-[(*tert*-butylodimetylosililo)-oksy]-6-metoksy-7-metylo-3-okso-5-(prop-2,3-epoksy)izobenzofuranu 96

Rozwór związku **57** (2,27 g; 6,52 mmola) oraz świeżo wyprażonego octanu sodu (0,53 g; 6,52 mmola) w bezwodnym chlorku metylenu ochłodziłam do -70°C i dodawałam porcjami *m*-CPBA (1,41 g; 6,52 mmola) w przeciągu 5 godz. Nie zaobserwowałam za pomocą TLC tworzenia się żadnego produktu.

Mieszanie kontynuowałam przez 18 godz. w temperaturze pokojowej. Po tym czasie zaobserwowałam tworzenie się produktu, jednak przereagowanie substratu było niecałkowite. Mieszaninę reakcyjną schłodziłam do 0°C i dodawałam porcjami przez 15 minut drugi ekwiwalent *m*-CPBA. Następnie kontynuowałam mieszanie w temperaturze pokojowej przez 5 godz., po tym czasie substrat przereagował niemal całkowicie. Mieszaninę przemyłam rozcieńczonym roztworem NaHCO_3 , warstwy rozdzieliłam. Warstwę wodną ekstrahowałam chlorkiem metylenu. Połączone warstwy organiczne przemyłam ochłodzonym roztworem 1N NaOH, wysuszyłam Na_2SO_4 i rozpuszczalnik odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość oczyszczałam za pomocą chromatografii kolumnowej w układzie A. Otrzymałam 1,8 g związku **96** z wyd. 76%.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 0,27 (s, 6H, SiCH_3); 1,05 (s, 9H, Si-*t*-Bu); 2,19 (s, 3H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_3$); 3,2 (dd, 1H, $J=2,44\text{Hz}$, $J=4,4\text{Hz}$, CH_2CHO); 3,11 (dd, 1H, $J= 4,88\text{Hz}$, CHO-CH_2); 2,85-2,89 (dd,1H, $J=5,86\text{Hz}$, CHO-CH_2); 2,72 (t, 1H, $J=4,4\text{Hz}$, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{-CH}$); 2,54 (dd,1H, $J=2,44\text{Hz}$, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{-CH}$); 3,79 (s, 3H, OCH_3); 5,06 (s, 2H, OCH_2).

^{13}C NMR (CDCl_3 , δ): -3,35; -3,23; 1,25; 11,74; 18,98; 26,26; 27,92; 47,41; 51,29; 61,30; 67,93; 111,99; 118,31; 123,41; 147,18; 152,44; 163,72; 169,25.

MS: $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_5\text{Si}$; $M/z = 364,3$ (obl. 364,2).

5.1.11. Synteza [4-(*tert*-butyldimetylosililo)-oksy]-6-metoksy-7-metylo-3-okso-1,3-dihydrobenzofuran-5-yl]-acetaldehydu **58**

2 g (5,7 mmol) związku **57** rozpuściłam w 30 ml *i*-PrOH i dodawałam porcjami roztwór nadmanganianu potasu (2,52 g; 15,97 mmol) w wodzie (10 ml). Postęp reakcji śledziłam na TLC. Po stwierdzeniu, że cały substrat przereagował, dodałam NaIO₄ (2,68 g; 15,54 mmol) w 5 ml wody. Reakcję kontynuowałam w temp. pok. do zaniku substratu. Mieszaninę reakcyjną wylałam na wodę i ekstrahowałam octanem etylu. Połączone warstwy organiczne przemyłam NaHCO₃ do pH=7. Fazę organiczną suszyłam MgSO₄, rozpuszczalnik odparowałam. Pozostałość oczyszczałam na SPE w układach A i B. Otrzymałam 1,45g związku **58** z wyd. 73%.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 0,24 (s, 6H, SiCH₃); 1,03 (s, 9H, Si-*t*-Bu); 2,19 (s, 3H, C₆H₅-CH₃); 3,73 (m, 5H, OCH₃, C₆H₅CH₂); 5,12 (s, 2H, OCH₂); 9,63 (s, 1H, CHO).

5.1.12. Synteza 6-(2-hydrokso-3-metylobut-3-ynyl)-5-metoksy-7-(2-*tert*-butyldimetylosililo)-oksy)-4-metylo-3*H*-izobenzofuran-2-onu **59**

W kolbie umieściłam 0,15 g (6,21 mmola) magnezu, 0,37ml (4,14 mmola) 2-bromopropenu i kryształek jodu w suchym THF. Mieszaninę ogrzewałam do wrzenia przez 5 godz. w atmosferze argonu, do zaniku obecności metalicznego Mg. W drugiej kolbie przygotowałam roztwór aldehydu **58** (1,45 g; 4,14 mmola) w THF. Roztwór schłodziłam do -78°C i dodałam kroplami przygotowany wcześniej odczynnik Grignarda. Reakcję kontynuowałam do zaniku substratu (TLC). Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodałam nasycony roztwór NH₄Cl i octan etylu. Warstwę wodną ekstrahowałam trzykrotnie octanem etylu. Połączone ekstrakty przemyłam solanką, wysuszyłam bezwodnym siarczanem magnezu i odparowałam rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Po oczyszczaniu metodą SPE uzyskałam 1,1g produktu **59** (wyd. 67%).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 0,26 (s, 6H, SiCH₃); 1,01 (s, 9H, Si-*t*-Bu); 1,86 (s, 3H, CH-C(=CH₂)-CH₃); 2,24 (s, 3H, C₆H₅-CH₃); 2,75 (d, 1H, CH₂CH(OH)); 2,99 (m, 4H, C₆H₅-CH₂-CH-); 3,82 (s, 3H, OCH₃); 4,24 (td, 1H, CH₂CH(OH)); 4,82 (t, *J*=1,4Hz, 1H, C=CH₂); 5,02 (t, 1H, *J*=1,4Hz); 5,12 (s, 2H, OCH₂).

5.1.13. Synteza estru etylowego kwasu 6-[1,3-dihydro-4(*tert*-butyldimetylosilolo)-oksy-6-metoksy-7-metylo-3-okso-5-izobenzofuranylo]-4-metylo-heks-4-enowego **60**

W kolbie kulistej umieściłam 1,08 (2,8 mmola) alkoholu **59**, 20 ml ortoocetan trimetylu i 0,041 ml (0,55 mmola) kwasu propionowego i ogrzewałam w temp. 110°C do zaniku substratu (9 godz.). Następnie mieszaninę schłodziłam, dodałam eteru dietylowego i warstwę organiczną przemyłam rozcieńczonym NaHCO₃ i solanką. Warstwę eterową wysuszyłam siarczanem magnezu i rozpuszczalnik odparowałam do sucha. Pozostałość oczyszczałam za pomocą SPE. Otrzymałam 1 g produktu **60** (wyd. 80%).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 0,28 (s, 6H, SiCH₃); 1,03 (s, 9H, Si-*t*-Bu); δ 1,2 (t, *J*=6,96Hz, 3H, OCH₂CH₃); 1,81 (s, 3H, CH-C(CH₃)); 2,2 (s, 3H, C₆H₅-CH₃), 2,52-2,3 (m, 4H, CH₂CH₂CO); 3,39 (d, *J*=6,92Hz, 2H, CH₂CH); 3,78 (s, 3H, OCH₃); 4,06 (q, *J*=7,1Hz, 2H, OCH₂CH₃); 5,22 (s, 2H, OCH₂); 5,28 (t, *J*=6,9Hz, 1H, CH=C(CH₃)).

5.1.14. Synteza estru etylowego kwasu 6-(1,3-dihydro-4-hydroksy)-6-metoksy-7-metylo-3-okso-5-izobenzofuranylo]-4-metylo-heks-4-enowego **61**

Związek **60** (2,16 mmol; 1 g) rozpuściłam w 10 ml THF w 0°C i dodałam *n*-Bu₄NF (2,16 mmol; 0,56 g) w THF. Reakcję kontynuowałam przez 30 min, następnie dodałam wody i ekstrahowałam octanem etylu. Warstwę organiczną wysuszyłam siarczanem magnezu i rozpuszczalnik odparowałam do sucha. Otrzymałam 0,73 g (wyd. 97%) związku **61**.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 1,2 (t, *J*=6,98Hz, 3H, OCH₂CH₃); 1,8 (s, 3H, CH-C(CH₃)); 2,2 (s, 3H, C₆H₅-CH₃), 2,52-2,3 (m, 4H, CH₂CH₂CO); 3,39 (d, *J*=6,9Hz, 2H, CH₂CH); 3,78 (s, 3H, OCH₃); 4,11 (q, *J*=7,1Hz, 2H, OCH₂CH₃); 5,22 (s, 2H, OCH₂); 5,26 (t, *J*=6,9Hz, 1H, CH=C(CH₃)); 7,7 (s, 1H, OH).

5.1.15. Synteza kwasu 6-(4-hydroksy-6-metoksy-7-metylo-3-okso-1,3-dihydroizobenzofuran)-4-metylo-heks-4-enowego **1**

Do roztworu związku **61** (0,73 g; 2,09 mmola) w metanolu (25 ml) dodałam LiOH (0,27 g; 6 mmola) w wodzie (5 ml). Reakcję prowadziłam 18 godz. w temp. pok. Następnie rozcieńczyłam octanem etylu i przemyłam wodą. Fazę wodną zakwasiłam 10% HCl do pH=1

i ekstrahowałam octanem etylu, wysuszyłam siarczanem magnezu. Po odparowaniu rozpuszczalnika do sucha otrzymałam 0,64 g (wyd. 96%) związku **1**.

T. t. 140-142°C; lit. [98] 140-141°C

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 1,83 (s, 3H, $\text{CH}-\text{C}(\underline{\text{CH}_3})$); 2,17 (s, 3H, $\text{C}_6\text{H}_5-\underline{\text{CH}_3}$); 2,31-2,33 (m, 2H, $\text{CH}_2\underline{\text{CH}_2}\text{CO}$); 2,44-2,48 (m, 2H, $\underline{\text{CH}_2}\text{CH}_2\text{CO}$); 3,41 (d, 2H, $J=6,8\text{Hz}$, $\underline{\text{CH}_2}\text{CH}$); 3,78 (s, 3H, $\text{O}\underline{\text{CH}_3}$); 5,22 (s, 2H, $\text{O}\underline{\text{CH}_2}$); 5,26-5,29 (m, 1H, $\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)$); 7,7 (s, 1H, OH).

^{13}C NMR (CDCl_3): δ 179,8; 173,3; 163,9; 153,9; 144,3; 134,1; 123,2; 122,3; 117; 106,6; 70,3; 61,3; 34,5; 33; 22,8; 16,4; 11,8.

5.2. Synteza pochodnych amino-akrydyny/akrydonu

5.2.1. Synteza soli potasowej kwasu *o*-chlorobenzoesowego **97**

50 g (0,319 moli) kwasu *o*-chlorobenzoesowego rozpuściłam w wodzie destylowanej i dodawałam KOH do uzyskania odczynu obojętnego wobec papierka lakmusowego (około 19,1 g; 0,341 mola). Następnie rozpuszczalnik odparowałam do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymałam 61,3 g (0,315 mola) soli potasowej kwasu *o*-chlorobenzoesowego, wyd. 98,8%.

5.2.2. Synteza kwasu *N*-(3'-nitrofenylo)antranilowego **99**

30 g (0,154 mola) soli potasowej kwasu *o*-chlorobenzoesowego, 60 g (0,434 mola) *m*-nitroaniliny i 0,3 g świeżo strąconego pyłu miedzi umieściłam w kolbie kulistej i mieszałam na mieszadle magnetycznym w temp. 125°C przez 1 godz. Następnie gorący stop wlałam do silnie mieszającego się gorącego 0,8 dm³ 5% roztworu węgla potasu. Mieszaninę ogrzałam do wrzenia z węglem aktywnym, przesączyłam i oziębilałam. Wytrącony nadmiar *m*-nitroaniliny odsączyłam, przesącz zakwasiłam stęż. HCl do pH=5÷6 wobec papierka lakmusowego. Wytrącony osad przemyłam gorącą wodą. Otrzymałam 20,3 g (0,079 mola) surowego kwasu *N*-(3'-nitrofenylo)antranilowego, wyd. 51%. Produkt krystalizowałam z etanolu, otrzymując 15,1 g (0,059 mola) związku **99** z wyd. 38%.

T. t.= 215-216°C; lit. [187]= 215-216°C.

5.2.2.1. Przygotowanie katalizatora do reakcji Ullmanna [188]

W kolbie kulistej umieściłam 2 g siarczanu miedzi w 50 ml wody i ogrzałam do całkowitego rozpuszczenia się soli. Następnie dodawałam pył cynkowy porcjami do odbarwienia się roztworu. Zdekantowałam i dodawałam rozc. HCl, aby usunąć pozostałości cynku, do zaniku wydzielania się wodoru. Osad ponownie zdekantowałam, przemyłam kilkakrotnie wodą, metanolem i odparowałam rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Wytrącony pył miedzi przemyłam eterem dietylowym, rozpuszczalnik odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem do sucha. Katalizator używałam od razu do przeprowadzenia reakcji Ullmanna.

5.2.3. Synteza 9-chloro-1-nitroakrydyny 100 i 9-fenoksy-1-nitroakrydyny 101

5,1 g (0,059 mola) kwasu *N*-(3'-nitrofenylo)antranilowego **99** i POCl₃ (55,9 ml; 0,6 mola) ogrzewałam pod chłodnicą zwrotną w zakresie temp. 80-120°C, następnie kontynuowałam reakcję jeszcze 20 min. i nadmiar POCl₃ odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem.

Do pozostałości dodałam niewielką ilość chloroformu i wylałam do mieszaniny amoniak: chloroform (1:3), schłodzonej do -70°C, silnie mieszając. Warstwy rozdzieliłam w rozdzielaczu, warstwę organiczną wysuszyłam bezwodnym MgSO₄. Środek suszący odsączyłam, rozpuszczalnik odparowałam do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Do powstałego osadu dodałam pirydyny, wytrącony osad odsączyłam i przemyłam pirydyną. Przesącz ogrzewałam 20 min. w temp. 60°C, po czym oziębiłam.

Wytrącony osad 9-chloro-1-nitroakrydyny odsączyłam i przemyłam eterem dietylowym. Osad przeniosłam do kolby kulistej umieszczonej na mieszadle magnetycznym i ogrzewałam z fenolem w temp. 80°C przez 45 min. Następnie roztwór ochłodziłam, wylałam do mieszaniny benzen: 5% KOH (1:1, v/v) i wytrząsnęłam. Warstwy rozdzieliłam, warstwę organiczną suszyłam MgSO₄. Środek suszący odsączyłam i rozpuszczalnik oddestylowałam do sucha. Otrzymałam 12,2 g (0,04 mola) związku **101**, wyd. 68%.

T. t.= 195-197°C; lit [189]= 191-197°C.

5.2.4. Synteza 9-(ω -aminoalkilo)amino-1-nitroakrydyny **93a-e**

5.2.4.1. Synteza 9-(ω -aminoetylo)amino-1-nitroakrydyny **93a** - procedura A

Roztwór 9-fenoksy-1-nitroakrydyny **101** (1,2 g; 0,004 mola), dichlorowodoru 1,3-diaminoetanu (1,06 g; 0,008 mola) i fenolu (25 g) ogrzewałam w temp. 60°C przez 0,5 godz. Następnie mieszaninę reakcyjną nieco ochłodziłam, rozcieńczyłam benzenem i zneutralizowałam schłodzonym 10% KOH. Warstwy rozdzieliłam, warstwę organiczną wysuszyłam bezwodnym MgSO₄ i zakwasiłam roztworem HCl w bezwodnym eterze dietylowym. Wytrącony osad odsączyłam i związek **93a** separowałam na drodze chromatografii kolumnowej w układzie B. Otrzymałam 0,5 g (0,0018 mola) produktu z wyd. 45%.

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD), δ [ppm]: 3,36 (t, 2H, $J=5,86\text{Hz}$, NHCH₂CH₂NH₂); 4,01 (t, 2H, $J=5,86\text{Hz}$, ArNHCH₂); 7,59 (t, 1H, $J=7,8\text{Hz}$, C7-H); 7,79 (d, 1H, $J=8,3\text{Hz}$, C4-H); ,02-7,85 (m, 3H, C5,C3,C6-H); 8,1 (m, 1H, C8-H); 8,37 (d, 1H, $J=7,82\text{Hz}$, C2-H).

5.2.4.2. Synteza 9-(ω -aminopropilo)amino-1-nitroakrydyny **93b** - procedura A

Roztwór 9-fenoksy-1-nitroakrydyny (1,2 g; 0,004 mola), dichlorowodoru 1,3-diaminopropanu (1,18 g; 0,008 mola) i fenolu (25 g) ogrzewałam w temp. 60°C przez 0,5 godz. Następnie postępowalam zgodnie z procedurą opisaną dla **93a**. Związek **93b** rozdzielałam na drodze chromatografii kolumnowej w układzie B. Otrzymałam 0,47 g (0,0016 moli) produktu, wyd. 39%.

¹H NMR (500MHz, d₆-DMSO), δ [ppm]: 1,8 (q, 2H, $J=7,33\text{Hz}$, CH₂CH₂CH₂); 1,9 (q, 2H, $J=7,33\text{Hz}$, CH₂CH₂NH₂); 2,88 (m,2H, CH₂CH₂CH₂NH); 3,17 (t, NHCH₂, $J=6,83\text{Hz}$, 1H); 3,74 (t, 2H, $J=5,86\text{Hz}$, CH₂NH₂); 7,09 (t, 1H, $J = 7,3 \text{ Hz}$, C7-H); 7,26 (d, 1H, $J = 8.3 \text{ Hz}$, C4-H); 7,3 (m, C6-H); 7,38 (d, 1H, $J = 8,3 \text{ Hz}$, C3-H); 7,46 (d, 1H, $J = 7,8 \text{ Hz}$, C5-H); 7,5 (t, 1H, $J = 7,3 \text{ Hz}$, C8-H); 7,8 (d, 1H, C2-H, $J= 7,81\text{Hz}$); 11,24 (s, 1H).

5.2.4.3. Synteza 9-(ω -aminobutylo)amino-1-nitroakrydyny 93c - procedura A

W kolbie kulistej umieściłam 9-fenoksy-1-nitroakrydynę (1,19 g; 0,004 mola), dichlorowodorku 1,4-diaminobutanu (1,29 g; 0,008 mola) i fenolu (25 g). Postępując analogicznie jak w przypadku syntezy związku **93a** otrzymałam 0,57 g (0,0018 mola), wyd.46% związku **93c**.

^1H NMR (500 MHz, d_6 -DMSO), δ [ppm]: 7,14 (t, 1H, $J=7,83\text{Hz}$, C3-H); 7,34-7,4 (m, 3H, C4, 6, 7-H); 7,41 (d, 1H, $J=8,3\text{Hz}$, C5-H); 7,45 (t, 1H, $J=7,8\text{Hz}$, C8-H); 7,78 (d, 1H, $J=7,8\text{Hz}$, C2-H); 10,4 (s, 1H, NH).

5.2.4.4. Synteza 9-(ω -aminopentylo)amino-1-nitroakrydyny 93d - procedura A

Zmieszałam 9-fenoksy-1-nitroakrydynę (1,19 g; 0,004 mola), dichlorowodorku 1,5-diaminopentanu (1,4 g; 0,008 mola) i fenolu (25 g). Powtarzając procedurę analogiczną jak przy otrzymywaniu związku **93a** otrzymałam 0,61 g (0,0019 mola) z wyd. 47%

^1H NMR (500 MHz, d_6 -DMSO), δ [ppm]: 1,7 (t, 2H, $J=5,5\text{Hz}$, CH_2NH_2); 1,35-1,89 (m, 6H, $\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2$); 3,08-3,12 (m, 2H, Ar- NHCH_2); 3,55-3,3,61 (m, 2H, CH_2NH_2); 7,14 (t, 1H, $J=7,83\text{Hz}$, C3-H); 7,34-7,4 (m, 3H, C4, 6, 7-H); 7,42 (d, 1H, $J=8,3\text{Hz}$, C5-H); 7,56 (t, 1H, $J=7,8\text{Hz}$, C8-H); 7,88 (d, 1H, $J=7,8\text{Hz}$, C2-H); 10,9 (s, 1H, NH).

5.2.4.5. Synteza 9-(ω -aminoheksylo)amino-1-nitroakrydyny 93e - procedura A

Zmieszałam 9-fenoksy-1-nitroakrydynę (1,19 g; 0,004 mola), dichlorowodorku 1,6-diaminoheksanu (1,51 g; 0,008 mola) i fenolu (25 g). Powtarzając procedurę opisaną przy syntezie związku **25e** otrzymałam 0,66 g (0,002 mola), wyd. 49%.

^1H NMR (500 MHz, d_6 -DMSO), δ [ppm]: 1,8 (t, 2H, $J=5,5\text{Hz}$, CH_2NH_2); 1,24-1,78 (m, 8H, $\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2$); 2,95-3,12 (m, 2H, Ar- NHCH_2); 3,34-3,50 (m, 2H, CH_2NH_2); 7,17 (t, 1H, $J=7,83\text{Hz}$, C3-H); 7,31-7,43 (m, 3H, C4, 6, 7-H); 7,47 (d, 1H, $J=8,3\text{Hz}$, C5-H); 7,61 (t, 1H, $J=7,8\text{Hz}$, C8-H); 7,95 (d, 1H, $J=7,8\text{Hz}$, C2-H); 10,9 (s, 1H, NH).

M/z = 339,1.

5.2.4.6. Synteza *mono*-Boc-etylenodiaminy **110a**

Do silnie mieszającego się roztworu etylenodiaminy (8,18 g; 9,19 ml; 0,136 mola) w 40 ml DCM dodawałam w porcjach roztwór diwęglanu di-*tert*-butylu (4 g; 0,018 mola) w 4 ml DCM w czasie 1 godz. Syntezę kontynuowałam jeszcze przez 1 godz. w temp. wrzenia rozpuszczalnika. Po tym czasie roztwór oziębiłam do 20°C, dodałam 30 ml wody w kilku porcjach w ciągu 45 min. i kontynuowałam mieszanie przez 15 min. Następnie warstwy rozdzieliłam, warstwę wodną usunęłam. Do warstwy organicznej dodałam 20 ml wody i zakwasiłam za pomocą rozc. HCl do pH=1,5 i mieszałam na mieszadle magnetycznym 15 min. Warstwy rozdzieliłam, do warstwy wodnej dodałam 30 ml DCM i zalkalizowałam 25% KOH do pH=12. Warstwy rozdzieliłam, fazę organiczną wysuszyłam bezwodnym MgSO₄. Otrzymałam 2,4 g (0,015 mola), wyd. 83%, związku **29** w postaci żółtego oleju.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 1,44 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1,59 (s, NH₂, 2H); 2,8 (t, 2H, CH₂NH₂, J=5,86Hz); 3,18 (d, 2H, NHCH₂, J=4,88Hz); 5,04 (s, 1H, NHCO).

5.2.4.7. Synteza *mono*-Boc-propylenodiaminy **110b**

Do reakcji użyłam: roztwor propylenodiaminy (10,1 g; 11,35 ml; 0,136 mola) w 40 ml DCM, roztwór diwęglanu di-*tert*-butylu (4 g; 0,018 mola) w 4 ml DCM. Postępując zgodnie z procedurą opisaną dla związku **110a** otrzymałam 2,78 g (0,016 mola) związku **110b** w postaci oleju, wyd. 89%.

Dla związków **110b-e** nie wykonałam widm ¹H NMR. Po sprawdzeniu czystości za pomocą TLC, stosowałam je do reakcji z 9-fenoksy-1-nitroakrydyną **101**.

5.2.4.8. Synteza *mono*-Boc-butylo-diaminy **110c**

Do reakcji użyłam: roztwor butylo-diaminy (12 g; 13,68 ml; 0,136 mola) w 40 ml DCM, roztwór diwęglanu di-*tert*-butylu (4 g; 0,018 mola) w 4 ml DCM.

Postępując zgodnie z procedurą opisaną dla związku **110a** otrzymałam 2,44 g (0,013 mola) związku **110c**, wyd. 81%.

5.2.4.9. Synteza *mono*-Boc-pentylodiaminy **110d**

Do reakcji użyłam: roztwór pentylodiaminy (13,9 g; 15,15 ml; 0,136 mola) w 40 ml DCM, roztwór diwęglanu di-*tert*-butylu (4 g; 0,018 mola) w 4 ml DCM. Postępując zgodnie z procedurą opisaną dla związku **110a** 3,43 g (0,017 mola) związku **110d**, wyd. 94%.

5.2.4.10. Synteza *mono*-Boc-heksylodiaminy **110e**

Do reakcji użyłam: roztwór heksylodiaminy (15,8 g; 18,81 ml; 0,136 mola) w 40 ml DCM, roztwór diwęglanu di-*tert*-butylu (4 g; 0,018 mola) w 4 ml DCM. Postępując zgodnie z procedurą opisaną dla związku **110a** otrzymałam 2,6 g (0,014 mola) związku **110e**, wyd. 78%.

5.2.4.11. Synteza 9-(ω -aminoetylo)amino-1-nitroakrydyny **93a** - procedura B

Roztwór *mono*-Boc-etylenodiaminy **110a** (0,53 g; 3,3 mmola), 9-fenoksy-1-nitroakrydyny **101** (1 g; 3,3 mmola) w fenolu mieszałam na mieszadle magnetycznym 45 min. w temp. 60°C. Następnie roztwór nieco oziębiłam, rozcieńczyłam benzenem i zneutralizowałam schłodzonym 10% KOH. Warstwy rozdzieliłam, warstwę benzenową wysuszyłam MgSO₄. Rozpuszczalnik „odparowałam” do sucha, oczyszczałam za pomocą chromatografii kolumnowej w układzie B. Związek **111a** przeniosłam do kolby kulistej i po dodaniu TFA mieszałam na mieszadle magnetycznym 10 min. Następnie TFA oddestylowałam na wyparce rotacyjnej, pozostałość przemyłam kilkakrotnie eterem dietylowym, każdorazowo „odparowując” eter dietylowy pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczałam na kolumnie w układzie A, otrzymując 0,73 g (2,6 mmola) produktu **93a**, wyd. 79%.

5.2.4.12. Synteza 9-(ω -aminopropylo)amino-1-nitroakrydyny **93b** - procedura B

Mono-Boc-propylodiaminę **110b** (0,57 g; 3,3 mmola), 9-fenoksy-1-nitroakrydynamę **101** (1g; 3,3 mmola) i fenolu umieściłam w kolbie reakcyjnej i postępowалаm zgodnie z procedurą opisaną dla związku **93a**. Otrzymałam 0,71 g (2,41 mmola) związku **93b** z wyd. 73%.

5.2.4.13. Synteza 9-(ω -aminobutylo)amino-1-nitroakrydyny **93c** - procedura B

Mono-Boc-butylodiaminę **110c** (0,62 g; 3,3 mmola), 9-fenoksy-1-nitroakrydynę **101** (1 g; 3,3 mmola) i fenolu umieściłam w kolbie reakcyjnej i postępowalam zgodnie z procedurą opisaną dla związku **93a**. Otrzymałam 0,77 g (2,49 mmola) związku **93c**, wyd. 75%.

Przed zdjęciem osłony:

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 1,42 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 1,6 (m, 2H, $\text{ArNHCH}_2\text{CH}_2$); 1,68 (qw, 2H, $J=6,35\text{Hz}$, $\text{ArNHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 3,1 (q, 2H, CONHCH_2 , $J=6,35\text{Hz}$); 3,63 (m, 2H, ArNHCH_2); 4,7 (s, 1H, NHCO); 7,16(t, 1H, $J=7,81\text{Hz}$, C3-H); 7,29-7,41 (m, 3H, C4, 6, 7-H); 7,41 (d, 1H, $J=8,32\text{Hz}$, C5-H); 7,45 (t, 1H, $J=7,8\text{Hz}$, C8-H); 7,81 (d, 1H, $J=7,8\text{Hz}$, C2-H); 10,4 (s, 1H, NH).

5.2.4.14. Synteza 9-(ω -aminopentylo)amino-1-nitroakrydyny **93d** - procedura B

Mono-Boc-pentylodiaminę **110d** (0,67 g; 3,3 mmola), 9-fenoksy-1-nitroakrydynę **101** (1g; 3,3 mmola) i fenolu umieściłam w kolbie reakcyjnej i postępowalam zgodnie z procedurą opisaną dla związku **93a**. Otrzymałam 0,72 g (2,21 mmola) związku **93d**, wyd. 69%.

5.2.4.15. Synteza 9-(ω -aminoheksylo)amino-1-nitroakrydyny **93e** - procedura B

Mono-Boc-heksylodiaminę **110e** (0,71 g; 3,3 mmola), 9-fenoksy-1-nitroakrydynę **101** (1 g; 3,3 mmola) i fenolu umieściłam w kolbie reakcyjnej i postępowalam zgodnie z procedurą opisaną dla związku **93a**. Otrzymałam 0,79 g (2,34 mmola) związku **93e**, wyd. 71%.

KOH do pH=12. Warstwy rozdzieliłam, fazę organiczną wysuszyłam bezwodnym MgSO_4 . Otrzymałam 2,4 g (0,015 mola), wyd. 83%, związku **29** w postaci żółtego oleju.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 1,44 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 1,59 (s, NH_2 , 2H); 2,8 (t, 2H, CH_2NH_2 , $J=5,86\text{Hz}$); 3,18 (d, 2H, NHCH_2 , $J=4,88\text{Hz}$); 5,04 (s, 1H, NHCO).

5.2.5. Synteza kwasu *N*-(3'-nitro-5'-chlorofenylo)antranilowego **113**

W kolbie kulistej umieszczonej na mieszadle magnetycznym i zaopatrzonej w płaszcz grzejny umieściłam 20g (0,103 mola) soli potasowej kwasu *o*-chlorobenzoowego, 17,74 g (0,103 mola) 2-nitro-5-chloroaniliny i katalityczną ilość świeżo strąconego pyłu miedzi w alkoholu izoamylowym. Mieszaninę reakcyjną ogrzewałam do wrzenia przez 5 godz. pod chłodnicą zwrotną. Następnie rozpuszczalnik odparowałam z parą wodną, a produkt wytrąciłam z roztworu rozcieńczonym kwasem solnym. Otrzymany osad przemyłam kilkakrotnie wodą. Po wysuszeniu otrzymałam 22,9 g (0,078 mola) związku, z wyd. 76%.

T.t.= 226-228°C ; lit. [190] 228°C

5.2.6. Synteza 1-chloro-4-nitro-9(10H)-akrydonu **104a**

10 g (0,034 mola) związku **113** rozpuściłam w 50 g (28 ml) stężonego kwasu siarkowego i ogrzewałam w temp. 95°C przez 1,5 godz. pod chłodnicą zwrotną. Mieszaninę po zakończeniu reakcji wylałam do gorącej wody. Wytrącony osad odsączyłam, przemyłam kilkakrotnie wodą i suszyłam na powietrzu. Otrzymałam 8 g (0,027 mola) związku **104a** z wyd. 81%.

T. t.= 247-248°C ; lit. [191] 248-249°C

¹H NMR (200 MHz, d₆-DMSO), δ [ppm]: 7,5-7,38 (m, 2H); 7,6-7,5 (m, 2H); 7,76-7,74 (m, 1H); 7,8-7,68 (m, 1H); 13,37 (s, H, N10-H).

5.2.7. Synteza 1-(ω-aminoalkilo)amino-4-nitro-9(10H) **94a-e**

5.2.7.1. Synteza 1-(ω-aminoetylo)amino-4-nitro-9(10H)akrydonu **94^a**

Do zawiesiny 1-chloro-4-nitro-9(10H)akrydonu (0,89 g; 0,003 mola) w 50 ml DMSO dodałam etylenodiaminę (0,72 g; 0,8 ml; 0,012 mola) i mieszałam na mieszadle magnetycznym przez 3 godz. w temp. pok. Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodałam wodę i kontynuowałam mieszanie przez 10 min.

Po tym czasie mieszaninę przesączyłam, pozostały na sączku osad przemyłam wodą. Surowy produkt przeniosłam do kolby, dodałam wody, zakwasiłam kwasem solnym i mieszałam 10 min. Osad odsączyłam, a przesącz zalkalizowałam za pomocą NaOH i ekstrahowałam chloroformem. Warstwy rozdzieliłam, warstwę organiczną suszyłam bezwodnym MgSO₄.

Otrzymałam 0,65 g (0,0023 mola, wyd. 76%) związku **94a**, nieco zanieczyszczonego związkiem **104a**. Oczyszczałam go za pomocą SPE. Jako eluent stosowałam chloroform:metanol w gradiencie stężeń od 100% chloroform do chloroform:metanol 9:1 (układ B).

70 mg (0,24 mmola) zanieczyszczonego związku **94a** naniosłam w postaci zawiesiny w chloroformie na kolumnę SPE po pojemności 15 cm³. Otrzymałam 46 mg czystego związku **94a**.

¹H NMR (500 MHz, d₆-DMSO), δ [ppm]: 3,11 (m, 2H, ArNHCH₂); 3,8 (m, 2H, CH₂CH₂NH₂); 6,75 (d, 1H, *J*=9,8Hz, C2-H); 7,44 (t, 1H, *J*=7,3Hz, C7-H); 7,82 (1H,m, C6-H); 8,02 (d, 1H, *J*=8,3Hz, C5-H); 8,24 (d, 1H, *J*=7,8Hz, C8-H); 8,45 (d, 1H, *J*=9,8Hz, C3-H); 11,85 (m, 1H, NH akr); 12,41 (s, 1H, N10-H).

5.2.7.2. Synteza 1-(ω-aminopropyl)amino-4-nitro-9(10H)akrydonu **94b**

0,89 g (0,003 mola) 1-chloro-4-nitro-9(10H)-akrydonu, dichlorowodorek 1,3-diaminopropanu (1,76 g, 0,012 mola) i Et₃N (3,3 ml; 0,024 mola) umieściłam w kolbie kulistej na mieszadle magnetycznym i postępowalam analogicznie jak w przypadku syntezy związku **94a**. Otrzymałam 0,66 g (0,0021 mola) związku **94b**, wyd. 70%.

¹H NMR (500MHz, d₆-DMSO), δ [ppm]: 1,9-1,8 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂); 2,6 (m, 2H, ArCH₂CH₂); 3,25-3,35 (m, 2H, CH₂CH₂NH₂); 6,17 (d, 1H, *J*=9,89Hz, C2-H); 7,04 (t,1H, *J*=7,69Hz, C6-H); 7,25 (d, 1H, *J*=8,24Hz, C5-H); 7,39 (t, 1H, *J*=7,96Hz, C7-H); 7,95 (d, 1H, *J*=7,96Hz, C8-H); 8,16 (d, 1H, *J*=9,89Hz, C3-H); 11,61 (m, 1H, NH akr); 12,22 (s, 1H, N10-H).

5.2.7.3. Synteza 1-(ω-aminobutyl)amino-4-nitro-9(10H)akrydonu **94c**

Do reakcji używałam 0,89 g (0,003 mola) 1-chloro-4-nitro-9(10H)-akrydonu, dichlorowodorek 1,4-diaminobutanu (1,93 g; 0,012 mola) i Et₃N (3,3 ml; 0,024 mola). Stosując procedurę opisaną przy otrzymywaniu związku **94a** otrzymałam 0,71 g (0,0022 mola) związku **94c**, wyd. 73%.

^1H NMR (500 MHz, d_6 -DMSO), δ [ppm]: 1,76-1,92 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 2,71 (m, 2H, Ar-NH CH_2); 3,27-3,35 (m, 2H, CH_2NH_2); 6,25 (d, 1H, $J=9,95\text{Hz}$, C2-H); 7,12 (t, 1H, $J=7,74\text{Hz}$, C6-H); 7,36 (d, 1H, $J=8,29\text{Hz}$, C5-H); 7,45 (t, 1H, $J=7,74\text{Hz}$, C7-H); 8,04 (d, 1H, $J=7,74\text{Hz}$, C8-H); 8,21 (d, 1H, $J=9,95\text{Hz}$, C3-H); 11,4 (m, 1H, NH akr); 12,15 (s, 1H, N10-H).

5.2.7.4. Synteza 1-(ω -aminopentylo)amino-4-nitro-9(10H)akrydonu 94d

Do reakcji używałam 0,89 g (0,003 mola) 1-chloro-4-nitro-9(10H)-akrydonu, dichlorowodorek 1,5-diaminopentanu (2,1 g; 0,012 mola) i Et_3N (3,3 ml; 0,024 mola). Otrzymałam 0,69 g (0,002 mola), wyd. 68%.

^1H NMR (500 MHz, d_6 -DMSO), δ [ppm]: 1,21 (t, 2H, $J=7,3\text{Hz}$, NH_2); 1,5-1,95 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 2,75-2,85 (m, 2H, Ar-NH CH_2); 3,19-3,3 (m, 2H, CH_2NH_2); 6,64 (d, 1H, $J=9,8\text{Hz}$, C2-H); 7,43 (t, 1H, $J=7,3\text{Hz}$, C6-H); 7,9-7,7 (m, 1H, C5-H); 8,01 (d, 1H, $J=8,3\text{Hz}$, C7-H); 8,23 (d, 1H, $J=7,8\text{Hz}$, C8-H); 8,42 (d, 1H, $J=10,26\text{Hz}$, C3-H); 11,9 (m, 1H, NH akr); δ 12,49 (s, 1H, N10-H).

5.2.7.5. Synteza 1-(ω -aminoheksylo)amino-4-nitro-9(10H)akrydonu 94e

Do reakcji używałam 0,89g (0,003 mola) 1-chloro-4-nitro-9(10H)-akrydonu, dichlorowodorek 1,6-diaminoheksanu (2,27 g; 0,012 mola) i Et_3N (3,3 ml; 0,024 mola). Otrzymałam 0,69 g (0,002 mola), wyd. 65%.

^1H NMR (500 MHz, d_6 -DMSO), δ [ppm]: 1,06 (t, 2H, $J=6,8\text{Hz}$, NH_2); 1,4-1,6 (m, 4H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$); 1,65-1,85 (m, 4H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$); 2,9-2,7 (m, 2H, Ar-NH CH_2); 3,15-3,2 (m, 2H, CH_2NH_2); 6,56 (d, 1H, $J=9,75\text{Hz}$, C2-H); 7,44 (t, 1H, $J=7,31\text{Hz}$, C6-H); 7,8 (t, 1H, $J=7,31\text{Hz}$, C5-H); 7,99 (d, 1H, $J=8,7\text{Hz}$, C7-H); 8,25 (d, 1H, $J=7,8\text{Hz}$, C8-H); 8,43 (d, 1H, $J=9,75\text{Hz}$, C3-H); 11,85 (m, 1H, NH akr); 12,49 (s, 1H, N10-H).

5.3. Synteza analogów MPA z pochodnymi amino-akrydyny/akrydonu

5.3.1. Synteza analogów MPA z pochodnymi amino-akrydyny

5.3.1.1. Synteza amidu 9-(ω -aminoetylo)amino-1-nitroakrydynowego MPA 91a

Do roztworu kwasu mykofenolowego (100 mg, 0,3125 mmoli) i dichlorowodoru 9-(ω -aminoetylo)amino-1-nitroakrydyny (110,9 mg; 0,3125 mmola) dodałam 0,067 ml (0,3125 mmola) DPPA w DMF, a następnie Et₃N, 0,56 ml (0,625 mmola) w DMF w ciągu 5 min. Roztwór mieszałam na mieszadle magnetycznym w temp. 0°C przez 2 godz., a następnie przez 24 godz. w temp. pok. Po tym czasie rozpuszczalnik odparowałam na pompie próżniowej, utrzymując możliwie niską temp. Związek oczyszczałam na kolumnie w układzie B lub C. Otrzymałam 131 mg (0,225 mmola) związku **91a**, wyd. 72%

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 1,7 (s, 3H, CH-C(CH₃)); 2,15 (s, 3H, C₆H₅-CH₃); 2,4-2,2 (m, 4H, CH₂CH₂CO); 3,75 (s, 3H, OCH₃); 4,0-3,9 (m, 2H, NHCH₂CH₂NH); 4,1 (m, 2H, ArNHCH₂); 5,05 (s, 2H, OCH₂); 5,3-5,2 (m, 1H CH=C(CH₃)); 6,65 (s, 1H, NHCO); 7,65 (m 1H, C7-H); 7,82 (m, 1H, C4-H); 8,1-7,8 (m, 3H, C5,C3,C6-H); 8,16 (m, 1H, C8-H); 8,42 (m, 1H, C2-H).

λ_{\max} (CHCl₃)/nm 279, 385 (ϵ / dm³ mol⁻¹ cm¹ 10434, 3165).

Anal. elementarna: C₃₂H₃₂N₄O₇: Obliczone: C, 65.74; H, 5.52; N, 9.58; O, 19.16. Otrzymane: C, 65.87; H, 5.63; N, 9.32; M/z =585,2.

5.3.1.2. Synteza amidu 9-(ω -aminopropilo)amino-1-nitroakrydynowego MPA 91b

Do reakcji użyłam: kwas mykofenolowy (100 mg; 0,3125 mmola), dichlorowodorek 9-(ω -aminopropilo)amino-1-nitroakrydyny (115,3 mg; 0,3125 mmola), 0,067 ml (0,3125 mmola) DPPA w DMF, Et₃N (0,056 ml; 0,625 mmola). Następnie postępowałam zgodnie z procedurą opisaną dla związku **91a**. Otrzymałam 107,6 mg związku **91b** (0,18 mmola), wyd. 59%.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 1,77 (s, 3H, $\text{CH-C}(\underline{\text{CH}_3})$); 1,8-1,9 (m, 2H, $\text{CH}_2\underline{\text{CH}_2}\text{CH}_2$); 2,26 (s, 3H, $\text{C}_6\text{H}_5\underline{\text{-CH}_3}$); 2,4-2,2 (m, 4H, $\underline{\text{CH}_2}\text{CH}_2\underline{\text{CO}}$); 3,3 (m, 2H, $\text{Ar}\underline{\text{CH}_2}\text{CH}_2$); 3,4 (d, 2H, $J=6,9\text{Hz}$, $\underline{\text{CH}_2}\text{CH}$); 3,6 (m, 2H, $\text{CH}_2\underline{\text{CH}_2}\text{NHCO}$); 3,74 (s, 3H, OCH_3); 5,22 (s, 2H, OCH_2); 5,28 (m, 1H, $\text{CH}=\text{C}(\underline{\text{CH}_3})$); 6,38 (s, 1H, NHCO); 7,09 (t, 1H, $J = 7,3$ Hz, C7-H); 7,26 (d, 1H, $J = 8,3$ Hz, C4-H); 7,3 (m, 1H, C6-H); 7,38 (d, 1H, $J = 8,3$ Hz, C3-H); 7,46 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz, C5-H); 7,5 (t, 1H, $J = 7,3$ Hz, C8-H); 7,8 (d, 1H, $J = 8,31\text{Hz}$, C2-H).

λ_{max} (CHCl_3)/nm 280, 388 ($\epsilon / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 19988, 3418).

Anal. elementarna: Obliczone: $\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_7$: C, 66.21; H, 5.72; N, 9.36; O, 18.71. Otrzymane: C, 66.39; H, 5.66; N, 9.57; $M/z=599,8$.

5.3.1.3. Synteza amidu 9-(ω -aminobutylo)amino-1-nitroakrydynowego MPA 91c

Do reakcji użyłam : kwas mykofenolowy (100 mg; 0,3125 mmola), dichlorowodorek 9-(ω -aminobutylo)amino-1-nitroakrydyny (119,7 mg; 0,3125 mola), DPPA (0,067 ml; 0,3125 mmola) w DMF, Et_3N (0,056 ml; 0,625 mmola). Następnie postępowalam zgodnie z procedurą opisaną dla związku 91a. Otrzymałam 110,2 mg związku 91c (0,18 mola), wyd. 55%.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 1,52-1,7 (m, 4H, $\text{ArNHCH}_2\underline{\text{CH}_2}\text{CH}_2$); 1,85 (s, 3H, $\text{CH-C}(\underline{\text{CH}_3})$); 2,18 (s, 3H, $\text{C}_6\text{H}_5\underline{\text{-CH}_3}$); 2,35-2,31 (m, 4H, $\underline{\text{CH}_2}\text{CH}_2\underline{\text{CO}}$); 3,18-3,07 (m, 2H, $\text{CONH}\underline{\text{CH}_2}$); 3,4 (d, 2H, $J = 7,32$ Hz, $\underline{\text{CH}_2}\text{CH}$); 3,7-3,6 (m, 2H, $\text{ArNH}\underline{\text{CH}_2}$); 3,78 (s, 3H, OCH_3); 5,23 (s, 2H, OCH_2); 5,3-5,25 (m, 1H, $\text{CH}=\text{C}(\underline{\text{CH}_3})$); 6,25 (s, 1H, NHCO); 7,22 (d, 1H, $J = 8,24\text{Hz}$, C3-H); 7,58 (m, 1H, C4, 6, 7-H); 7,73 (d, 1H, $J = 7,63\text{Hz}$, C5-H); 7,85 (d, 2H, $J = 7,43\text{Hz}$, C8-H); 8,45 (d, 2H, $J = 8,24\text{Hz}$, C2-H).

λ_{max} (CHCl_3)/nm 278, 385 ($\epsilon / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 23428, 5037).

Anal. elementarna: Obliczone: $\text{C}_{34}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_7$: C, 66.65; H, 5.92; N, 9.14; O, 18.28. Otrzymane: C, 66.77; H, 5.81; N, 9.32; $M/z=613,1$.

5.3.1.4. Synteza amidu 9-(ω -aminopentylo)amino-1-nitroakrydynowego MPA 91d

Do reakcji użyłam : kwas mykofenolowy (100 mg; 0,3125 mmola), 124 mg (0,3125mola) dichlorowodoru 9-(ω -aminopentylo)amino-1-nitroakrydyny, 0,067 ml (0,3125 mmola) DPPA w DMF, Et₃N (0,056 ml; 0,625 mmola). Następnie postępowalam zgodnie z procedurą opisaną dla związku **91a**. Uzyskałam 100,2 mg (0,16 mmola) związku **91d**, wyd. 52%.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 1,3-1,8 (m, 6H, NHCH₂(CH₂)₃CH₂); 1,85 (s, 3H, CH-C(CH₃)); 2,2 (s, 3H, C₆H₅-CH₃); 2,31-2,52 (m, 4H, CH₂CH₂CO); 3,24-3,1 (m, 2H, Ar-NHCH₂); 3,4 (d, 2H, $J = 6,84$ Hz, CH₂CH); 3,7-3,5 (m, 2H, CH₂NH); 3,78 (s, 3H, OCH₃); 5,21 (s, 2H, OCH₂); 5,3-5,2 (m, 1H, CH=C(CH₃)); 6,21 (s, 1H, NHCO); 7,39 (d, 1H, $J = 8,3$ Hz, C3-H); 7,55 (d, 1H, $J = 4,8$ Hz, C4-H); 7,6 (d, 1H, $J = 6,8$ Hz, C6-H); 7,78 (m, 1H, C7-H); 7,83 (d, 1H, $J = 6,8$ Hz, C5-H); 8,15 (m, 1H, C8-H); 8,25 (d, 1H, $J = 8,3$ Hz, C2-H).

λ_{\max} (CHCl₃)/nm 278, 441 ($\epsilon / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 14950, 2362).

Anal. elementarna: Obliczone: C₃₅H₃₈N₄O₇: C, 67.08; H, 6.11; N, 8.94; O, 17.87. Otrzymane: C, 67.21; H, 6.24; N, 8.75; M/z =627,4.

5.3.1.5. Synteza amidu 9-(ω -aminoheksylo)amino-1-nitroakrydynowego MPA 91a

Do reakcji użyłam: kwas mykofenolowy (100 mg; 0,3125 mmola), dichlorowodorek 9-(ω -aminoheksylo)amino-1-nitroakrydyny (128,75 mg; 0,3125 mola), DPPA (0,067 ml; 0,3125 mmola) w DMF, Et₃N (0,056 ml; 0,625 mmola). Następnie postępowalam zgodnie z procedurą opisaną dla związku **91a**. Uzyskałam 101,48 mg (0,155 mmola) związku **91e**, wyd. 49,5%.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 1,79 (s, 3H, CH-C(CH₃)); 1,8-1,3 (m, 8H, NHCH₂(CH₂)₄CH₂); 2,16 (s, 3H, C₆H₅-CH₃); 2,3 (m, 4H, CH₂CH₂CO); 3,13-3,08 (m, 2H, Ar-NHCH₂); 3,38 (d, 2H; $J=6,83$ Hz, CH₂CH); 3,6-3,5 (m, 2H, CH₂NH); 3,77 (s, 3H, OCH₃); 5,19 (s, 2H, OCH₂); 5,3-5,2 (m, 1H, CH=C(CH₃)); 6,12 (s, 1H, NHCO); 7,08 (t, 1H, $J=7,3$ Hz, C3-H); 7,37 (d, 1H, $J=7,3$ Hz, C4-H); 7,48-7,6 (m, 2H, 6, 7 C-H); 7,88 (d, 1H, $J=8,8$ Hz C5-H); 7,92 (d, 1H, $J=7,32$ Hz, C8-H); 8,36 (d, 1H, $J=7,33$ Hz, C2-H).

λ_{\max} (CHCl₃)/nm 279, 385 (ϵ / dm³ mol⁻¹ cm¹ 14454, 2323).

Anal. elementarna: Obliczone: C₃₆H₄₀N₄O₇: C, 67.48; H, 6.29; N, 8.74; O, 17.48. Otrzymane: C, 67.33; H, 6.18; N, 8.95; M/z =641,1.

5.3.2. Synteza analogów MPA z pochodnymi amino-akrydonu

5.3.2.1. Synteza amidu 9-(ω -aminoetylo)amino-4-nitro-9(10H)akrydonu MPA 92a

Roztwór kwasu mykofenolowego (139,6 mg; 0,436 mmoli) i HOBt (67,14 mg; 0,436 mmola) w suchym DMF mieszałam 10 min. na mieszadle magnetycznym. Następnie dodałam EDCI (67,2 mg; 0,436 mmoli) i 9-(ω -aminoetylo)amino-4-nitro-9(10H)akrydonu (129,3 mg; 0,436 moli). Reakcję kontynuowałam przez 24 godz. w temp.pok. Następnie DMF odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem na pompie próżniowej. Związek oczyszczałam metodą chromatografii kolumnowej w układzie B . Otrzymałam 83,71 mg (0,14 mmola) produktu **92a**, wyd.32%.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 1,8 (m, 2H, CH-C(CH₃)); 2,17 (s, 3H, C₆H₅-CH₃); 2,3-2,2 (m, 2H, CH₂CH₂CO); 2,5-2,3 (m, 2H, CH₂CH₂CO); 3,41 (m, 2H, CH₂CH); 3,75 (m, 2H, CH₂CH₂NH); 3,8 (s, 1H, OCH₃); 5,15 (s, 1H, OCH₂); 5,18-5,16 (m, 1H, CH=C(CH₃)); 6,09 (s, NHCO); 6,5 (d, 1H, $J=9,8$ Hz, C2-H); 7,3 (d, 1H, $J=7,3$ Hz C7-H); 7,74 (m, 1H, C6-H); 8,1 (m, 1H, C5-H); 8,33 d, 1H, $J=7,3$ Hz, C8-H,); 8,47 (d, 1H, $J=9,8$ Hz, C3-H); 11,99 (m, 1H, NH akr.); 12,61 (s, 1H, N10-H).

λ_{\max} (CHCl₃)/nm 305, 343, 431 (ϵ / dm³ mol⁻¹ cm¹ 9314, 7450, 10072).

Anal. elementarna: Obliczone: C₃₂H₃₂N₄O₈: C, 63.99; H, 5.37; N, 9.33; O, 21.31. Otrzymane: C, 63.86; H, 5.45; N, 9.49; M/z=600,8.

5.3.2.2. Synteza amidu 9-(ω -aminopropyl)amino-4-nitro-9(10H)akrydonu MPA 92b

Do reakcji użyłam: 80 mg (0,25 mmola) MPA, 38,5 mg (0,25 mmola) HOBt, 38,81mg (0,25mmola) EDCI i 78 mg (0,25 mmola) związku **94b**. Otrzymałam 50,66 mg (0,0825 mmola) związku **92b**, wyd.33%.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 1,8 (s, 3H, $\text{CH}-\text{C}(\text{CH}_3)$); 1,95 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 2,4-1,9 (m, 4H); 2,2 (s, 3H, $\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_3$); 2,3-2,5 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$); 3,4 (m, 2H, ArCH_2CH_2); 3,4 (d, 2H, $J=6,84\text{Hz}$, CH_2CH); 3,8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3,83 (s, 3H, OCH_3); 5,17 (s, 1H, OCH_2); 5,2-5,05 (m, 1H, $\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)$), 6,09 (NHCO , s, 1H); 6,17 (d, 1H, $J=9,89\text{Hz}$, C2-H); 7,35 (d, 1H, C2-H, $J=9,76\text{Hz}$); 7,4 (d, 1H, $J=7,81\text{Hz}$, C6-H); 7,65 (d, 1H, $J=7,82\text{Hz}$, C5-H); 7,7 (t, 1H, $J=7,33\text{Hz}$, C7-H); 8,28 (d, 1H, $J=8,31\text{Hz}$, C8-H); 8,37 (d, 1H, $J=9,77\text{Hz}$, C3-H); 11,89 (m, 1H, NH akr.); 12,52 (s, 1H, N10-H).

λ_{max} (CHCl_3)/nm 309, 344, 430 ($\epsilon / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 15764, 17771, 27217).

Anal. elementarna: Obliczone: $\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_8$: C, 64.48; H, 5.58; N, 9.12; O, 20.82. Znaleziono: C, 64.57; H, 5.50; N, 9.28; $[\text{M}+\text{K}]^+ = 653,1$; $[\text{M}+23]^+ = 637$.

5.3.2.3. Synteza amidu 9-(ω -aminobutylo)amino-4-nitro-9(10H)akrydonu MPA 92c

Do reakcji użyłam: 80 mg (0,25 mmola) MPA, 38,5 mg (0,25 mmola) HOBt, 38,81 mg (0,25 mmola) EDCI i 90,63 mg (0,25 mmola) związku **94c**. Otrzymałam 50,1 mg (0,078 mmola) związku **92c**, wyd. 32%.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 1,65-1,8 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 1,89 (s, 3H, $\text{CH}-\text{C}(\text{CH}_3)$); 2,18 (s, 3H, $\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_3$); 3,25 (m, 2H, $\text{Ar}-\text{NHCH}_2$); 3,3-3,5 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$); 3,41 (d, 2H, $J=6,81\text{Hz}$, CH_2CH); 3,45 (m, 2H, CH_2NH); 3,76 (s, 3H, OCH_3); 5,2 (s, 2H, OCH_2); 5,3-5,25 (m, 1H, $\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)$); 5,95 (s, 1H, NHCO); 6,35 (d, 1H, $J=10,24\text{Hz}$, C2-H); 7,4 (t, 1H, $J=7,3\text{Hz}$, C6-H); 7,46 (d, 1H, $J=8,3\text{Hz}$, C5-H); 7,75 (t, 1H, $J=7,33\text{Hz}$, C7-H); 8,35 (d, 1H, $J=7,81\text{Hz}$, C8-H); 8,45 (d, 1H, $J=9,77\text{Hz}$, C3-H); 11,95 (s, 1H, NH akr.); 12,6 (s, 1H, N10-H).

λ_{max} (CHCl_3)/nm 309, 344, 431 ($\epsilon / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 4962, 5390, 8325).

Anal. elementarna: Obliczone: $\text{C}_{34}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_8$: C, 64.96; H, 5.77; N, 8.91; O, 20.36. Otrzymane: C, 64.85; H, 5.69; N, 8.80; $[\text{M}+\text{K}]^+ = 667,1$; $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 651,1$; $\text{M}/z = 628$.

5.3.2.4. Synteza amidu 9-(ω -aminopentylo)amino-4-nitro-9(10H)akrydonu MPA 92d

Do reakcji użyłam: 122,21 mg (0,38 mmola) MPA, 58,52 mg (0,38 mmola) HOBt, 59 mg (0,38 mmola) EDCI i 130 mg (0,38 mmola) związku **94d**. Otrzymałam 92,7 mg (0,144 mmola) związku **92d**, wyd. 29%.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 1,5-1,7 (m, 6H $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 1,8 (s, 3H, $\text{CH}-\text{C}(\text{CH}_3)$); 1,85 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$); 2,15 (s, 3H, $\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_3$); 2,2 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$); 3,42 (d, 2H, $J=6,81\text{Hz}$, CH_2CH); 3,25 (m, 2H, $\text{Ar}-\text{NHCH}_2$); 3,45 (m, 2H, CH_2NH_2); 3,77 (s, 3H, OCH_3); 5,3 (s, 2H, OCH_2); 5,35 (m, 1H, $\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)$); 5,68 (s, 1H, NHCO); 6,39 (d, 1H, $J=9,76\text{Hz}$, C2-H); 7,4 (t, 1H, $J=7,33\text{Hz}$, C6-H); 7,5 (d, 1H, $J=7,8\text{ Hz}$, C5-H); 7,7 (s, 1H, OH); 7,75 (t, 1H, $J=7,33\text{Hz}$, C7-H); 8,35 (d, 1H, $J=8,3\text{Hz}$, C8-H); 8,46 (d, 1H, $J=9,77\text{Hz}$, C3-H); 11,98 (s, 1H, NH akr.); 12,69 (s, 1H, N10-H).

λ_{max} (CHCl_3)/nm 309, 345, 431 ($\epsilon / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 9601, 11044, 18196).

Anal. elementarna: Obliczone: $\text{C}_{35}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_8$: C, 65.41; H, 5.96; N, 8.72; O, 19.92. Otrzymane: C, 65.51; H, 5.85; N, 8.59; m/z 643,6.

5.3.2.5. Synteza amidu 9-(ω -aminoheksylo)amino-4-nitro-9(10H)akrydonu MPA 92e

Do reakcji użyłam: 120 mg (0,375 mmola) MPA, 58,6 mg (0,375 mmola) HOBt, 58,2 mg (0,375 mmola) EDCI i 212 mg (0,6 mmola) związku **94e**. Otrzymałam 67,3 mg (0,103 mmola) związku **92e**, wyd. 27%.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 1,25-1,55 (m, 8H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2$); 1,83 (s, 3H, $\text{CH}-\text{C}(\text{CH}_3)$); 2,15 (s, 3H, $\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_3$); 2,3 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$); 2,6-2,4 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$); 3,3 (m, 2H, $\text{Ar}-\text{NHCH}_2$); 3,35 (m, 2H, CH_2CH); 3,55 (m, 2H, 3,75 (s, 3H, OCH_3); 5,18 (s, 2H, OCH_2); 5,3-5,2 (m, 1H, $\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)$); 5,86 (s, NHCO); 6,37 (d, 1H, $J=9,77\text{Hz}$, C2-H); 7,39 (m, 1H, C6-H); 7,47 (d, 1H, $J=8,3\text{Hz}$, C5-H); 7,76 (t, 1H, $J=7,81\text{Hz}$, C7-H); 8,35 (d, 1H, $J=7,81\text{Hz}$, C8-H); 8,45 (d, 1H, $J=9,77\text{Hz}$, C3-H); 11,93 (s, 1H, NH akr.); 12,35 (s, 1H, N10-H).

λ_{\max} (CHCl₃)/nm 306, 344, 431 (ϵ / dm³ mol⁻¹ cm¹ 9750, 9105, 13553).

Anal. elementarna: Obliczone: C₃₆H₄₀N₄O₈: C, 65.84; H, 6.14; N, 8.53; O, 19.49. Otrzymane: C, 65.92; H, 6.21; N, 8.62; [M+K]⁺ = 695,6.

5.4. Materiały stosowane podczas badań biologicznych

5.4.1. Linie komórkowe

Tabela 18. Linie komórkowe używane w pracy

Linie komórkowe używane w pracy	
Nazwa linii	Charakterystyka linii
CCRF – CEM ¹	Linia ciągła komórek ostrej białaczki limfatycznej
HL-60	Linia ciągła komórek ludzkiej białaczki mieloblastycznej (kolekcja ATCC, USA)
Jurkat, linia pierwotna E6.1	Linia komórkowa ostrej białaczki limfoblastycznej typu T
Molt-4	Linia komórkowa białaczki limfoblastycznej
L-1210 ¹	Linia komórkowa mysiej białaczki
HeLa S3 ¹	Linia komórek nabłonkowych raka szyjki macicy (ludzka)
HT-29 ¹	Linia komórkowa raka okrężnicy (ludzka)
Yac-1	Linia komórkowa mysiej białaczki

¹ linie komórkowe подарowane przez prof. A.Składanowskiego, Katedra Technologii Leków i Biochemii PG

5.4.1.1. Pasażowanie linii komórkowych – hodowle zawieszinowe (CCRF-CEM, HL-60, Jurkat, Molt-4, L-1210, Yac-1)

Wszystkie linie komórkowe hodowałam w cieplarni w 37°C w atmosferze zawierającej 5% CO₂, w plastikowych butelkach przeznaczonych do hodowli zawieszinowych. Komórki hodowałam na podłożu płynnym (RPMI 1640, 10% surowicy, penicylina, streptomycyna). W celu odmłodzenia hodowli, komórki rozpipetowywałam, pożywkę usuwałam wraz z większością komórek znajdujących się w nadsączu. Niewielką ich ilość pozostawiałam w butelce lub przenosiłam do nowej i uzupełniałam nową pożywką do ok. 5 ml.

5.4.1.2. Pasażowanie linii komórkowych – hodowle komórek przylegających (HeLa S3, HT-29)

Linie komórkowe hodowałam w cieplarni w 37°C w atmosferze zawierającej 5% CO₂, w plastikowych butelkach przeznaczonych do hodowli przylegających. Poszczególne linie komórkowe hodowałam w odpowiednich dla nich pożywkach (Tabela 15).

Tabela 19. Skład medium hodowlanego na linii HeLa S3 i HT-29

Linia komórkowa	Medium hodowlane
Linia HeLa-S3 ¹	Mieszanina DMEM : Ham's F12 (1:1), z dodatkiem 2 mM L-glutaminy i 10% FBS
Linia HT-29 ¹	DMEM: Ham's F12 medium (1:1), z dodatkiem 2 mM L-glutaminy i 10% FBS

¹ linie komórkowe podarowane przez prof. A. Składanowskiego, Katedra Technologii Leków i Biochemii PG

5.4.1.3. Mrożenie komórek pochodzących z linii komórkowych

Komórki odwirowywałam z pożywki hodowlanej, nadsącz usuwałam. Komórki zawieszałam w pożywce, dodawałam surowicę (10% w końcowej objętości) i DMSO (10% w końcowej objętości), następnie przenosiłam do krioampulek. Zamrażałam w -80°C, a następnie przenosiłam do banku komórek w ciekłym azocie.

5.4.2. Uzyskiwanie mononuklearnych komórek krwi obwodowej (PBMC)

Komórki PBMC otrzymywałam z tzw. kożuska leukocyтарnego. Materiał ten stanowi odpad w procesie produkcji masy erytrocytarnej. Kożuszki pochodziły z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Gdańsku (RCKiK). Materiał do badań był anonimowy, wszyscy dawcy byli zdrowi wg kryteriów RCKiK. Mononuklearne komórki krwi obwodowej (PBMC) otrzymywałam drogą wirowania krwi żyłnej. Krew rozcieńczałam w buforze PBS w stosunku 1:1, nawarstwiałam na mieszaninę Ficollu i Uropoliny (1:1) i wirowałam przez 15 min. przy szybkości 2500 obr./min. Uzyskany „kożuszek” leukocytów przepłukiwałam dwukrotnie w PBS i umieszczałam w buforze lizującym erytrocyty (Tabela). Po dwukrotnym płukaniu w płynie PBS komórki zawieszałam, w środowisku hodowlanym RPMI 1640 z dodatkiem 10% FBS (1ml 1×10^6 komórek).

5.4.2.1. Rozdzielanie limfocytów krwi obwodowej (PBL) od monocytów

Limfocyty krwi obwodowej (PBL) otrzymywałam usuwając monocyty z zawiesiny PBMC. W tym celu wykorzystywałam zdolność monocytów do adhezji. PBMC inkubowano na plastikowych szalkach Petriego przez 60 min. w cieplarni w temp. $+37^{\circ}\text{C}$, w atmosferze zawierającej 5% CO_2 , przy 90% wilgotności. Po inkubacji zbierałam limfocyty w nadsączu, zostawiając monocyty na płytce.

Tabela 20. Skład buforu lizującego erytrocyty

Bufor lizujący erytrocyty	
NH_4Cl	0,80g
NaHCO_3	0,084g
EDTA	0,037g
H_2O jałowa	100ml
pH-metr	pH=7,4÷7,5

5.5. Metody stosowane w pracy

5.5.1. Test inkorporacji TdR-3H (linie komórkowe CCRF-CEM, HL-60, Yac-1 Jurkat, Molt-4, komórki PBMC)

a) Test na liniach komórkowych

Komórki umieściłam na płytkach 96-dołkowych w ilości 1×10^5 komórek/dołek w 100 μ l pożywki. Dodałam roztwory badanych związków w pożywce i DMSO, otrzymując stężenia docelowe (na płytce) 50-0,0005 μ g/ml. Tak przygotowane płytki inkubowałam 72 godz. w temp. 37°C w atmosferze 5% CO₂. Na ostatnie 18 godz. inkubacji dodawałam sterylny, wodny roztwór TdR-3H w pożywce w ilości 0.5 μ Ci/dołek. Następnie komórki zbierałam na filtr celulozowy przy pomocy harvestera komórek (Skatron), suszyłam i dodawałam płyn scyntylacyjny. Pomiar radioaktywności próbek przeprowadziłam za pomocą czytnika scyntylacyjnego fazy płynnej (LSC-Beckman) w czasie 5 min/próbka.

b) Test na aktywowanych limfocytach

Komórki izolowałam w sposób opisany w punkcie 7.4.2. i umieszczałam a płytce 96-dołkowej w ilości 0,5 $\times 10^5$ /dołek lub 1×10^5 /dołek w 100 μ l pożywki. Następnie inkubowałam dodawałam roztwory badanych związków w pożywce i DMSO (0,25% DMSO) o stężeniach docelowych: 40-0,0004 μ g/ml w ilości 100 μ l na dołek oraz monoklonalnych przeciwciał anti-CD3/anti-CD28 na dołek [CD3/CD28 expander beads (DynaLab, USA) plastikowe kulki opłaszczane przeciwciałami stosunku 1:1 z komórkami]. Tak przygotowane płytki inkubowałam w czasie 96 godz., dodając na ostatnie 18 godz. inkubacji sterylny, wodny roztwór TdR-3H w pożywce w ilości 0.5 μ Ci/dołek.

5.5.2. Test kolorymetryczny MTT

Test kolorymetryczny MTT służył ocenie żywotności komórek CCRF-CEM, HL60, Jurkat T, L-1210, MOLT-4. Płytki 96-dołkowe przygotowywałam w sposób analogiczny jak dla testu inkorporacji TdR-3H. Inkubację prowadziłam przez 48 godz. w cieplarni, w temp. 37°C w atmosferze 5% CO₂. Następnie do każdego dołka dodawałam 20 µl sterylnego roztworu MTT o stężeniu 5 mg/ml. Inkubację kontynuowałam przez 3 godz, dodawałam 100 µl kwaśnego izopropanolu z 0,4M HCl i wytrząsałam płytkę 15 min. do rozpuszczenia kryształków MTT. Odczyt gęstości optycznej wykonywałam przy długości fali 570 nm, przy użyciu czytnika mikropłytek (Perkin Elmer, Victor X4).

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI KOŃCOWE

Celem mojej pracy doktorskiej była synteza oraz badania biologiczne *in vitro* nowych analogów kwasu mykofenolowego z pochodnymi amino-akrydyny/akrydonu jako potencjalnych związków immunosupresyjnych stosowanych po przeszczepach narządowych. Zaprojektowałam i otrzymałam pochodne MPA, które stanowią połączenia wiązaniem amidowym dwóch aktywnych związków o odmiennym mechanizmie działania. Kwas mykofenolowy działa selektywnie na limfocyty T i B, hamując ich proliferację. Natomiast pochodne amino-akrydyny ulegają aktywacji metabolicznej, której produkty interkalują do DNA, powodując apoptozę komórki. Pochodne amino-akrydonu charakteryzują się znacznie słabszą aktywnością, niż ich odpowiedniki oparte o strukturę akrydyny, ale jednocześnie wykazują niższą toksyczność.

Otrzymałam dziesięć koniugatów kwasu mykofenolowego, pięć z pochodnymi amino-akrydyny i pięć z pochodnymi amino-akrydonu, posiadających różną liczbę atomów węgla w łączniku ($n=2\div 6$). Związki te poddałam badaniom pod kątem ich właściwości antyproliferacyjnych oraz cytotoksycznych.

Na podstawie przeprowadzonych prac można sformułować następujące wnioski:

1. Prace syntetyczne

- a) synteza kwasu mykofenolowego zaproponowana przez Pattersona stanowi dogodną metodę laboratoryjnego otrzymywania większych ilości MPA z prostych, handlowo dostępnych odczynników,
- b) zmodyfikowane warunki reakcji przegrupowania Claisena eterów allilowo-aromatycznych pozwalają na bardziej ekonomiczną syntezę. Reakcję ozonolizy alkenu prowadzącą do otrzymania aldehydu można zastąpić utlenianiem za pomocą $\text{KMnO}_4/i\text{-PrOH}$ do diolu i rozszczepieniem tego związku NaIO_4 („one pot reaction”),
- c) duża objętościowo grupa, np. TBS w bezpośrednim sąsiedztwie pierścienia oksiranowego epoksydu może utrudniać lub uniemożliwiać utlenianie NaIO_4 do aldehydu,
- d) zmodyfikowana metoda syntezy 9-(ω -aminoalkilo)amino-1-nitroakrydyn prowadzi do monomeru jako głównego produktu. Reakcja obejmuje syntezę *mono*-Boc chronionych diamin alifatycznych, ich kondensacji z 9-fenoksyakrydyną oraz deprotekcję TFA,
- e) do otrzymywania analogów MPA z pochodnymi amino-akrydyny najkorzystniej jest zastosować $\text{DPPA}/\text{Et}_3\text{N}$, natomiast z pochodnymi amino-akrydonu EDCI/HOBt. Użycie wybranych odczynników kondensujących pozwala na lepsze i dokładniejsze oczyszczenie produktu i uzyskanie możliwie najwyższej wydajności.

2. Badania biologiczne

a) analogi MPA z pochodnymi amino-akrydyny **91a-e**

Przeprowadzone badania screeningowe *in vitro* właściwości antyproliferacyjnych analogów **91a-e** wskazują, że zachowały one aktywność związków natywnych wobec wszystkich testowanych linii komórkowych. Dla każdej z nich przynajmniej jeden związek wykazywał silniejszą aktywność niż MPA, a w przypadku komórek Jurkat i HL-60 wszystkie analogi były bardziej aktywne. Widoczny był również wpływ części akrydynowej na wzrost aktywności antyproliferacyjnej.

Przeprowadzenie badań *in vivo* pozwoli stwierdzić, jaką skutecznością i toksycznością charakteryzują się związki **91a-e**. Podczas testów *in vitro* wykazywały one znacznie silniejszą aktywność wobec komórek docelowych niż limfoidalnych linii komórkowych. Silne działanie antyproliferacyjne wobec komórek PBMC (wartości EC_{50} poniżej 0,0005 $\mu\text{g/ml}$) pozwala sądzić, że możliwa będzie znaczna redukcja dawki podczas testów *in vivo* w porównaniu do MPA i związane z tym obniżenie ogólnej toksyczności. Testy *in vitro* należy traktować jako badania wstępne, szczególnie w przypadku związków ulegających aktywacji metabolicznej, do których zalicza się pochodne 9-amino-1-nitroakrydyny (metabolizowane przez enzymy cytochromu P_{450}). Gdyby analogi **91a-e** okazały się zbyt toksyczne, istnieje możliwość modyfikacji strukturalnych pod kątem obniżenia tego parametru. Za wzrost toksyczności analogów w stosunku do MPA, odpowiedzialna jest akrydynowa część związku, dlatego racjonalnie uzasadnione są modyfikacje tego fragmentu cząsteczki.

Doniesienia literaturowe wskazują, że niektóre pochodne 1-nitroakrydyny charakteryzują się lepszymi właściwościami farmakologicznymi, niż Ledakrin i jego analogi (związki **93a-e**) [143]. Ponadto wykazano, że pochodne 1-nitroakrydyny zawierające grupę metylową w pozycji 4 pierścienia wykazują mniejszą toksyczność. Prawdopodobnie obecność w pierścieniu akrydyny grupy metylowej w pozycji 4 zmniejsza podatność związku na przemiany metaboliczne. Przykładem jest pochodna C-1748 charakteryzująca się obniżoną toksycznością wobec zwierząt doświadczalnych [180].

b) analogi MPA z pochodnymi amino-akrydonu **92a-e**

Badania aktywności antyproliferacyjnej *in vitro* na limfoidalnych liniach komórkowych pokazały, że analogi **92a-e** charakteryzują się obniżeniem (linie Molt-4, Yac-1) aktywności w porównaniu do związków natywnych lub całkowitą jej utratą (linie CCRF-CEM: związki **92b-d**, HL-60).

Komórki PBMC były znacznie bardziej wrażliwe na działanie analogów **92a-e** niż linie komórkowe. Z testów przeprowadzonych na pięciu ‘kożuszkach’ w czterech przypadkach co najmniej jeden analog **92a-e** wykazywał silniejszą aktywność antyproliferacyjną niż MPA, a dla piątego wartości EC_{50} MPA (0,0094 $\mu\text{g/ml}$) i związku **92a** (EC_{50} 0,01 $\mu\text{g/ml}$) były bardzo zbliżone. Zachowanie aktywności analogów MPA, zawierających w swej strukturze pochodne amino-akrydonu, znacznie mniej toksycznych niż pochodne amino-akrydyn, jest obiecującym wynikiem i doprowadziło do wytypowania związku **92a** do badań *in vivo*. Kryterium wyboru stanowiły: najlepsza aktywność wobec komórek PBMC podczas czterech z pięciu przeprowadzonych testów metodą inkorporacji TdR-3H oraz wartość współczynnika selektywności w zakresie najkorzystniejszym dla analogów tej serii.

c) porównanie cytotoksyczności analogów (**91a-e**, **92a-e**) w stosunku do mieszanin ich związków natywnych **93a-e**, **94a-e**, **1**

Testy metodą MTT na linii komórkowej Jurkat wykazały, że istnieje statystycznie istotna różnica w aktywności mieszanin związków (**93a-e**, **1**) w porównaniu do analogów MPA (**91a-e**). Badania wobec komórek PBMC nie ujawniły analogicznej tendencji i nie zanotowałam różnicy pomiędzy żywotnością komórek poddanych działaniu analogów MPA **91a-e**, **92a-e** w porównaniu do mieszanin odpowiednich związków natywnych (**93a-e**, **94a-e**, **1**). Badania te dotyczyły testu wykonanego *in vitro*. W warunkach *in vivo* istnieje szereg dodatkowych czynników farmakokinetycznych i farmakodynamicznych, które mają wpływ na wykazywane przez te związki efekty biologiczne.

d) analogi MPA jako związki przeciwnowotworowe

Analogi MPA **91a-e** działające silnie antyproliferacyjnie mogą również znaleźć zastosowanie jako leki onkologiczne, nawet w przypadku, gdyby ich toksyczność okazała się zbyt wysoka dla stosowanej regularnie terapii immunosupresyjnej. Pochodne 1-nitroakrydyny wykazują działanie cytotoksyczne wobec wielu ludzkich i zwierzęcych linii nowotworowych, np. HeLa, HT-29, LNCaP, UV-4, UV-5, L-1210, CHO AA8 i jej mutant EM-9, K.B. i. in. Kwas mykofenolowy potencjalnie mógłby znaleźć zastosowanie jako chemoterapeutyk ze względu na silne zdolności inhibicyjne wobec IMPDH, obecnego w wysokich stężeniach w komórkach nowotworowych. W swojej pracy wykazałam, że analogi **91a-e** silnie hamowały proliferację różnych komórek białaczkowych. Badania te stanowiły wstępny etap prac nad testowaniem aktywności immunosupresyjnej, ale jednocześnie dostarczają wartościowych danych na temat ich potencjalnego zastosowania w leczeniu nowotworów hematologicznych.

Wobec tych danych, rozpoczęłam badania na wybranych liniach komórkowych innych nowotworów w celu sprawdzenia, czy związki **91a-e**, **92a-e**, zachowują aktywność cytotoksyczną charakterystyczną dla pochodnych amino-akrydyny/akrydonu, które wchodzą w ich skład. Wstępne badania przeprowadzone na liniach HeLa S3 i HT-29 wskazały, że analogi **91a-e** zachowały aktywność charakterystyczną dla pochodnych 1-nitroakrydyny, jednak jest ona nieco słabsza. Analogi **92a-e**, zawierające fragment akrydynowy okazały się pozbawione aktywności cytotoksycznej wobec badanych linii komórkowych.

e) badanie aktywności cytotoksycznej metodą MTT związków związków **91a-c-e**, **92a-c-e** w obecności GMP

Testy wykazały, że aktywność cytotoksyczna analogów MPA **91a-e** i **92a-e** była częściowo odwracana dodatkiem 50µM GMP. Badania te stanowiły wstępny etap określenia mechanizmu działania związków **91a-e**, **92a-e** i dowiodły, że działanie cytotoksyczne analogów zawierające w swej strukturze pochodne amino-akrydyny było odwracane dodatkiem GMP w znacznie mniejszym stopniu, niż ich odpowiedników opartych o strukturę amino-akrydonu. Kontynuacja badań powinna obejmować testy kinetyki przebiegu reakcji enzymatycznej.

3. Badania aktywności immunosupresyjnej

Związki o działaniu immunosupresyjnym powinny charakteryzować się dobrą aktywnością antyproliferacyjną, przy minimalnej toksyczności. Celem terapii jest zahamowanie namnażania komórek PBMC, przy zachowaniu ich ilości niezbędnej do prawidłowego funkcjonowania układu immunologicznego. Kwas mykofenolowy jest obecnie stosowany jako skuteczny lek immunosupresyjny, a otrzymywane liczne pochodne mają na celu podniesienie aktywności antyproliferacyjnej i/lub obniżenie podatności na glukuronidację *in vivo*. Pochodne akrydyn oraz akrydonów nie znalazły dotychczas zastosowania klinicznego jako immunosupresanty. W latach 60-70 ubiegłego wieku pojawiły się informacje literaturowe na temat możliwości zastosowania interkalujących do DNA akrydyn jako związków immunosupresyjnych [181-183]. Jednak z powodu zbyt wysokiej toksyczności nie znalazły one zastosowania w tej dziedzinie medycyny.

W 1999 roku Greenman i in. donieśli o możliwości zastosowania niektórych akrydyn w leczeniu choroby „przeszczep przeciwko gospodarzowi” (GVHD) [184]. W przypadku pochodnych akrydonów powodem, dla którego nie znalazły one zastosowania terapeutycznego, była zbyt słaba aktywność tych związków. W 2007 roku pojawiły się doniesienia, że niektóre akrydony wykazują aktywność inhibicyjną wobec IMPDH [185, 186].

Przeprowadzone przeze mnie testy *in vitro* ukierunkowane były na badanie właściwości immunosupresyjnych. Określenie aktywności antyproliferacyjnej nowych analogów MPA przeprowadziłam w celu oceny zdolności tych związków do hamowania namnażania komórek (limfoidalne linie komórkowe oraz komórki PBMC). Testy aktywności cytotoksycznej pozwoliły na oszacowanie wpływu związków **91a-e**, **92a-e** na ich żywotność. Najlepszą aktywnością immunosupresyjną charakteryzują się związki najsilniej hamujące namnażanie komórek i najmniej cytotoksyczne.

Badania aktywności antyproliferacyjnej oraz cytotoksycznej na limfoidalnych liniach komórkowych służyły ocenie, czy analogi MPA **91a-e**, **92a-e** zachowały aktywność charakterystyczną dla ich związków natywnych w warunkach zestandaryzowanych. Właściwe badania aktywności immunosupresyjnej przeprowadziłam na komórkach PBMC. Testy wykonałam na sześciu niezależnych „kożuszkach” pobranych od zdrowych dawców krwi. Było to konieczne ze względu na to, że odpowiedź na terapię MPA wykazuje znacznie zróżnicowanie wśród pacjentów. Komórki były pobudzane do proliferacji poprzez dodanie monoklonalnych przeciwciał anti-CD3/anti-CD28, co symulowało sytuację gwałtownego namnażania się limfocytów u pacjentów po przeszczepie narządowym. Badania potwierdziły, że otrzymane w ramach mojej pracy doktorskiej analogi MPA zawierające pochodne aminoakrydyny/akrydonu wykazują aktywność antyproliferacyjną wobec ludzkich limfocytów i mogą potencjalnie znaleźć zastosowanie jako pierwsze związki immunosupresyjne oparte o strukturę pochodnych akrydyny/akrydonu.

7. SUMMARY

There has been an enormous development of transplantology and related disciplines in the last decades. In many cases, allotransplantation is considered the most effective treatment for the patients with end-stage organ failure. On the other hand, there is a constantly increasing gap between the need for organs and number of available donors. As a consequence, extended criteria for donors are often accepted which results in increased risk of organ rejection. The pharmacological immunosuppressive therapy is one of the factors of crucial importance in sustaining the function of the transplanted organs.

Mycophenolic acid (MPA) is a natural compound, isolated from few *Penicillium* species, that possesses wide spectrum of biological activity, including antibacterial, antiparasitic, antifungal, antiviral and immunosuppressive properties. MPA exhibits an outstanding anti-proliferation activity, based on inhibition of inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH). The enzyme exists in two isoforms, I- expressed in normal resting cells, while II- in rapidly proliferating cells (activated lymphocytes and tumor cells). MPA is a potent inhibitor of IMPDH II and it is widely used routinely in the clinic in the treatment of rejection in solid organ transplantations (liver, heart, kidney). In the immunosuppressive treatment MPA is administered in a pro-drug forms: as 2-morpholinoethyl ester (MMF; mycophenolate mofetil; CellCept[®], Roche AG) and sodium salt (MPS; Myfortic[®], Novartis Pharma AG). The use of MPA in the clinical routine, especially in the cancer treatment, is limited by its rapid metabolism *in vivo* to an inactive 7-*O*-glucuronide (MPAG). High doses of the drug are required to maintain therapeutic concentration and leads to severe adverse effect, mostly due to gastrointestinal toxicity. Numerous of MPA analogues have been synthesized to overcome this problem. With few exceptions, most of them showed lower activity than MPA.

The objective of this dissertation was to design, synthesize and evaluate biological activity of novel mycophenolic acid analogues, containing amino-acridine/acridone derivatives. The heterocyclic units possess high ability to bind covalently to DNA resulting in the inhibition of cell proliferation.

The chemical part of the work involved synthesis of: mycophenolic acid, amino-acridine/acridone derivatives and MPA analogues. The total synthesis of mycophenolic acid was accomplished according to the method described by Patterson with few modifications. For the synthesis of acridine derivatives and their acridone counterparts Ullmann's reaction was employed.

Subsequent cyclisation and condensation with alkylenediamines dihydrochlorides afforded 9-(ω -aminoalkyl)amino-1-nitroacridines and 1-(ω -aminoalkyl)-4-nitro-9(10*H*)-acridones.

Modification of this method, involving use of *mono*-Boc-protected diamines, was applied to increase product yields. In order to obtain mycophenolic acid analogues few methods were tested: generation *in situ* of acyl chloride, mixed anhydride method, DCC, EDCI/HOBt, DPPA/Et₃N, EEDQ. The highest yields and purity of the products were obtained with DPPA/Et₃N for amino-acridine and EDCI/HOBt for amino-acridone MPA analogues.

New mycophenolic acid conjugates and their native components were subjected to biological tests in order to evaluate immunosuppressive properties of the compounds. To determine antiproliferative and cytotoxic activity, tests on few leukemia cell lines (Jurkat, Molt-4, CCRF-CEM, HL-60, L-1210, Yac-1) and PBMC (target cells) were performed. The methyl-[³H]-thymidine (TdR-3H) incorporation was used in order to evaluate inhibition of rate of DNA synthesis and MTT viability test to estimate cytotoxicity of the compounds.

MPA-acridine analogues retained their antiproliferative activity against all tested cell lines, with EC₅₀ values depending on susceptibility of the specific cells. In case of MPA-acridone conjugates considerable decrease or loss of activity was observed.

PBMC cells were much more susceptible to all new MPA analogues in comparison to tested cell lines. MPA-acridine analogues inhibited cells proliferation stronger than parent MPA, while MPA-acridone derivatives at the same magnitude of order.

Based on obtained tests results two acridine-MPA and one acridone-MPA analogues were selected for *in vivo* tests.

8. DOROBEK NAUKOWY

a) publikacje monograficzne:

1. **Małachowska M.**, Cholewiński G., Dzierzbicka K., Wardowska A., Trzonkowski P. *Kwas mykofenolowy i jego analogi. Synteza i aktywność biologiczna*. Wiad. Chem., **2009**, *63*, 309-332.
2. Cholewinski G., **Małachowska-Ugarte M.**, Dzierzbicka K., *The chemistry of mycophenolic acid - synthesis and modifications towards desired biological activity*. Curr. Med. Chem., **2010**, *17*, 1926-1941.

b) publikacje oryginalne:

3. **Magdalena Małachowska-Ugarte**, Grzegorz Cholewinski, Jaroslaw Chojnacki, Krystyna Dzierzbicka, *1,3-dihydro-4-[(tert-butyl dimethylsilyl)oxy]-6-methoxy-7-methyl-3-oxo-5-(2,3-epoxypropanyl)isobenzofuran*. Acta Crystallographica, section E, **2011**, E67, 3393 (IF=0,413).
4. **Magdalena Małachowska-Ugarte**, Grzegorz Cholewinski, Krystyna Dzierzbicka, Piotr Trzonkowski, *Synthesis and Biological Activity of Novel Mycophenolic Acid Conjugates Containing Nitro-acridine/acridone Derivatives*. Eur. J. Med. Chem. (zaakceptowana do druku, IF=3,193).

c) udział w sympozjach i konferencjach naukowych:

1. **Małachowska M.**, Cholewiński G., Dzierzbicka K., *Synteza analogów kwasu mykofenolowego (MPA) jako potencjalnych związków immunosupresyjnych*. 52 Zjazd PTCh i SIPChem, Łódź, 12-16.09.2009 (s. 89).
2. **Małachowska-Ugarte M.**, Dzierzbicka K., *Novel mycophenolic acid derivatives as potential immunosuppressive agents*. YoungChem2010, International Congress of Young Chemists, Reda, 06-10.10.2010 (s. 75).
3. **Małachowska-Ugarte M.**, Samsel M., Dzierzbicka K., *MDP and nor-MDP derivatives as potential immunosuppressive agents.*, YoungChem2010, International Congress of Young Chemists, Reda, 06-10.10.2010 (s. 76).
4. **Małachowska-Ugarte M.**, Dzierzbicka K., Trzonkowski P., *Synteza koniugatów kwasu mykofenolowego (MPA) z pochodnymi 1-nitroakrydyny/4-nitroakrydonu jako potencjalnych związków immunosupresyjnych*. XXI Zjazd PTFarm, Gdańsk, 12-15.09.2010 (s. 336).

5. **Magdalena Małachowska-Ugarte**, Krystyna Dzierzbicka, Piotr Trzonkowski, *Synteza koniugatów kwasu mykofenolowego (MPA) z pochodnymi 1-nitroakrydyny/4-nitroakrydonu jako potencjalnych związków immunosupresyjnych*. Biomeditech VII, Ogólnopolskie Studenckie Seminarium Naukowo-Technologiczne, Sopot, 9-13.05.2011 (s. 47-48).
 6. **M. Małachowska-Ugarte**, K. Dzierzbicka, P. Trzonkowski, *Synthesis and immunosuppressive activity of novel mycophenolic acid derivatives*. Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Catania (Włochy), 30.06 – 2.07.2011. (s. 184).
 7. **M. Małachowska-Ugarte**, K. Dzierzbicka, P. Trzonkowski, *Antyproliferative activity of novel mycophenolic acid derivatives*, YoungChem2011, International Congress of Young Chemists, Kraków, 12-16.10.2011 (s. 142).
 8. **M. Małachowska-Ugarte**, K. Dzierzbicka, P. Trzonkowski, *Immunosuppressive activity of novel mycophenolic acid derivatives*. IV Congress of Polish Biotechnology and IV EUROBIOTECH 2011 “Four colors of biotechnology”, Central European Congress of Life Sciences, Kraków, 12-15.10.2011 (s. 44).
 9. **M. Małachowska-Ugarte**, K. Dzierzbicka, P. Trzonkowski, *Novel mycophenolic acid derivatives as potential immunosuppressive agents*. 13th Tetrahedron Symposium- Challenges In Bioorganic and Organic Medicinal Chemistry, Amsterdam, 26-29.06.2012 (zgłoszony abstract).
 10. **M. Małachowska-Ugarte**, K. Dzierzbicka, P. Trzonkowski. *Novel mycophenolic acid derivatives as potential antitumor agents*. 13th Tetrahedron Symposium-Challenges In Bioorganic and Organic Medicinal Chemistry, Amsterdam, 26-29.06.2012 (zgłoszony abstract).
- d) udział w Sesjach Sprawozdawczych Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym PG-komunikaty ustne
11. **M. Małachowska**, *Synteza i badania biologiczne analogów kwasu mykofenolowego z pochodnymi amino-akrydyny/akrydonu jako potencjalnych związków immunosupresyjnych stosowanych po przeszczepach narządowych. Synteza kwasu mykofenolowego (MPA)*. Sesja Sprawozdawcza Studium Doktoranckiego Przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej, Materiały, 21-22.09.2009, Gdańsk, str. 62.

12. **M. Małachowska-Ugarte**, *Synteza analogów kwasu mykofenolowego z pochodnymi amino-akrydyny/akrydonu jako potencjalnych związków immunosupresyjnych stosowanych po przeszczepach narządowych*. Sesja Sprawozdawcza Studium Doktoranckiego Przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej, Materiały, 27-28.09.2010, Gdańsk, str. 72.
13. **M. Małachowska-Ugarte**, *Badania biologiczne analogów kwasu mykofenolowego z pochodnymi 1-nitroakrydyny/4-nitroakrydonu jako potencjalnych związków immunosupresyjnych stosowanych po przeszczepach narządowych*. Sesja Sprawozdawcza Studium Doktoranckiego Przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej, Materiały, 22-23.09.2011, Gdańsk, str. 79.

Praca powstała w ramach realizacji grantu promotorskiego N N405 615538.

9. LITERATURA

- [1] http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003593.pdf
- [2] W. Rowiński, M. Durlik, *Zalecenia dotyczące leczenia immunosupresyjnego po przeszczepach narządów unaczynionych*. wyd. Fundacja Zjednoczeni dla Transplantacji Warszawa, **2006**, 9.
- [3] P.J.H. Smak Gregoor, T. van W. Weimar, *Mycophenolate mofetil, Cellcept®, a new immunosuppressive drug with great potential in internal medicine*. Neth. J. Med., **2000**, 57, 233.
- [4] R. Bentley, *Mycophenolic Acid: A One Hundred Year Odyssey from Antibiotic to Immunosuppressant*. Curr. Med. Chem., **2000**, 100, 3801.
- [5] P.W. Clutterbuck, H. Raistick, *Studies in the biochemistry of micro-organisms: The molecular constitution of the metabolic products of Penicillium brevi-compactum Dierckx and related species. II. Mycophenolic acid*. J. Biochem., **1933**, 27, 654.
- [6] T.J. Franklin, *Pharmaceutical compositions*, U.K. Patent Specification, **1970**, GB1203328.
- [7] J.J. Gu, A.K. Tolin, J. Jain, L. Santiago, B.S. Mitchell, *Targeted Disruption of the Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase Type I Gene in Mice*. Mol. Cell Biol., **2003**, 23, 6702.
- [8] M. Pimkin, G.D. Markham, *Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase*. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., **2009**, 76, 1.
- [9] F.R. Collart, E. Huberman, *Cloning and sequence analysis of the human and Chinese hamster inosine-5'-monophosphate dehydrogenase cDNAs*. J. Biol. Chem. **1988**, 263, 15769.
- [10] J. Jain, S.J. Almquist, P.J. Ford, D. Shlyakhter, Y. Wand, E. Nimmesgern U.A. Germann, *Regulation of inosine monophosphate dehydrogenase type I and type II isoforms in human lymphocytes*. Biochem. Pharmacol. **2004**, 67, 767.
- [11] Y. Liu, S.A. Bohn, J.L. Sherley, *Inosine-5'-Monophosphate Dehydrogenase Is a Rate-determining Factor for p53-dependent Growth Regulation*. Mol. Biol. Cell., **1998**, 9, 15.
- [12] J.L. Sherley, *Guanine nucleotide biosynthesis is regulated by the cellular p53 concentration*. J. Biol. Chem., **1991**, 266, 24815.

- [13] R.C. Jackson, G. Weber, H.P. Morris, *IMP dehydrogenase, an enzyme linked with proliferation and malignancy*. *Nature*, **1975**, 256, 331.
- [14] A.J. Ratcliffe, *Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase inhibitors for the treatment of autoimmune diseases*. *Curr. Opin. Drug Discovery Devel.*, **2006**, 9, 595.
- [15] L. Chen, K.W. Pankiewicz, *Recent development of IMP dehydrogenase inhibitors for the treatment of cancer*. *Curr. Opin. Drug Discovery Devel.*, **2007**, 10, 403.
- [16] E. Olah, S. Kokeny, J. Papp, A. Bozsik, M. Keszei, *Modulation of cancer pathways by inhibitors of guanylate metabolism*. *Adv. Enzyme Regul.* **2006**, 46, 176.
- [17] V. Nair, Q. Shu, *Inosine Monophosphate Dehydrogenase (IMPDH) as a Probe in Antiviral Drug Discovery*. *Antiviral Chem. Chemother.* **2007**, 18, 245.
- [18] C.R. Chong, D.Z. Qian, F. Pan, Y. Wei, R. Pili, D.J. Jr. Sullivan, J.O. Liu, *Identification of Type I Inosine Monophosphate Dehydrogenase as an Antiangiogenic Drug Target*. *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 2677.
- [19] L. Chen, D.J. Wilson, Y. Xu, C.C. Aldrich, K. Felczak, Y.Y. Sham, K.W. Pankiewicz, *Triazole-Linked Inhibitors of Inosine Monophosphate Dehydrogenase from Human and Mycobacterium tuberculosis*. *J. Med. Chem.*, **2010**, 53, 4768.
- [20] M.D. Sintchak, E. Nimmesgern, *The structure of inosine 5X-monophosphate dehydrogenase and the design of novel inhibitors*. *Immunopharmacol.*, **2000**, 47, 163.
- [21] D. Risal, Strickler, B.M. Goldstein, *Ternary complex of the human type II inosine monophosphate dehydrogenase with 6Cl-IMP and NAD*. Protein Data Bank, **2004**.
- [22] L. Hedstrom, *IMP Dehydrogenase: Structure, Mechanism, and Inhibition*. *Chem. Rev.* **2009**, 109, 2903.
- [23] L. Hedstrom, L. Gan, *IMP dehydrogenase: structural schizophrenia and an unusual base*. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2006**, 10, 520.
- [24] W. Wang, L. Hedstrom, *Kinetic Mechanism of Human Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase Type II: Random Addition of Substrates and Ordered Release of Products*. *Biochemistry* **1997**, 36, 8479.
- [25] K.W. Pankiewicz, *Inhibitors of inosine monophosphate dehydrogenase as potential chemotherapeutic agents*. *Exp. Opin. Ther. Patents*, **1999**, 9, 55.
- [26] G. Weber, *Enzymes of purine metabolism in cancer*. *Clin. Biochem.*, **1983**, 16, 57.
- [27] R.K. Robins, *Nucleosides and nucleotide inhibitors of inosine monophosphate dehydrogenase as potential antitumor agents*. *Nucleosides Nucleotides*, **1982**, 1, 35.
- [28] E.B. Skibo, R.B. Jr. Meyer, *Inhibition of inosinic acid dehydrogenase by 8-substituted purine nucleotides*. *J. Med. Chem.*, **1981**, 24, 1155.

- [29] C.G. Wong, R.B. Jr Meyer, *Inhibitors of inosinic acid dehydrogenase. 2-Substituted inosinic acids*. J. Med. Chem., **1984**, 27, 429.
- [30] L.C. Antonino, K. Straub, J.C. Wu, *Probing the Active Site of Human IMP Dehydrogenase Using Halogenated Purine Riboside 5'-Monophosphates and Covalent Modification Reagents*. Biochemistry, **1994**, 33, 1760.
- [31] D. Rejman, M. Olesiak, L. Chen, S.E. Patterson, D. Wilson, H.N. Jayaram, L. Hedstrom, K.W. Pankiewicz, *Novel Methylenephosphonate Analogues of Mycophenolic Adenine Dinucleotide. Inhibition of Inosine Monophosphate Dehydrogenase*. J. Med. Chem., **2006**, 49, 5018.
- [32] A.M. Di Bisceglie, J. McHutchison, C. M Rice, *New therapeutic strategies for hepatitis C*. Hepatology, **2002**, 35, 224.
- [33] J. A Shad, J.G. McHutchison, *Current and future therapies of hepatitis C*. Clin. Liver Dis., **2001**, 5, 335.
- [34] Y. Kosgui, Y.Saito, J. Watanabe, M. Baba, S. Shigeta, *Antiviral activities of mizoribine and other inosine monophosphate dehydrogenase inhibitors against several ortho- and paramyxoviruses*. Antiviral Chem. Chemother., **1994**, 5, 366.
- [35] H. Ishikawa, *Mizoribine and mycophenolate mofetil*. Curr. Med. Chem., **1999**, 6, 575.
- [36] N. Minakawa, A. Matsuda, *Mechanism-based design of inosine 5-monophosphate dehydrogenase inhibitors: synthesis and biological activities of 5-ethynyl-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide (EICAR) and its derivatives*. Curr. Med. Chem., **1999**, 6, 615.
- [37] L. Chen, R. Petrelli, M. Olesiak, D.J. Wilson, N.P. Labello, K.W. Pankiewicz, *Bis(sulfonamide) isosters of mycophenolic adenine dinucleotide analogues: Inhibition of inosine monophosphate dehydrogenase*. Bioorg. Med. Chem., **2008**, 16, 7462.
- [38] M. Grifantini, *Tiazofurine ICN Pharmaceuticals*. Curr. Opin. Investig. Drugs, **2000**, 1, 257.
- [39] H.N. Jayaram, G.S. Ahluwalia, R.L. Dion, G. Gebeyehu, V.E. Marquez, J.A. Kelley, R.K. Robins, D.A. Cooney, D.G. Johns, *Conversion of 2-beta-D-ribofuranosyl-selenazole-4-carboxamide to an analogue of NAD with potent IMP dehydrogenase-inhibitory properties*. Biochem. Pharmacol., **1983**, 32, 2633.
- [40] D.G. Streeter, R.K. Robins, *Comparative in vitro studies of Tiazofurin and a selenazole analog*. Biochem. Biophys. Res. Commun., **1983**, 115, 544.

- [41] L. Chen, R. Petrelli, G. Gao, L. Bonnac, J.S. Yu, E.M. Bennett, K.W. Pankiewicz, *Nicotinamide adenine dinucleotide based therapeutics*. *Curr. Med. Chem.*, **2008**, *15*, 650.
- [42] K.W. Pankiewicz, K.B. Lesiak-Watanabe, K.A. Watanabe, S.E. Patterson, H.N. Jayaram, J.A. Yalowitz, M.D. Miller, M. Seidman, A. Majumdar, G. Prehna, B.M. Goldstein, *Novel Mycophenolic Adenine Bis(phosphonate) Analogues As Potential Differentiation Agents against Human Leukemia*. *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 703.
- [43] D. Floryk, E. Huberman, *Mycophenolic acid-induced replication arrest, differentiation markers and cell death of androgen-independent prostate cancer cells DU-145*. *Cancer Lett.*, **2006**, *231*, 20.
- [44] D. Floryk, S.L. Tollaksen, C.S. Giometti, E. Huberman, *Differentiation of human prostate cancer PC-3 cells induced by inhibitors of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase*. *Cancer Res.*, **2004**, *64*, 9049.
- [45] J. Yu, V. Lemas, T. Page, J. D. Connor, A. L. Yu, *Induction of erythroid differentiation in K562 cells by inhibitors of inosine monophosphate dehydrogenase*. *Cancer Res.*, **1989**, *49*, 5555.
- [46] K. Kiguchi, R.F. Collart, C. Henning-Chubb, E. Huberman, *Induction of cell differentiation in melanoma cells by inhibitors of IMP dehydrogenase: altered patterns of IMP dehydrogenase expression and activity*. *Cell Growth Differ.*, **1990**, *1*, 259.
- [47] S.S. Bacus, K. Kiguchi, D. Chin, C.R. King, E. Huberman, *Differentiation of cultured human breast cancer cells (AU-565 and MCF-7) associated with loss of cell surface HER-2/neu antigen*. *Mol. Carcinog.*, **1990**, *3*, 350.
- [48] E. Messina, P. Gazzaniga, V. Micheli, L. Barile, F. Lupi, A.M. Agliano, A. Giacomello, *Low levels of mycophenolic acid induces differentiation of human neuroblastoma cell lines*. *Int. J. Cancer*, **2004**, *112*, 352.
- [49] E. Messina, V. Micheli, A. Giacomello, *Guanine nucleotide depletion induces differentiation and aberrant neurite outgrowth in human dopaminergic neuroblastoma lines: a model for basal ganglia dysfunction in Lesch-Nyhan disease*. *Neurosci. Lett.* **2005**, *375*, 97.
- [50] L. Chen, D. Wilson, H.N. Jayaram, K.W. Pankiewicz, *Dual Inhibitors of Inosine Monophosphate Dehydrogenase and Histone Deacetylases for Cancer Treatment*. *J. Med. Chem.*, **2007**, *50*, 6685.
- [51] M.J. Sweeney, *Mycophenolic acid and its mechanism of action in cancer and psoriasis*. *Jpn. J. Antibiot.*, **1977**, *30*, 85.

- [52] J.A. Digits, L. Hedstrom, *Species-Specific Inhibition of Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase by Mycophenolic Acid*. *Biochemistry*, **1999**, *38*, 15388.
- [53] F. Krötz, M. Keller, S. Derflinger, H. Schmid, T. Gloe, F. Bassermann, J. Duyster, C.D. Cohen, C. Schuhmann, V. Klauss, U. Pohl, H-U Stempfle, H-Y Sohn, *Mycophenolic Acid Is a New Nox2 Inhibitor*. *Hypertension*, **2007**, *49*, 201.
- [54] B. Lassègue, K.K. Griendling, *Mycophenolic Acid Is a New Nox2 Inhibitor*. Editorial Commentaries, *Hypertension*, **2007**, *49*, 25.
- [55] M. Ubukata, H. Takamori, M. Ohashi, S. Mitsuhashi, K. Yamashita, T. Asada, N. Nakajima, N. Matsuura, M. Tsuruga, K. Taki, J. Magae, *Mycophenolic acid as a latent agonist of PPAR γ* . *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, *17*, 4767.
- [56] D.I. Batovska, D.H. Kim, S. Mitsuhashi, Y.S. Cho, H. J. Kwon, M. Ubukata, *Hydroxamic acid derivatives of Mycophenolic Acid Inhibit Histone Deacetylase at the Cellular Level*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2008**, *72*, 2623.
- [57] A.C. Allison, E.M. Eugui, A.W. Thomson, T.F. Starzl, *Immunosuppressive drugs developments in anti-rejection therapy*. New York, Edward Arnold, **1994**, 141.
- [58] E.M. Eugui, A. Mirkovich, A.C. Allison, *Lymphocyte-selective antiproliferative and immunosuppressive effects of mycophenolic acid in mice*. *Scand. J. Immunol.*, **1991**, *33*, 175.
- [59] E.M. Eugui, G. Nakano, N.E. Byars, *Effect of mycophenolic acid on antibody titers and isotypes in mice vaccinated with influenza virus hemagglutinin*. Proceedings of 9th International Congress of Immunology, San Francisco, **1995**, 855.
- [60] A. Premauda, A. Rousseau, G. Johnson, C. Canivet, P. Gandia, F. Muscari, J.M. Peron, L. Rostain, P. Marquet, N. Kamar, *Inhibition of T-cell activation and proliferation by mycophenolic acid in patients awaiting liver transplantation: PK/PD relationships*. *Pharm. Res.*, **2011**, *63*, 432.
- [61] X. Hea, R.L. Smeets, H. J. P. M. Koenen, P. M. Vink, J. Wagenaars, A. M. H. Boots, I. Joosten, *Mycophenolic Acid-Mediated Suppression of Human CD4⁺ T Cells: More Than Mere Guanine Nucleotide Deprivation*. *Am. J. Transplant.*, **2011**, *11*, 439.
- [62] W.J. Burlingham, A.P. Grailer, D.A. Hullet, H.W. Sollinger, *Inhibition of both MLC and in vitro Ig memory response to tetanus toxoid by RS-61443*. *Transplantation*, **1991**, *51*, 545.

- [63] D. Faugaret, R. Lemoine, Ch. Baron, Y. Lebranchu, F. Velge-Roussel, *Mycophenolic acid differentially affects dendritic cell maturation induced by tumor necrosis factor- α and lipopolysaccharide through a different modulation of MAPK signaling*. *Mol. Immunol.*, **2010**, 47, 1848.
- [64] S.von Vietinghoff, H. Ouyang, K. Ley, *Mycophenolic acid suppresses granulopoiesis by inhibition of interleukin-17 production*. *Kidney International*, **2010**, 78, 79.
- [65] S. von Vietinghoff, E.K. Koltsova, J. Mestas, C.J. Diehl, J.L. Witztum, K. Ley, *Mycophenolate Mofetil Decreases Atherosclerotic Lesion Size by Depression of Aortic T-Lymphocyte and Interleukin-17–Mediated Macrophage Accumulation*. *JACC*, **2011**, 21, 2194.
- [66] W.S. Yanga, J.M. Leeb, N.J. Hanb, Y.J. Kima, J.W. Changa, S-K. Park, *Mycophenolic acid attenuates tumor necrosis factor- α -induced endothelin-1 production in human aortic endothelial cells*. *Atherosclerosis*, **2010**, 211, 48.
- [67] B. Chaigne-Delalande, G. Guidicelli, L. Couzi, P. Merville, W. Mahfouf, S. Bouchet, M. Molimard, B. Pinson, J-F. Moreau, P. Legembre, *The Immunosuppressor Mycophenolic Acid Kills Activated Lymphocytes by Inducing a Nonclassical Actin-Dependent Necrotic Signal*. *J. Immunol.*, **2008**, 181, 7630.
- [68] J.J. Gu, L. Santiago, B. S. Mitchell, *Synergy between imatinib and mycophenolic acid in inducing apoptosis in cell lines expressing Bcr-Abl*. *Blood*, **2005**, 105, 3270.
- [69] N. Takebe, X. Cheng, T .E. Fandy, R. K. Srivastava, S. Wu, S. Shankar, K. Bauer, J. Shaughnessy, G. Tricot, *IMP dehydrogenase inhibitor mycophenolate mofetil induces caspase-dependent apoptosis and cell cycle inhibition in multiple myeloma cells*. *Mol. Cancer. Ther.*, **2006**, 5, 457.
- [70] J. Huo, R.H. Luo, A. Metz, G. Li, *Activation of Caspase-2 Mediates the Apoptosis Induced by GTP-Depletion in Insulin-Secreting (HIT-T15) Cells*. *Endocrinology*, **2002**, 143, 1695.
- [71] E. Andrikos, A. Yavuz, V. Bordoni, R. Ratanarat, M. De Cal, M. Bonello, G. Salvatori, N. Levin, G. Yakupoglu, M. Pappas, C. Ronco, *Effect of cyclosporine, mycophenolate mofetil, and their combination with steroids on apoptosis in a human cultured monocytic U937 cell line*. *Transplant. Proc.*, **2005**, 7, 3226.
- [72] K.G. Sharma, R. Radha, A. Pao, N. Amet, L. Baden, S.C. Jordan, M. Toyoda, *Mycophenolic acid and intravenous immunoglobulin exert an additive effect on cell proliferation and apoptosis in the mixed lymphocyte reaction*. *Transpl. Immunol.*, **2010**, 3, 117.

- [73] D.N. Planterose, *Antiviral and Cytotoxic Effects of Mycophenolic Acid*. J. Gen. Virol., **1969**, 4, 629.
- [74] A. Mitsui, S. Suzuki, *Immunosuppressive effect of mycophenolic acid*. J. Antibiot., **1969**, 22, 358.
- [75] E.E. Hodge, *The role of mycophenolate mofetil in clinical renal transplantation*. World J. Urol., **1996**, 14, 249.
- [76] *Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group*. Transplantation, **1996**, 61, 1029.
- [77] K. Takazawa, Y. Hosoda, H. Bashuda, H. Yagit, K. Okumura, Y. Kaneko, *CAM-a novel immunosuppressive agent*. Transplantation, **1995**, 59, 1723.
- [78] M. Mizobuchi, Y. Iwasaki, K. Sako, Y. Kaneko, *Suppression of acute experimental allergic encephalomyelitis in lewis rats with a mycophenolic acid derivative*. The Tohoku J. Exp. Med., **1997**, 182, 217.
- [79] H. Sawada, S. Kaihara, H. Egawa, Y. Inomata, K. Tanaka, K. Yamoaka, *Efficacy of a new immunosuppressant, CAM, on small bowel transplantation in rats*. Transplant. Proc., **1996**, 28, 2512.
- [80] <http://www.gene.com/gene/products/information/cellcept/pdf/pi.pdf>.
- [81] Y. Vial, M. Tod, M. Hornecker, S. Urien, F. Conti, A. Dauphin, Y. Calmus, B. Blanchet, *In vitro influence of fatty acids and bilirubin on binding of mycophenolic acid to human serum albumin*. J. Pharm. Biomed. Anal., **2011**, 54, 607.
- [82] T. van Gelder, *Mycophenolate Blood Level Monitoring: Recent Progress*. Am. J. Transpl., **2009**, 9, 1495.
- [83] N.K. Bruchet, M.H. Ensom, *Limited sampling strategies for mycophenolic acid in solid organ transplantation: a systematic review*. Expert Opinion Drug Metab. Toxicol., **2009**, 5, 1079.
- [84] N. Lampon, M.J. Tutor-Crespo, R. Romero, J.C. Tutor, *Diagnostic efficiency of truncated area under the curve from 0 to 2 h (AUC_{0-2}) of mycophenolic acid in kidney transplant recipients receiving mycophenolate mofetil and concomitant tacrolimus*. Clin. Chem. Lab. Med., **2011**, 49, 1167.
- [85] T-Y. Wu , B.L. Fridley , G.D. Jenkins , A. Batzler, L. Wang , R.M. Weinshilboum, *Mycophenolic acid response biomarkers: A cell line model system-based genome-wide screen*. Int. Immunopharmacol., **2011**, 11, 1057.

- [86] P. Halloran, T. Mathew, S. Tomlanovich, C. Groth, L. Hooftman, C. Barker, *Mycophenolate mofetil in renal allograft recipients: a pooled efficacy analysis of three randomized, double-blind, clinical studies in prevention of rejection. The International Mycophenolate Mofetil Renal Transplant Study Groups*. *Transplantation*, **1997**, *63*, 39.
- [87] P.J.H. Smak Gregoor, C. J. Hesse, T. van Gelder, *Relation of mycophenolic acid trough levels and adverse events in kidney allograft recipients*. *Transplant. Proc.*, **1998**, *30*, 1192.
- [88] M.R. Laftavi, F. Hai, H. Laftavi, L. Feng, M. Said, S. Patel, R. Kohli, M. Alnimri, M. Dayton, O. Pankewycz, *Mycophenolic Acid Dose Reductions Result in Poor Long-Term Renal Allograft Survival: Comparison Between Mycophenolate Sodium and Mycophenolate Mofetil*. *Transplant. Proc.*, **2011**, *43*, 478.
- [89] <http://www.pharma.us.novartis.com/product/pi/pdf/myfortic.pdf>
- [90] M. Salvadori, H. Holzer, G. Civati, H. Sollinger, B. Lien, S. Tomlanovich, E. Bertoni, Y. Seifu, A. C. Marrast, *Long-term administration of enteric-coated mycophenolate sodium (EC-MPS; myfortic) is safe in kidney transplant patients*. *Clin. Nephrol.*, **2006**, *66*, 112.
- [91] N. Calvo, A. I. Sanchez-Fructuoso, J. Conesa, A. Moreno, A. Barrientos, *Renal transplant patients with gastrointestinal intolerance to mycophenolate mofetil: conversion to enteric-coated mycophenolate sodium*. *Transplant. Proc.*, **2006**, *38*, 2396.
- [92] A. Sánchez-Fructuoso, J.C. Ruiz, M. Rengel, A. Andrés, J.M. Morales, I. Beneyto, L.I. Guirado, C. Cantarell, *On Behalf of the Epi-trasplante Study, MIDATA Sub-Study Group*. *Transplant. Proc.*, **2009**, *41*, 2309.
- [93] M. Salvadori, E. Bertoni, K. Budde, H. Holzer, G. Civati, B. Lien, W. Arns, *Superior Efficacy of Enteric-coated Mycophenolate vs Mycophenolate Mofetil in De Novo Transplant Recipients: Pooled Analysis*. *Transplant. Proc.*, **2010**, *42*, 1325.
- [94] R.E.S. Burlingham, A.J. Nicholls, B. R. Kamm, *Clinical pharmacokinetics of mycophenolate mofetil*. *Clin. Pharmacokinet.*, **1998**, *34*, 429.
- [95] M. Shipkova, V. W. Armstrong, E. Wieland, P. D. Niedmann, E. Schutz, G. Brenner-Weiss, M. Voihsel, F. Braun, M. Oellerich, *Identification of glucoside and carboxyl-linked glucuronide conjugates of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil*. *Br. J. Pharmacol.*, **1999**, *126*, 1075.

- [96] A.E. Jones, H.K. Wilson, P. Meath, X. Meng, D. W. Holt, A. Johnston, M. Oellerich, V.W. Armstrong, A.V. Stachulski, *Convenient syntheses of the in vivo carbohydrate metabolites of mycophenolic acid: reactivity of the acyl glucuronide*. Tetrahedron Lett., **2009**, 50, 4973.
- [97] H. Feichtiger, E. Wieland, V. W. Armstrong, M. Shipkova, *The acyl glucuronide metabolite of mycophenolic acid induces tubulin polymerization in vitro*. Clin. Biochem., **2010**, 43, 208.
- [98] A.J. Birch, J. J. Wright, *A total synthesis of mycophenolic acid*. Aust. J. Chem., **1969**, 22, 2635.
- [99] L. Canonica, B. Rindone, E. Santaniello, C. Scolastico, *A total synthesis of mycophenolic acid, some analogues and some biogenetic intermediates*. Tetrahedron, **1972**, 28, 4395.
- [100] R.L. Danheiser, S.K. Gee, J.J. Perez, *Total Synthesis of Mycophenolic Acid*. J. Am. Chem. Soc., **1986**, 108, 806.
- [101] A. Covarrubias- Zúñiga, A. Gonzalez-Lucas, M.M. Dominguez, *Total synthesis of mycophenolic acid*. Tetrahedron, **2003**, 59, 1989.
- [102] A. Covarrubias- Zúñiga, A. Gonzalez-Lucas, M.M. Dominguez, *A total synthesis of mycophenolic acid*. Tetrahedron, **1998**, 39, 2881.
- [103] R.A. De la Cruz, F.X. Talamas, A. Vazquez, J.M. Muchowski, *Total synthesis of mycophenolic acid*. Can. J. Chem., **1997**, 75, 641.
- [104] P.A. Ple, A. Hamon, G. Jones, *A convergent synthesis of Mycophenolic Acid*. Tetrahedron, **1997**, 53, 3395.
- [105] B.M. Trost, J.W. Herndon, *Inversion of the electronic reactivity of allyl acetates using an aluminum-tin reagent*. J. Am. Chem. Soc., **1984**, 106, 6835.
- [106] J.W. Patterson, *The Synthesis of Mycophenolic Acid from 2,4-Dihydroxybenzoic Acid*. J. Org. Chem., **1995**, 60, 4542.
- [107] L. Zou, S. Yao, W. Wang, W. Duan, *An efficient method for demethylation of aryl methyl ethers*. Tetrahedron Lett., **2008**, 49, 4054.
- [108] G.M. Makara, K. Klubek, W.K. Anderson, *An Improved Synthesis of 5,7-Dimethoxy-4-methylphthalide, A Key Intermediate in the Synthesis of Mycophenolic Acid*. Synth. Commun., **1996**, 26, 1935.
- [109] G.M. Makara, W. K. Anderson, *An Efficient Synthesis of 5,7-Dimethoxy-4-methylphthalide, a Key Intermediate in the Synthesis of Mycophenolic Acid*. J. Org. Chem., **1995**, 60, 5717.

- [110] J. Lee, W. K. Anderson, *A Facile Synthesis of an (E)-4-Methyl-4-Hexenoic Acid Substituted Pyridine Analogue of Mycophenolic Acid*. Synth. Commun., **1992**, 22, 369.
- [111] A. Covarrubias-Zuñiga, J. Diaz-Dominguez, J.S. Olguin-Urbe, *Synthesis of 6-allyl-7-hydroxy-5-methoxy-4-methylphtalide, a key intermediate in the synthesis of mycophenolic acid*. Synth. Commun., **2001**, 31, 1373.
- [112] W.L. Muth, C.H. Nash, *Biosynthesis of Mycophenolic Acid: Purification and Characterization of S-Adenosyl-L-Methionine: Demethylmycophenolic Acid O-Methyltransferase*. Antimicrob. Agents Chemother., **1975**, 8, 321.
- [113] A. Sircar, S. Suryanarayan, A.P. Khedkar, P. Subramaniyam, S.P. Tambe, *Manufacture and purification of mycophenolic acid*. U.S. Patent. **2003**, No. PCT/INOO/00017.
- [114] D.L. Doerfler, C.D. Bartman, I.M. Campbell, *Mycophenolic acid production by Penicillium brevicompactum in two media*. Can. J. Microbiol., **1979**, 25, 940.
- [115] N. Vinokurova, N. Ivanushkina, G. Kochkina, M. Arinbasarov, S. Ozerskaya, *Production of mycophenolic acid by fungi of the genus Penicillium link*. Appl. Biochem. Microbiol., **2005**, 41, 83.
- [116] P. Lafont, J. Debeaupuis, M. Gaillardin, J. Payen, *Production of mycophenolic acid by Penicillium roqueforti strains*. Appl. Environ. Microbiol., **1979**, 37, 365.
- [117] F. Ardestani, S. Safa-ali Fatemi, B. Yakhchali, S. M. Hosseyni, G. Najafpour, *Evaluation of mycophenolic acid production by Penicillium brevicompactum MUCL 19011 in batch and continuous submerged cultures*. Biochem. Eng. J., **2010**, 50, 99.
- [118] T.B. Regueira, K.R. Kildegaard, B.G. Hansen, U.H. Mortensen, Ch. Hertweck, J. Nielsen, *Molecular basis for mycophenolic acid biosynthesis in Penicillium brevicompactum*. Appl. Environ. Microbiol., **2011**, 77, 3035.
- [119] D. De Smet, V. Kodeck, P. Dubruel, C. Van Peteghema, E. Schachtb, S. De Saeger, *Design of an imprinted clean-up method for mycophenolic acid in maize*. J. Chromatogr. A, **2011**, 9, 1122.
- [120] E. Usleber, M. Dade, E. Schneider, R. Dietrich, J. Bauer, E. Märtlbauer, *Enzyme Immunoassay for Mycophenolic Acid in Milk and Cheese*. J. Agric. Food Chem., **2008**, 56, 6857.
- [121] A.K. Orvis, S.K. Wesson, T.S. Breza, A.A. Church, Ch.L. Mitchell, S.W. Watkins, *Mycophenolate mofetil in dermatology*. J. Am. Acad. Dermatol., **2009**, 60, 183.
- [122] C.P. Halverstam, M. Lebwohl, *Nonstandard and off-label therapies for psoriasis*. Clin. Dermatol., **2008**, 26, 546.

- [123] V. Baudouin, C. Alberti, A-L. Lapeyraque, A. Bensman, J.-L. André, F. Broux, M. Cailliez, S. Decramer, P. Niaudet, G. Deschènes, E. Jacqz-Aigrain. Ch. Loirat, *Mycophenolate mofetil for steroid-dependent nephrotic syndrome: a phase II Bayesian trial*. *Pediatr. Nephrol.*, **2012**, 27, 389.
- [124] F. Saint-Marcoux, V. Guignonisc, S. Decramer, P. Gandia, B. Ranchin, F. Parant, L. Bessenay, F. Libert, J. Harambat S. Bouchet, F. Broux, P. Compagnon, P. Marquet, *Development of a Bayesian estimator for the therapeutic drug monitoring of mycophenolate mofetil in children with idiopathic nephrotic syndrome*. *Pharmacol. Res.*, **2011**, 63, 423.
- [125] T.T.G. Gargah, M.R. Lakhoua, *Mycophenolate mofetil in treatment of childhood steroid-resistant nephrotic syndrome*. *J. Nephrol.*, **2011**, 24, 203.
- [126] M. Zeher, A. Doria, J. Lan, G. Aroca, D. Jayne, I. Boletis, F. Hiepe, H. Prestele, P. Bernhardt, Z. Amoura, *Efficacy and safety of enteric-coated mycophenolate sodium in combination with two glucocorticoid regimens for the treatment of active lupus nephritis*. *Lupus*, **2011**, 20, 1484.
- [127] N. Takebe, X. Cheng, S. Wu, K. Bauer, O.G. Goloubeva, R.G. Fenton, M. Heyman, A. P. Rapoport, A. Badros, J. Shaughnessy, D. Ross, B. Meisenberg, G. Tricot, *Phase I clinical trial of the inosine monophosphate dehydrogenase inhibitor mycophenolate mofetil (cellcept) in advanced multiple myeloma patients*. *Clin. Cancer Res.*, **2004**, 10, 8301.
- [128] S. Mitsuhashi, J. Takenaka, K. Iwamori, N. Nakajima, M. Ubukata, *Structure–activity relationships for inhibition of inosine monophosphate dehydrogenase and differentiation induction of K562 cells among the mycophenolic acid derivatives*. *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, 18, 8106.
- [129] P.H. Nelson, S.F. Carr, B.H. Devens, E.M. Eugui, F. Franco, C. Gonzalez, R.C. Havley, D.G. Loghhead, D.J. Milan, E. Papp, JW. Patterson, S. Rouhafza, E.B. Sjogren, D.B. Smith, R.A. Stephenson, F.X. Talamas, A.N. Waltos, R.J. Weikert, J.C. Wu, *Structure-Activity Relationships for Inhibition of Inosine Monophosphate Dehydrogenase by Nuclear Variants of Mycophenolic Acid*. *J. Med.Chem.*, **1996**, 39, 4181.
- [130] L. Chen, D.J. Wilson, N.P. Labello, H.M. Jayaram, K.W. Pankiewicz, *Mycophenolic acid analogs with a modified metabolic profile*. *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, 16, 9340.
- [131] G. Lai, W.K. Anderson, *Synthesis of Novel Indole Analogues of Mycophenolic Acid as Potential Antineoplastic Agents*. *Tetrahedron*, **2000**, 56, 2583.

- [132] M.E. El-Araby, R.J. Bernacki, G.M. Makara, P.J.Pera, W.K. Anderson, *Synthesis, molecular modeling, and evaluation of nonphenolic indole analogs of mycophenolic acid*. *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, *12*, 2867.
- [133] J.C. Rohloff, J.O. Gardner, R.W. Towne, *Mycophenolate dianions*. *Tetrahedron Lett.*, **1995**, *36*, 7803.
- [134] P.H. Nelson, E. Eugui, Ch.C. Wang, A.C. Allison, *Synthesis and immunosuppressive activity of some side-chain variants of mycophenolic acid*. *J. Med. Chem.*, **1990**, *33*, 833.
- [135] K. Lesiak, K.A. Watanabe, A. Majumdar, J. Powell, M. Seidman, K. Vanderveen, B.M. Goldstein, K. W. Pankiewicz, *Synthesis of a Methylenebis(phosphonate) Analogue of Mycophenolic Adenine Dinucleotide: A Glucuronidation-Resistant MAD Analogue of NAD*. *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 618.
- [136] W.J. Watkins, J.M. Chen, A. Cho, L. Chong, N. Collins, M. Fardis, W. Huang, M. Hung, T. Kirschberg, W.A. Lee, X. Liu, W. Thomas, J. Xu, A. Zeynalzadegan, J. Zhang, *Phosphonic acid-containing analogues of mycophenolic acid as inhibitors IMPDH*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16*, 3479.
- [137] G. Cholewinski, M. Małachowska-Ugarte, K. Dzierzbicka, *The chemistry of mycophenolic acid - synthesis and modifications towards desired biological activity*. *Curr. Med. Chem.*, **2010**, *17*, 1926.
- [138] M. Małachowska, G. Cholewiński, K. Dzierzbicka, A. Wardowska, P. Trzonkowski, *Kwas mykofenolowy i jego analogi. Synteza i aktywność biologiczna*. *Wiad. Chem.*, **2009**, *63*, 309.
- [139] K. Dzierzbicka, A. Kawzowicz, A. Koc, M. Kukowska-Kaszuba, *Pochodne akrydyny/akrydonu - synteza, aktywność biologiczna i zastosowanie kliniczne*. *Wiad. Chem.*, **2009**, *63*, 107.
- [140] A. Dopierała, P. Wrosz, J. Mazerski, *Akrydyny jako związki aktywne przeciwnowotworowo*. *Postepy Hig. Med. Dosw.*, **2011**, *65*, 263.
- [141] G. Cholewiński, K. Dzierzbicka, A. M. Kołodziejczyk, *Review - Natural and synthetic acridines/acridones as antitumor agents: their biological activities and methods of synthesis*. *Pharmacol. Rep.*, **2011**, *63*, 305.
- [142] R. Kumar, M. Kaur, M. Kumari, *Acridine: a versatile heterocyclic nucleus*. *Acta Pol. Pharm.*, **2012**, *1*, 3.
- [143] M. Gwiazdowski, L. Szmigiero, *Nitracrine and its congeners - an overview*. *Gen. Pharmac.*, **1995**, *3*, 473.

- [144] J.J. Stezowski, P. Kollat, M. Bogucka-Ledóchowska, J.P. Glusker, *Tautomerism and Steric Effects in 1-Nitro-9-(alkylamino)acridines (Ledakrin or Nitracrine Analogues): Probing Structure-Activity Relationships at the Molecular Level*. J. Am. Chem. Soc., **1985**, *107*, 2067.
- [145] J. Konopa, J.W. Pawlak, K. Pawlak, *The mode of action of cytotoxic and antitumor 1-nitroacridines. III. In vivo interstrand cross-linking of DNA of mammalian or bacterial cells by 1-nitroacridines*. Chem. Biol. Interact., **1983**, *43*, 175.
- [146] E. Pastwa, E. Cesielska, K. Studzian, L. Szmigiero, *DNA-protein crosslinks induced in HeLa cells by bis-1-nitroacridines*. Acta Biochim. Pol., **1993**, *40*, 69.
- [147] K. Gorlewska, Z. Mazerska, P. Sowiński, J. Konopa, *Products of Metabolic Activation of the Antitumor Drug Ledakrin (Nitracrine) in Vitro*. Chem. Res. Toxicol., **2001**, *14*, 1.
- [148] A. Kamal, M.N. Khan, K.S. Reddy, S.K. Ahmed, M.S. Kumar, A. Juvekar, S. Sen, S. Zingde, *1,2,4-Benzothiadiazine linked pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine conjugates: Synthesis, DNA-binding affinity and cytotoxicity*. Bioorg. Med. Chem. Lett., **2007**, *17*, 5345.
- [149] R. Romagnoli, P.G. Baraldi, M.D. Carrion, O. Cruz-Lopez, D. Preti, M.A. Tabrizi, F. Fruttarolo, J. Heilmann, J. Bermejo, F. Estevez, *Hybrid molecules containing benzo[4,5]imidazo[1,2-d][1,2,4]thiadiazole and α -bromoacryloyl moieties as potent apoptosis inducers on human myeloid leukaemia cells*. Bioorg. Med. Chem. Lett. **2007**, *17*, 2844.
- [150] R. Romagnoli, P. G Baraldi, M. D Carrion, O. Cruz-Lopez, C.L. Cara, J. Balzarini, E. Hamel, A. Canella, E. Fabbri, R. Gambari, G. Basso, G. Viola, *Hybrid α -bromoacryloylamido chalcones. Design, synthesis and biological evaluation*. Bioorg. Med. Chem. Lett., **2009**, *19*, 2022.
- [151] A. Couture, H. Cornet, P. Grandclaudeon, *An Expedient Synthesis of 2-Aryl- and 2-Alkylquinazolin-4(3H)-ones*. Synthesis, **1991**, *11*, 1009.
- [152] A.M. Martín Castro, *Claisen Rearrangement over the Past Nine Decades*. Chem. Rev., **2004**, *104*, 2939.
- [153] K.C. Majumdar, S. Alam, B. Chattopadhyay, *Catalysis of the Claisen rearrangement*. Tetrahedron, **2008**, *64*, 597.
- [154] M. Imuta, H. Ziffer, *Convenient method for the preparation of reactive oxiranes by direct epoxidation*. J. Org. Chem., **1979**, *44*, 1351.

- [155] M. Malachowska-Ugarte, G. Cholewinski, J. Chojnacki, K. Dzierzbicka, *4-[(tert-Butyldimethylsilyloxy]-6-methoxy-7-methyl-5-(oxiran-2-ylmethyl)-2-benzofuran-3(1H)-one*. Acta Crystallogr. Sect. E: Struct. Rep. Online, **2011**, E67, o3393.
- [156] M.E. Meza-Aviña, M. Ordoñez, M. Fernández-Zertuche, L. Rodríguez-Fragoso, J. Reyes-Esparza, A. A. Martínez de los Ríos-Corsino, *Synthesis of some monocyclic analogues of mycophenolic acid via the Johnson ortho ester Claisen rearrangement*. Bioorg. Med. Chem., **2005**, *13*, 6521.
- [157] P. Belmont, J. Bosson, T. Godet, M. Tiano, *Acridine and acridone derivatives, anticancer properties and synthetic methods: where are we now?* Anti-Cancer Med. Chem., **2007**, *7*, 139.
- [158] J. Sebestik, J. Hlavacek, I. Stibor, *A role of the 9-aminoacridines and their conjugates in a life science*. Curr. Protein Pept. Sci., **2007**, *8*, 471.
- [159] J. Hassan, M. Sévignon, Ch. Gozzi, E. Schulz, M. Lemaire, *Aryl-aryl bond formation. One century after the discovery of the Ullmann reaction*. Chem. Rev., **2002**, *102*, 1359.
- [160] A. Albert, **1966**, *The Acridines*, E.A. Publishers, Ltd.: 2nd ed. London.
- [161] *Jourdan-Ullmann Reaction*. Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents, **2010**, 1569–1575.
- [162] A. Ledóchowski, W. Gruszecki, B. Stefańska, B. Horowska, *Sposób rozdzielania izomerycznych 1- i 3- podstawionych pochodnych 9-chloroakrydyny*. Polski Patent, **1970**, 60794.
- [163] A. Ledóchowski, *Ledacrin - anticancerous medicine 1-nitro-9(3-dimethyloaminopropylamino)-acridine-2HCl-H₂O*. Mater. Med. Pol., **1976**, *8*, 237.
- [164] A. Ledóchowski, W. Gruszecki, B. Stefańska, B. Horowska, *Sposób wytwarzania N⁹-pochodnych 1-nitro-9-aminoakrydyn*. Polski Patent, **1971**, Nr 64147.
- [165] T. Kofoed, H.F. Hansen, H Ørum, T. Koch, *PNA synthesis using a novel Boc/acyl protecting group strategy*. J. Peptide Sci., **2001**, *7*, 402.
- [166] W.S. Saari, J. E. Schwering, P. A. Lyle, S. J. Smith, E. Engelhardt, *Cyclization-activated prodrugs. Basic carbamates of 4-hydroxyanisole*. J. Med. Chem, **1990**, *33*, 97.
- [167] H. Essien, J.Y. Lai, K. J. Hwang, *Synthesis of Diethylenetriaminepentaacetic Acid Conjugated Inulin and Utility for Cellular Uptake of Liposomes*. J. Med. Chem, **1988**, *31*, 898.

- [168] M. Gozdowska, K. Dzierzbicka, B. Wysocka-Skrzela, A.M. Kołodziejczyk, *Synthesis and In Vitro Anticancer Activity of Conjugates of MDP with Amino-Acridine/Acridone Derivatives*. Polish J. Chem., **1997**, 71, 767.
- [169] S. Han, Y. Kim, *Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis*. Tetrahedron, **2004**, 60, 2447.
- [170] T. Schirmeister, *New peptidic cysteine protease inhibitors derived from the electrophilic alpha-amino acid aziridine-2,3-dicarboxylic acid*. J. Med. Chem, **1999**, 42, 560.
- [171] N. Dodic, B. Dumaitre, A. Daugan, P. Pianetti, *Synthesis and activity against multidrug resistance in Chinese hamster ovary cells of new acridone-4-carboxamides*. J. Med. Chem., **1995**, 38, 2418.
- [172] K. Dzierzbicka, A.M. Kołodziejczyk, *Synthesis and antitumor activity of conjugates of muramyldipeptide, normuramyldipeptide, and desmuramylpeptides with acridine/acridone derivatives*. J. Med. Chem, **2001**, 44, 3606.
- [173] A. Pollack, H. Moulis, D.B. Greenstein, N.L. Block, and G.L. Irvin, *Cell kinetic effects of incorporated ³H-thymidine on proliferating human lymphocytes: flow cytometric analysis using the DNA/nuclear protein method*. Cytometry, **1985**, 6, 428.
- [174] U.K. Zätterström, M. Johansson, A.Källén, B. Baldetorp, S.Oredsson, J. Wennerberg, D. Killander. *Comparison of BrdUrd and [³H]TdR incorporation to estimate cell proliferation, cell loss, and potential doubling time in tumor xenografts*. Cytometry, **1992**, 13, 872.
- [175] F. Denizot, R. Lang, *Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability*. J. Immunol. Methods, **1986**, 83, 271.
- [176] T. Mosmann, *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays*. J. Immunol. Methods, **1983**, 65, 55.
- [177] J.Krzysztoń-Russjan, I. Książek, E. Anuszevska, *Porównanie użyteczności testów MTT i EZ4U stosowanych do oceny cytotoxyczności ksenobiotyków*. Farm. Pol., **2009**, 65, 395.
- [178] A.C. Collier, Ch.A. Pritsos, *The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT assay*. Biochem. Pharmacol., **2003**, 66, 281.
- [179] R.J. Gonzalez, J.B. Tarloff, *Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar blue and MTT reductase activity*. Toxicol. in Vitro, **2001**, 15, 257.

- [180] J. Konopa, B. Wysocka-Skrzela, R.K. Tiwari, *9-Alkiloamino-1-nitroacridine derivatives*, U.S. Patent, **2003**, No. 6,589,961 B2.
- [181] F.K.Hess, R.B. Stewart, *Preparation of a New Immunosuppressant, 4,5-Bis(aminomethyl)acridine*. J. Med. Chem., **1975**, 18, 230.
- [182] R.S. Farr, J. S. Samuelson, and P.B. Stewart, *The effectiveness of acriflavine and ineffectiveness of proflavine as immunosuppressant agents*. J. Immunol., **1965**, 95, 682.
- [183] L.D. Zeleznick, J. A. Crim, and G.D. Gray, *Immunosuppression by compounds which complex deoxyribonucleic acid*. Biochem. Pharmacol., **1969**, 18, 1823.
- [184] W.M. Greenman, J.A. Grass, S.Talib, A. Stassinopoulos, D.J. Hei, J.E. Hearst, Method of treating leukocytes, leukocyte compositions and methods of use thereof. W.O. Patent, **1999**, No. 9903976.
- [185] E.J. Iwanowicz, S.H.Watterson, P. Chen, T.G. Murali Dhar, H.H. Gu, Y. Zhao, *Acridone inhibitors of IMPDH enzyme*. U. S. Patent, **2007**, No. 7,312,209 B2.
- [186] S.H. Watterson, P. Chen, Y. Zhao, H.H. Gu, T.G. Murali Dhar, Z. Xiao, S.K. Ballentine, Z. Shen, C.A. Fleener, K.A. Rouleau, M. Obermeier, Z. Yang, K.W. McIntyre, D. J. Shuster, M.Witmer, D. Dambach, S. Chao, A. Mathur, B.-Ch. Chen, J.C. Barrish, J.A. Robl, R. Townsend, E.J. Iwanowicz, *Acridone-Based Inhibitors of Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase: Discovery and SAR Leading to the Identification of N-(2-(6-(4-Ethylpiperazin-1-yl)pyridin-3-yl)propan-2-yl)-2-fluoro-9-oxo-9,10-dihydroacridine-3-carboxamide (BMS-566419)*. J. Med. Chem., **2007**, 50, 3730.
- [187] J. Konopa, B. Wysocka-Skrzela, R.K. Tiwari, *9-Alkiloamino-1-nitroacridine derivatives*, U.S. Patent, **2003**, No. 6,589,961 B2.
- [188] A.I. Vogel, *Practical organic chemistry*, Third Edition, Longman Group Limited, London, **1974**, 192.
- [189] Z.B.Wysocka-Skrzela, A.Ledóchowski, G.Weltrowska, Cz.Radzikowski, *Sposób otrzymywania aminokwasowych pochodnych 1-nitroakrydyny lub ich soli*. Patent Polski nr 119667, **1983**.
- [190] H. B. Nisbet, *The Reactivity of Groups in Substituted Acridones. Part II-Cationoid Activity at Position 4 in Acridones*. J. Chem. Soc., **1933**, 1372.

- [191] D.B. Capps, J.Dunbar, S.R. Kesten, J.Shallis, L.M. Werbel, J.Plowman, D.L.Ward, 2-(*aminoalkyl*)-5-nitropyrazolo[3,4,5-*kl*]acridines, a new class of anticancer agents. *J. Med.Chem.*, **1992**, 35, 4770.

ANEKS 1 - TABELLE STATYSTYCZNE

Nr związku	Związek wyjściowy	ED ₅₀ JURKAT	p ²	ED ₅₀ Molt-4	p	ED ₅₀ CCRF-CEM	p
91a	MPA	0,29±0,054	9,92E-03	0,56±0,046	8,90E-01	0,029±0,0014	6,67E-04
	93a		2,36E-02		3,57E-01		1,48E-03
91b	MPA	0,24±0,048¹	1,44E-04	0,6±0,02	6,00E-02	<0,0005¹	1,20E-05
	93b		6,19E-01		8,30E-04		1
91c	MPA	0,42±0,064	1,63E-02	0,2±0,00491	2,00E-04	<0,0005¹	1,20E-05
	93c		2,60E-05		1,70E-05		1
91d	MPA	0,34±0,016	6,44E-04	0,21±0,063	2,00E-04	<0,0005¹	1,20E-05
	93d		2,10E-05		8,00E-06		1
91e	MPA	0,32±0,078	1,51E-03	1,86±0,43	1,10E-03	0,037±0,0013	8,00E-06
	93e		1,05E-03		1,30E-04		1,00E-06
92a	MPA	0,016±0,0043	2,00E-06	3,17±0,25	2,00E-07	5,3±0,5¹	0
	94a		8,79E-01		2,00E-06		1,00E-07
92b	MPA	0,0063±0,00088	1,29E-04	5,92±0,8	1,70E-05	>50	0
	94a		9,17E-02		3,92E-01		1,00E-07
92c	MPA	0,0022±0,00046¹	1,00E-06	5,29±0,42	2,00E-06	>50	0
	94a		1,83E-02		2,00E-06		1,00E-07
92d	MPA	0,0093±0,00024	2,00E-06	7,12±0,64	2,30E-04	>50	0
	94a		5,00E-06		7,50E-05		1,00E-07
92e	MPA	0,087±0,0053	4,00E-06	1,86±0,551	3,90E-04	6,7±0,59	0
	94a		8,78E-01		6,00E-05		1,00E-07
1	-	0,53±0,082	-	0,41±0,053	-	0,013±0,0029	-

Nr związku	Związek wyjściowy	ED ₅₀ HL-60	p	EC ₅₀ YAC-1	p
91a	MPA	<0,0005 ¹	7,02E-04	3,29±0,25	5,67E-04
	93a		1		9,00E-05
91b	MPA	0,0014±0,00043	6,60E-03	1,24±0,095 ¹	1,74E-02
	93b		6,62E-03		0
91c	MPA	0,0018±0,00033	7,38E-04	2,16±0,34	2,00E-07
	93c		9,54E-01		0
91d	MPA	0,0077±0,00089	9,26E-04	2,35±0,23	2,00E-07
	93d		7,56E-01		0
91e	MPA	0,053±0,011	7,37E-03	3,82±0,12	2,00E-07
	93e		5,96E-02		0
92a	MPA	>50	0	1,71±0,079 ¹	1,20E-05
	94a		0		0
92b	MPA	>50	0	1,9±0,049	1,00E-06
	94a		0		5,30E-05
92c	MPA	>50	0	5,12±0,15	0
	94a		0		0
92d	MPA	>50	0	6,77±0,23	0
	94a		0		0
92e	MPA	>50	0	>50	0
	94a		0		1
1	-	0,14±0,067	-	1,14±0,094	-

Tabela 1. Porównanie aktywności badanych analogów MPA **91a-e**, **92a-e** do ich związków natywnych: **1**, **93a-e**, **94a-e** (wartości EC₅₀ uzyskane metodą inkorporacji TdR-3H); wyniki na liniach komórkowych; ¹ wartości EC₅₀ wyrażone są w µg/ml; ² istotność statystyczna

Nr związku	Związek wyjściowy	EC ₅₀ kożuch A	p ²	EC ₅₀ kożuch B	p	EC ₅₀ kożuch C	p
91a	MPA	<0,0005 ¹	0	0,0086±0,0004	0	<0,0005 ¹	0
	93a		1		0		1
91b	MPA	0,0043±0,00011	0	0,0018±0,00044	0	<0,0005 ¹	0
	93b		0		0		1
91c	MPA	<0,0005 ¹	0	<0,0005 ¹	0	<0,0005 ¹	0
	93c		1		1		1
91d	MPA	<0,0005 ¹	0	<0,0005 ¹	0	<0,0005 ¹	0
	93d		1		1		1
91e	MPA	<0,0005 ¹	0	<0,0005 ¹	0	<0,0005 ¹	0
	93e		1		1		1
92a	MPA	<0,0005 ¹	0	0,0027±0,00089¹	0	0,0079±0,0015	0
	94a		0		0,579		0
92b	MPA	<0,0005 ¹	0	0,054±0,009	0	0,0019±0,00004¹	1,00E-06
	94b		7,58E-04		0		0
92c	MPA	<0,0005 ¹	0	0,061±0,098	0	0,0026±0,00066	9,10E-05
	94c		0		2,00E-06		0
92d	MPA	<0,0005 ¹	0	0,068±0,0038	0	0,0043±0,0014	0
	94d		0		0		0
92e	MPA	<0,0005 ¹	0	0,15±0,039	0	0,0082±0,0007	0
	94e		0		3,41E-02		0
1	-	0,0085±0,00028	-	0,029±0,001	-	0,0054±0,00095	-

Nr związku	Związek wyjściowy	EC ₅₀ kożuch D	p	EC ₅₀ kożuch E	p	EC ₅₀ kożuch F	p
91a	MPA	<0,0005 ¹	0	0,0084±0,00082	6,00E-05		
	93a		0		2,00E-05		
91b	MPA	<0,0005 ¹	0	0,0082±0,00096	0		
	93b		1		1,00E-06		
91c	MPA	<0,0005 ¹	0	0,0013±0,00014¹	0		
	93c		1		0		
91d	MPA	0,0041±0,00081	0	0,0091±0,00076	5,30E-05		
	93d		0		0		
91e	MPA	0,0026±0,00016	0	0,0086±0,00012	1,00E-06		
	93e		0,045		0		
92a	MPA	0,0028±0,00066¹	0			0,01±0,00038¹	2,32E-02
	94a		0				1,54E-04
92b	MPA	0,033±0,0025	3,00E-06			0,035±0,0059	0
	94b		0				0
92c	MPA	0,052±0,0071	0			0,063±0,0035	0
	94c		0				0
92d	MPA	0,077±0,0042	0			0,078±0,0034	0
	94d		0				0
92e	MPA	0,0047±0,36	0			0,013±0,0048	0
	94e		0				0
1	-	0,035±0,0088	-	0,0092±0,033		0,0094±0,00075	-

Tabela 2. Porównanie aktywności badanych analogów MPA **91a-e**, **92a-e** do ich związków natywnych: **1**, **93a-e**, **94a-e** (wartości EC₅₀ uzyskane metodą inkorporacji TdR-3H); wyniki na komórkach PBMC, ¹ wartości EC₅₀ wyrażone są w µg/ml; ² istotność statystyczna

Nr związku	Związek wyjściowy	IC ₅₀ JURKAT	p ²	IC ₅₀ Molt-4	p	IC ₅₀ CCRF-CEM	p
91a	MPA	0,29±0,016	0	2,72±0,13	1,00E-07	1,33±0,095	1,00E-07
	93a		0		5,68E-02		1,00E-07
91b	MPA	0,48±0,035	0	2,01±0,67	1,25E-04	1,14±0,091	1,00E-07
	93b		0		2,42E-02		1,00E-07
91c	MPA	0,25±0,093	9,18E-04	0,076±0,0057	7,00E-06	0,42±0,0095	1,00E-07
	93c		1,93E-04		2,60E-03		1,00E-07
91d	MPA	0,3±0,0085	0	0,065±0,0121	1,10E-04	1,16±0,12	1,00E-07
	93d		0		1,10E-05		1,00E-07
91e	MPA	0,11±0,019 ¹	3,46E-04	0,19±0,03	3,00E-06	0,34±0,081¹	1,00E-07
	93e		3,00E-06		2,00E-06		2,11E-04
92a	MPA	< 0,0005¹	0	0,36±0,063	4,00E-06	>50	1
	94a		1		3,00E-06		1
92b	MPA	< 0,0005¹	0	0,21±0,052	4,60E-05	>50	1
	94a		1		2,50E-05		1
92c	MPA	< 0,0005¹	0	0,017±0,001¹	1,23E-01	>50	1
	94a		1		2,71E-01		1
92d	MPA	< 0,0005¹	0	0,13±0,081	1,00E-06	>50	1
	94a		1		2,00E-07		1
92e	MPA	< 0,0005¹	0	0,091±0,0047	7,26E-03	>50	1
	94a		1		3,88E-02		1
1	-	0,062±0,022	-	0,024±0,0053	-	>50	-

Nr związku	Związek wyjściowy	IC ₅₀ HL-60	p	IC ₅₀ L1210	p	IC ₅₀ PBMC	p
91a	MPA	5,24±0,073	2,00E-06	0,021±0,00073	1,20E-05	0,12±0,017	1,00E-04
	93a		1,00E-07		8,71E-01		1,02E-01
91b	MPA	1,6±0,12¹	9,00E-06	0,034±0,0085	1,30E-05	0,2±0,059	1,30E-03
	93b		2,07E-04		5,43E-01		7,75E-03
91c	MPA	2,02±0,11	4,80E-05	0,012±0,0037¹	1,10E-05	0,066±0,028¹	6,90E-05
	93c		1,60E-05		8,18E-01		1,49E-01
91d	MPA	3,04±0,18	4,92E-01	0,017±0,0076	1,10E-05	0,12±0,071	3,68E-04
	93d		1,00E-07		4,03E-01		1,35E-01
91e	MPA	4,89±0,74	3,00E-06	0,056±0,0098	1,60E-05	0,24±0,15	1,43E-02
	93e		1,00E-07		3,33E-01		9,68E-02
92a	MPA	>50	1,00E-07	0,063±0,0081	1,70E-05	0,52±0,044	4,21E-01
	94a		1,00E-07		3,64E-01		4,27E-04
92b	MPA	>50	1,00E-07	0,45±0,092	3,86E-01	0,54±0,075	8,28E-02
	94a		1,00E-07		3,86E-01		1,67E-02
92c	MPA	>50	1,00E-07	0,52±0,031	1,49E-02	0,38±0,038¹	1,61E-02
	94a		1,97E-04		1,49E-04		1,24E-02
92d	MPA	>50	1,00E-07	0,66±0,018	4,64E-01	0,62±0,11	2,07E-01
	94a		1,00E-07		2,10E-05		2,63E-02
92e	MPA	>50	1,00E-07	0,02±0,00064¹	1,20E-05	0,70±0,33	6,57E-01
	94a		1,00E-07		8,29E-01		5,39E-03
1	-	3,13±0,3	-	0,70±0,15	-	0,41±0,076	-

Tabela 3. Porównanie aktywności badanych analogów MPA **91a-e**, **92a-e** do ich związków natywnych: **1**, **93a-e**, **94a-e** (wartości IC₅₀ uzyskane metodą MTT); wyniki na liniach komórkowych i komórkach PBMC, ¹ wartości IC₅₀ wyrażone są w µg/ml; ² istotność statystyczna

ANEKS 2 – WIDMA 2D NMR