

Politechnika Gdańska
Wydział Chemiczny
Katedra Chemii Organicznej

Rozprawa doktorska

**SYNTEZA I BADANIA BIOLOGICZNE KONIUGATÓW ADENOZYNY Z
POCHODNYMI MURAMYLOPETYDÓW JAKO POTENCJALNYCH ZWIĄZKÓW
IMMUNOSUPRESYJNYCH**

Mgr Monika Samsel

Promotorzy: dr hab. inż. Krystyna Dzierzbicka, prof. nadzw. PG
dr hab. med. Piotr Trzonkowski, prof. nadzw. GUMed

Gdańsk 2013

Składam serdeczne podziękowania

Moim Promotorom:

*Pani Prof. Krystynie Dzierzbickiej
i Panu Prof. Piotrowi Trzonkowskiemu
za opiekę merytoryczną, poświęcony czas oraz pomoc podczas
powstawania niniejszej pracy,*

*Pani Danucie Laskowskiej oraz Pani Mgr Anicie Dobyszyk
za nieocenioną pomoc laboratoryjną,*

*Koleżankom i Kolegom z Katedry Chemii Organicznej,
za wsparcie naukowe i wspaniałą atmosferę pracy,*

*Siostrze - za inspirację,
Mamie – za bezgraniczne wsparcie.*

Spis treści

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW.....	9
STRESZCZENIE	14
1. WSTĘP.....	16
2. CZĘŚĆ LITERATUROWA.....	18
2.1. Adenozyna i jej funkcje.....	18
2.2. Metabolizm adenozyny	19
2.3. Transport adenozyny	20
2.4. Receptory adenozyny	21
2.4.1. Receptory A ₁	22
2.4.2. Receptory A _{2A}	22
2.4.3. Receptory A _{2B}	23
2.4.4. Receptory A ₃	23
2.5. Mechanizm działania immunosupresyjnego adenozyny.....	24
2.5. Pochodne i analogi adenozyny	24
2.5.1. Agoniści receptorów adenozyny	24
2.6. Koniugaty adenozyny.....	33
2.7. Właściwości biologiczne muramylodipeptydu	35
2.7.1. Mechanizm działania MDP	36
2.7.2. Modyfikacje cząsteczki MDP	37
2.8. Właściwości i zastosowanie wybranych pochodnych muramylodipeptydu	38
2.9. Koniugaty muramylodipeptydu.....	42
3. CEL I ZAKRES PRACY	45
4. WYNIKI I WNIOSKI	47
4.1. Prace syntetyczne	47
4.1.1. Synteza pochodnych muramylodipeptydu i nor-muramylodipeptydu	47
4.1.1.1. Synteza podstawionego kwasu muraminowego i nor-muraminowego.....	47

4.1.1.2. Chronione aminokwasy	49
4.1.1.3. Dipeptydy	51
4.1.1.4. Podstawione muramylodipeptydy i nor-muramylodipeptydy	52
4.1.1.5. Pochodne MDP i nor-MDP bez osłon <i>tert</i> -butylowej i benzylidenowej (59a-j)	53
4.1.2. Koniugaty pochodnych MDP i nor-MDP z adenozyną	54
4.1.2.1 <i>N</i> ⁶ -(2-aminoetylo)adenozyna (61).....	57
4.1.2.2. Koniugaty podstawionych MDP i nor-MDP z adenozyną poprzez łącznik	
aminoetylowy	58
4.1.2.3. Kwas Z-6-aminoheksanowy (64)	58
4.1.2.4. Bezwodnik kwasu Z-6-aminoheksanowego (65).....	58
4.1.2.5. <i>N</i> ⁶ -Z-(6-aminoheksanoilo)adenozyna (67).....	59
4.1.2.6. <i>N</i> ⁶ -(6-aminoheksanoilo)adenozyna (68).....	59
4.1.2.7. Koniugaty podstawionych MDP i nor-MDP z adenozyną poprzez łącznik	
6-aminoheksanoilowy (69a-b).....	59
4.2. Badania biologiczne	60
4.2.1. Analiza przeżywalności komórek testem kolorymetrycznym MTT	61
4.2.1.1. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej otrzymanych związków wobec linii	
Jurkat	62
4.2.1.2. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej otrzymanych związków wobec linii	
L1210	62
4.2.1.3. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej otrzymanych związków wobec PBMC	65
4.2.2. Ocena aktywności antyproliferacyjnej związków testem inkorporacji [³ H]TdR.....	68
4.2.2.1. Oznaczanie aktywności antyproliferacyjnej otrzymanych związków wobec linii	
Jurkat	69
4.2.2.2. Oznaczanie aktywności antyproliferacyjnej otrzymanych związków wobec linii	
L1210 oraz ocena ich selektywności	69
4.2.2.3. Oznaczanie aktywności antyproliferacyjnej otrzymanych związków wobec	

PBMC oraz ocena ich selektywności.....	74
5. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	76
5.1. Synteza pochodnych muramylodipeptydu i nor-muramylodipeptydu	77
5.1.1. Synteza podstawionego kwasu muraminowego.....	
(Schemat 2)	77
5.1.1.1. Synteza 2-acetamido-2-deoksy- α -D-glukopiranozydu (42) [195]	77
5.1.1.2. Synteza 2-acetamido-1- <i>O</i> -benzylo-2-deoksy- α -D-glukopiranozydu (43) [196]	77
5.1.1.3. Synteza 2-acetamido-4,6- <i>O</i> -benzylideno-1- <i>O</i> -benzylo-2-deoksy- α -D- glukopiranozydu (44) [196]	77
5.1.1.4. Synteza 2-acetamido-4,6- <i>O</i> -benzylideno-1- <i>O</i> -benzylo-2-deoksy-3- <i>O</i> - karboksyetylo- α -D-glukopiranozydu (45) [197].....	78
5.1.1.5. Synteza 2-acetamido-4,6- <i>O</i> -benzylideno-1- <i>O</i> -benzylo-2-deoksy-3- <i>O</i> - karboksymetylo- α -D-glukopiranozydu (46) [198].....	78
5.1.2. Synteza chronionych aminokwasów	78
5.1.2.1. Synteza Z-D-izoGln(<i>O</i> <i>t</i> -Bu) (51) [223].....	78
5.1.2.2. Synteza <i>N</i> -chronionych aminokwasów (53a-e)	79
5.1.3. Synteza chronionych dipeptydów	80
5.1.3.1. Synteza D-izoGln(<i>O</i> <i>t</i> -Bu) (55)	80
5.1.3.2. Synteza Z-D-Ala-D-izoGln(<i>O</i> <i>t</i> -Bu) (56a)	81
5.1.3.3. Synteza Z-D-2-ABA-D-izoGln(<i>O</i> <i>t</i> -Bu) (56b).....	81
5.1.3.4. Synteza Z-D-Pro-D-izoGln(<i>O</i> <i>t</i> -Bu) (56c).....	82
5.1.3.5. Synteza Z-D-Ser-D-izoGln(<i>O</i> <i>t</i> -Bu) (56d)	82
5.1.3.6. Synteza Z-D-Val-D-izoGln(<i>O</i> <i>t</i> -Bu) (56e)	82
5.1.4. Synteza dipeptydów ze zdjętą osłoną Z (57a-e).....	83
5.1.4.1. Synteza D-Ala-D-izoGln(<i>O</i> <i>t</i> -Bu) (57a).....	83
5.1.4.2. Synteza D-2-ABA-D-izoGln(<i>O</i> <i>t</i> -Bu) (57b).....	83
5.1.4.3. Synteza D-Pro-D-izoGln(<i>O</i> <i>t</i> -Bu) (57c)	83

5.1.4.4. Synteza D-Ser-D-izoGln(<i>Ot</i> -Bu) (57d)	83
5.1.4.5. Synteza D-Val-D-izoGln(<i>Ot</i> -Bu) (58e)	83
5.1.5. Synteza podstawionych muramylodipeptydów	83
5.1.5.1. Synteza MurNAc(α -Bn-4,6- <i>O</i> -Bzi)-D-Ala-D-izoGln(<i>Ot</i> -Bu) (58a)	84
5.1.5.2. Synteza MurNAc(α -Bn-4,6- <i>O</i> -Bzi)-D-2-ABA-D-izoGln(<i>Ot</i> -Bu) (58b)	84
5.1.5.3. Synteza MurNAc(α -Bn-4,6- <i>O</i> -Bzi)-D-Pro-D-izoGln(<i>Ot</i> -Bu) (58c)	84
5.1.5.4. Synteza MurNAc(α -Bn-4,6- <i>O</i> -Bzi)-D-Ser-D-izoGln(<i>Ot</i> -Bu) (58d)	85
5.1.5.5. Synteza MurNAc(α -Bn-4,6- <i>O</i> -Bzi)-D-Val-D-izoGln(<i>Ot</i> -Bu) (58e)	85
5.1.6. Synteza podstawionych nor-muramylodipeptydów	86
5.1.6.1. Synteza nor-MurNAc(α -Bn-4,6- <i>O</i> -Bzi)-D-Ala-D-izoGln(<i>Ot</i> -Bu) (58f)	86
5.1.6.2. Synteza nor-MurNAc(α -Bn-4,6- <i>O</i> -Bzi)-D-2-ABA-D-izoGln(<i>Ot</i> -Bu) (58g)	86
5.1.6.3. Synteza nor-MurNAc(α -Bn-4,6- <i>O</i> -Bzi)-D-Pro-D-izoGln(<i>Ot</i> -Bu) (58h)	87
5.1.6.4. Synteza nor-MurNAc(α -Bn-4,6- <i>O</i> -Bzi)-D-Ser-D-izoGln(<i>Ot</i> -Bu) (58i)	87
5.1.6.5. Synteza nor-MurNAc(α -Bn-4,6- <i>O</i> -Bzi)-D-Val-D-izoGln(<i>Ot</i> -Bu) (58j)	88
5.1.7. Synteza podstawionych muramylodipeptydów i nor-muramylodipeptydów	
bez osłon <i>tert</i> -butylowej i benzylidenowej	88
5.1.7.1. Synteza MurNAc(α -Bn)-D-Ala-D-izoGln (59a) [225]	88
5.1.7.2. Synteza MurNAc(α -Bn)-D-2-ABA-D-izoGln (59b)	89
5.1.7.3. Synteza MurNAc(α -Bn)-D-Pro-D-izoGln (59c)	89
5.1.7.4. Synteza MurNAc(α -Bn)-D-Ser-D-izoGln (59d)	89
5.1.7.5. Synteza MurNAc(α -Bn)-D-Val-D-izoGln (59e)	89
5.1.7.6. Synteza nor-MurNAc(α -Bn)-D-Ala-D-izoGln (59f)	89
5.1.7.7. Synteza nor-MurNAc(α -Bn)-D-2-ABA-D-izoGln (59g)	89
5.1.7.8. Synteza nor-MurNAc(α -Bn)-D-Pro-D-izoGln (59h)	89
5.1.7.9. Synteza nor-MurNAc(α -Bn)-D-Ser-D-izoGln (59i)	90
5.1.7.10. Synteza nor-MurNAc(α -Bn)-D-Val-D-izoGln (59j)	90
5.2. Synteza koniugatów podstawionych MDP i nor-MDP z adenozyzną	90

5.2.1. Synteza N^6 -(2-aminoetylo)adenozyny (61)	90
5.2.2. Synteza koniugatów podstawionych MDP i nor-MDP z adenozyzną	
poprzez łącznik aminoetylowy (62a-k)	90
5.2.2.1. Synteza N^6 -[N^2 -(MurNAc(α -Bn)-D-Ala-D-izoGln)aminoetylo]adenozyny	
(62a)	91
5.2.2.2. Synteza N^6 -[N^2 -(MurNAc(α -Bn)-D-2-ABA-D-izoGln)aminoetylo]adenozyny	
(62b)	91
5.2.2.3. Synteza N^6 -[N^2 -(MurNAc(α -Bn)-D-Pro-D-izoGln)aminoetylo]adenozyny	
(62c)	92
5.2.2.4. Synteza N^6 -[N^2 -(MurNAc(α -Bn)-D-Ser-D-izoGln)aminoetylo]adenozyny	
(62d)	92
5.2.2.5. Synteza N^6 -[N^2 -(MurNAc(α -Bn)-D-Val-D-izoGln)aminoetylo]adenozyny	
(62e)	93
5.2.2.6. Synteza N^6 -[N^2 -(nor-MurNAc(α -Bn)-D-Ala-D-izoGln)aminoetylo]adenozyny	
(62f)	93
5.2.2.7. Synteza N^6 -[N^2 -(nor-MurNAc(α -Bn)-D-2-ABA-D-izoGln)aminoetylo]adenozyny	
(62g)	94
5.2.2.8. Synteza N^6 -[N^2 -(nor-MurNAc(α -Bn)-D-Pro-D-izoGln)aminoetylo]adenozyny	
(62h)	94
5.2.2.9. Synteza N^6 -[N^2 -(nor-MurNAc(α -Bn)-D-Ser-D-izoGln)aminoetylo]adenozyny	
(62i)	95
5.2.2.10. Synteza N^6 -[N^2 -(nor-MurNAc(α -Bn)-D-Val-D-izoGln)aminoetylo]adenozyny	
(62j)	95
5.2.2.11. Synteza N^6 -[N^2 -(MurNAc(α -Bn)-L-Val-D-izoGln)aminoetylo]adenozyny	
(62k)	96
5.2.3. Synteza kwasu <i>N</i> -benzyloksykarbonylo-6-aminoheksanowego (64)	96
5.2.4. Synteza bezwodnika kwasu <i>N</i> -benzyloksykarbonylo-6-aminoheksanowego (65)	97

5.2.5. Synteza N^6 -[N -(benzyloksykarbonylo)-6-aminoheksanoilo]adenozyny (67)	97
5.2.6. Synteza N^6 -(6-aminoheksanoilo)adenozyny (68).....	98
5.2.7. Synteza koniugatów podstawionych MDP i nor-MDP z adenozyką poprzez łącznik 6-aminoheksanoilowy (69a-b).....	99
5.2.7.1. Synteza N^6 -[N^6 -(nor-MurNAc(α -Bn)-D-Ala-D-izoGln)heksanoilo]adenozyny (69a).....	99
5.2.7.1. Synteza N^6 -[N^6 -(MurNAc(α -Bn)-D-Ala-D-izoGln)heksanoilo]adenozyny (69b)	100
5.3. Materiały stosowane podczas badań laboratoryjnych.....	101
5.3.1. Linie komórkowe	101
5.3.2. Podłoża hodowlane	101
5.4. Metody stosowane w pracy	101
5.4.1. Uzyskiwanie mononuklearnych komórek krwi obwodowej (PBMC)	101
5.4.2. Hodowla linii komórkowych Jurkat i L1210	102
5.4.2.1. Pasażowanie linii komórkowych.....	102
5.4.2.2. Rozmrażanie i mrożenie linii komórkowych	102
5.4.3. Test kolorymetryczny MTT	102
5.4.3.1. Linie komórkowe	102
5.4.3.2. PBMC.....	103
5.4.4. Test inkorporacji tymidyny znakowanej trytem.....	103
5.5. Obliczanie wartości IC_{50} oraz EC_{50}	104
5.6. Analiza statystyczna.....	104
6. PODSUMOWANIE I WNIOŚKI KOŃCOWE.....	106
7. SUMMARY	111
8. DOROBEK NAUKOWY	113
9. LITERATURA.....	115
Załącznik 1. Widmo 2D 1H NMR TOCSY i ROESY związku 62a	133
Załącznik 2. Widmo 2D 1H NMR TOCSY i ROESY związku 62j	134

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

[³ H]TdR	-	tymidyna znakowana trytem
5'-NT	-	5'-nukleotyda
6-Aha	-	kwask 6-aminoheksanowy
AC	-	cyklaza adenylanowa
Ac	-	acetyl
ACN	-	acetonitryl
ADA	-	deaminaza adenozyiny (ang. adenosine deaminase)
ADP	-	adenozyno-5'-difosforan
AF	-	migotanie przedsionków (ang. atrial fibrillation)
AK	-	kinaza adenozyiny (ang. adenosine kinase)
AMP	-	adenozyno-5'-monofosforan
AR	-	receptory adenozyiny (ang. adenosine receptors)
ATP	-	adenozyno-5'-trifosforan
AP 1	-	czynnik transkrypcyjny (ang. activating protein-1)
BAT	-	batracylina
Bn	-	benzyl
Boc	-	<i>tert</i> -butoksykarbonyl
Bpoc	-	grupa 2-(4-bifenylilo)izopropoksykarbonylowa
BrdU	-	5-bromo-2-deoksyurydyna
Bzi	-	benzyliden
BTEAC	-	chlorek benzylotrietyloamoniowy (ang. triethylbenzylammonium chloride)
CARD	-	domena aktywacji i rekrutacji kaspaz (ang. caspase activation and recruitment domain)
CD26	-	dipeptydylopeptydaza IV
CDI	-	<i>N,N'</i> -karbonylodwuimidazol
cdN	-	cytozolowa 5'(3')deoksynukleotyda
CHCl ₃	-	chloroform
ClCOO <i>i</i> Bu	-	chloromrówczan izobutyli
cN-I	-	cytozolowa 5'-nukleotyda-I

CNT	- transporter nukleozydowy, przemieszczający nukleozydy w kotransporcie z jonem Na ⁺ (ang. concentrative nucleoside transport)
CPM	- liczba zliczeń na minutę (ang. counts per minute)
CREB	- białko wiążące się z elementem odpowiedzi na cAMP (ang. cAMP response element binding protein)
D-2-ABA	- kwas D- α -aminobutanowy
DCC	- dicykloheksylokarbodiimid
DMF	- <i>N,N</i> -dimetyloformamid
DMSO	- dimetylosulfotlenek
DPPA	- azydek difenylofosforanowy
EDCI	- chlorowodorek 1-(3-dimetyloamino-propylo)-3-etylokarbodiimidu
Ekto-5'-NT	- ekto-5'-nukleotydaza
Ekto-ADA	- ekto-deaminaza adenozyiny
E-NPP	- ektopyrofosfataza/fosfodiesteraza nukleotydomowa
ENT	- równowagowe transportery nukleozydów (ang. equilibrative nucleoside transporters)
ERK	- kinaza regulowana zewnątrzkomórkowo (ang. extracellular signal-regulated kinase)
EtBr	- bromek etydyny
FBS	- płodowa surowica wołowa (ang. fetal bovine serum)
FDA	- amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (ang. Food and Drug Administration)
GMDP	- <i>N</i> -acetylo-glukozamino-muramyldipeptyd
HBTU	- heksafluorofosforan <i>O</i> -{1 <i>H</i> -benzotriazol-1-ilo)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametylouroniowy
HCV	- wirus zapalenia wątroby typu C (ang. Hepatitis C virus)
hENT	- ludzki równowagowy transporter nukleozydów (human equilibrative nucleoside transporter)
HPLC	- wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. high-performance liquid chromatography)
HSAH	- hydrolaza <i>S</i> -adenozylohomocysteiny

IP	- hartowanie przez niedokrwienie (ang. ischemic preconditioning)
Jun	- podjednostki czynnika transkrypcyjnego AP 1
K _M	- stała Michaelisa
MAP	- białko aktywowane przez mitogen (ang. mitogen activated protein)
MAPK	- kinaza MAP
MDP	- muramyldipeptyd (<i>N</i> -acetylmuramylo-L-alanylo-D-izoglutamina)
MDP-C	- muramyldipeptyd C
MeOH	- metanol
MIP-2	- białko zapalne makrofagów 2
MPI	- scyntygrafia perfuzyjna mięśnia sercowego (ang. myocardial perfusion imaging)
MS	- widmo masowe (ang. mass spectrum)
mTOR	- ssaczy cel rapamycyny (ang. mammalian target of rapamycin)
MTP-PE	- muramylotripeptyd fosfatydyloetanolaminy
MTT	- bromek 3-[4,5-dimetylotiazolo-2-ilo]-2,5-difenylo-tetrazoliowy
Mur	- kwasu muraminowy
NADH	- dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (forma zredukowana)
NBTI	- nitrobenzylotioinozyna <i>N</i> -etylo- <i>N'</i> -(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu
NF-κB	- czynnik transkrypcji jądrowej NF kappa B (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
NLRP3	- białka z rodziny receptorów NOD-podobnych 3
NMM	- <i>N</i> -metylomorfolina
NMR	- spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. Nuclear Magnetic Resonance)
NOD	- domena wiązania nukleotydów i oligomeryzacji (ang. nucleotide binding and oligomerization domain)

nor-MDP	-	nor-muramylodipeptyd
nor-Mur	-	kwasy nor-muraminowe
Nps	-	grupa 2-nitrofenylosulfenylowa
obr.	-	obrotów
OD	-	absorbancja (gęstość optyczna)
PBMC	-	mononuklearne komórki krwi obwodowej (ang. peripheral blood mononuclear cells)
PBS	-	bufor fosforanowy
Pd-C	-	pallad na węglu
Ph	-	grupa fenyłowa
PI	-	jodek propydydy
PSVT	-	napadowy częstoskurcz nadkomorowy (ang. paroxysmal supraventricular tachycardia)
PYD	-	domena pyrynowa
RCKiK	-	Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Gdańsku
RIP2	-	białko oddziałujące z receptorem 2 (ang. receptor interacting protein 2)
ROCK	-	kinaza zależna od Rho
ROESY	-	spektroskopia efektu Overhausera w wirującym układzie współrzędnych (ang. rotating-frame nuclear Overhauser effect correlation spectroscopy)
RPMI 1640	-	podłoże hodowlane (ang. Roswell Park Memorial Institute Medium)
SAH	-	S-adenozylhomocysteina
SD	-	odchylenie standardowe (ang. standard deviation)
SI	-	indeks selektywności (ang. selectivity index)
SPE	-	ekstrakcja do fazy stałej (ang. solid phase extraction)
t _{1/2}	-	biologiczny okres półtrwania
<i>t</i> BuBr	-	bromek <i>tert</i> -butylu
TEA	-	trietyloamina
temp. top.	-	temperatura topnienia
TFA	-	kwasy trifluorooctowe

TLC	- chromatografia cienkowarstwowa (ang. thin layer chromatography)
TMSCl	- chlorek trimetylosililu
TNF	- czynnik martwicy nowotworów (ang. tumor necrosis factor)
TOCSY	- korelacyjna spektroskopia zupełna (ang. total correlation spectroscopy)
Wyd.	- wydajność
XTT	- sól sodowa 2,3-bis[2-metoksy-4-nitro-5-sulfofenylo]-2H-tetrazolio-5-karboksyanilidu
Z	- benzyloksykarbonyl
Z-6-Aha	- kwas Z-6-aminoheksanowy
μCi	- mikrocurie

STRESZCZENIE

Muramyłodipeptyd jest najmniejszą częścią peptydoglikanu wykazującą aktywność immunostymulującą. Znanych jest wiele pochodnych i analogów MDP. Niektóre z nich, takie jak Mifamurtyd, zostały zarejestrowane jako lek. Ograniczeniem w stosowaniu MDP jest jego pirogenność oraz wywoływanie innych objawów ubocznych. Zauważono, że zamiana L-alaniny na D-alaninę w części peptydowej prowadzi do otrzymania związku hamującego układ immunologiczny oraz pozbawionego właściwości pirogennych. Pomimo, że wiele leków immunosupresyjnych znajduje się w użyciu klinicznym, ze względu na ich skutki uboczne ciągle poszukuje się nowych związków o takim działaniu.

W ramach niniejszej pracy zsyntetyzowano i przebadano koniugaty pochodnych MDP z adenozyną. Adenozyne stosowana jest jako lek w zaburzeniach rytmu serca, gdzie działa chrono- i dromotropowo ujemnie. Jej działanie jest krótkotrwałe, ze względu na szybki metabolizm. Opisano jednak właściwości immunosupresyjne tego nukleozydu, wywoływane głównie poprzez łączenie się adenozyne z receptorami A_{2A} obecnymi na aktywowanych limfocytach T efektorowych oraz regulatorowych.

Prace syntetyczne obejmowały wieloetapową syntezę pochodnych muramyłodipeptydów, zmodyfikowanych w części peptydowej poprzez podstawienie L-alaniny odpowiednim D-aminokwasem. W pierwszym etapie otrzymano chronione dipeptydy metodą mieszanych bezwodników. Kwas muraminowy oraz nor-muramiowy zsyntetyzowano według procedury podanej w literaturze. Następnie otrzymano po 5 pochodnych MDP(D,D) oraz nor-MDP(D,D). Do wolnej grupy karboksylowej MDP przyłączono adenozyne poprzez łącznik aminoetylowy bądź 6-aminoheksanoilowy, otrzymując odpowiednio 10 i 2 koniugaty.

Testy biologiczne obejmowały ocenę żywotności komórek testem MTT oraz aktywności antyproliferacyjnej metodą inkorporacji tymidyny znakowanej trytem. Badania przeprowadzono na dwóch limfoidalnych liniach komórkowych: Jurkat (pochodzenia ludzkiego) oraz L1210 (pochodzenia mysiego), stanowiącymi dogodny model do wstępnych badań nowych związków immunosupresyjnych. Aktywności koniugatów przebadano również wobec komórek docelowych, PBMC. Linia Jurkat okazała się być oporna na działanie wszystkich związków. Koniugaty **69a-b** połączone łącznikiem 6-aminoheksanoilowym były nieaktywne wobec PBMC oraz linii L1210. Koniugaty **62a-j** hamowały żywotność i proliferację komórek linii L1210, ale charakteryzowały się słabszą aktywnością niż wolne

pochodne MDP(D,D) i nor-MDP(D,D). Wobec PBMC koniugaty **62a-j** wykazały się lepszą selektywnością od muramylodipeptydów.

1. WSTĘP

Transplantologia jest dziedziną medycyny zajmującą się przeszczepianiem komórek, tkanek i narządów. Często jest to jedyny ratunek dla pacjentów ze schyłkową niewydolnością narządów takich jak nerki, serce, wątroba czy płuca. Normalną reakcją organizmu na przeszczep jest aktywacja układu immunologicznego, która może doprowadzić do jego odrzucenia. Aby temu zapobiec, stosuje się leki zmniejszające aktywność układu odpornościowego. Podstawą terapii immunosupresyjnej jest leczenie skojarzone, czyli podawanie kilku leków o różnym mechanizmie działania. Stosowanie immunosupresji jest konieczne od momentu wszczepienia narządu i musi być kontynuowane przez cały okres funkcjonowania przeszczepu. Leki immunosupresyjne pozwoliły ograniczyć występowanie odrzutów ostrych. Niestety, dużym problemem jest odrzucanie przewlekłe, w którym dużą rolę odgrywa toksyczne działanie stosowanych leków immunosupresyjnych [1]. Stąd istotne jest ograniczanie dawek tych leków w stosowaniu przewlekłym. Spośród dostępnych preparatów można wymienić małocząsteczkowe leki immunosupresyjne, wśród których wyróżniamy związki hamujące aktywność kalcyneuryny (cyklosporyna, takrolimus), inhibitory podziałów komórkowych (azatiopryna, mykofenolan mofetilu, mykofenolan sodu) i inhibitory mTOR (sirolimus, everolimus) [2, 3]. Stosuje się także preparaty biologiczne, blokujące receptory komórkowe. Są to przeciwciała poliklonalne – antytymocytarne globuliny (tymoglobulina, ATG), przeciwciała monoklonalne anty-CD3 (OKT3), anty-CD25 skierowane przeciw receptorowi dla Il-2 (basiliximab, daklizumab), anty-CD20 (rituksimab), anty-CD52 (alemtuzumab) [4-8]. Terapia może obejmować podawanie glikokortykosteroidów (prednizon, prednizolon, metyloprednizolon), białek fuzyjnych (etanercept), plazmaferezę. Niestety, długotrwałe przyjmowanie leków immunosupresyjnych wiąże się ze zwiększoną podatnością na infekcje bakteryjne, grzybicze, wirusowe i ryzykiem rozwoju choroby nowotworowej. Inne skutki uboczne to m.in. nadciśnienie, zaburzenia gospodarki lipidowej, mielotoksyczność, nefrotoksyczność, hepatotoksyczność [9].

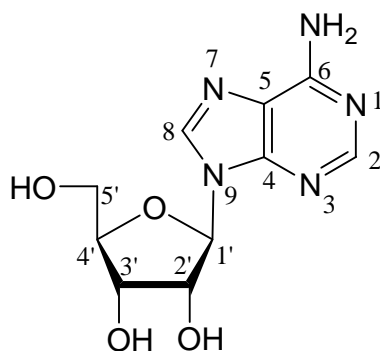
Rozwój transplantologii wiąże się z poszukiwaniem nowych leków, które będą zapobiegały odrzuceniu przeszczepów lub zatrzymywały toczący się proces odrzucenia jednocześnie będąc pozbawione działań ubocznych. Jednym z takich kandydatów jest występująca w organizmie adenozyina. Dowiedziono, że wysoki poziom tego nukleozydu hamuje aktywację i proliferację limfocytów [10]. W tej pracy zaprojektowano oraz przebadano *in vitro* koniugaty adenozyiny z pochodnymi muramylodipeptydu. MDP zmodyfikowano w części peptydowej, zamieniając L-alaninę na D-aminokwas. Badania

przewodzone na MDP(D,D) dowiodły, że hamuje on wzrost komórek limfoidalnej linii komórkowej ABPL2 w obecności makrofagów. Związek ten, w przeciwieństwie do MDP, nie wykazuje praktycznie działania pirogenego zarówno po podaniu dożylnym jak i bezpośrednio do komór mózgu [11]. Adenozyna jest w organizmie szybko metabolizowana do inozyny przez enzym deaminazę adenozyny. Przyłączenie pochodnych MDP(D,D) poprzez utworzenie wiązania z grupą aminową adenozyny powinno zwiększyć czas półtrwania we krwi tego nukleozydu. Takie koniugaty mają szansę efektywnie hamować nadmierną aktywację układu immunologicznego a jednocześnie nie wywoływać poważnych skutków ubocznych.

2. CZĘŚĆ LITERATUROWA

2.1. Adenozyna i jej funkcje

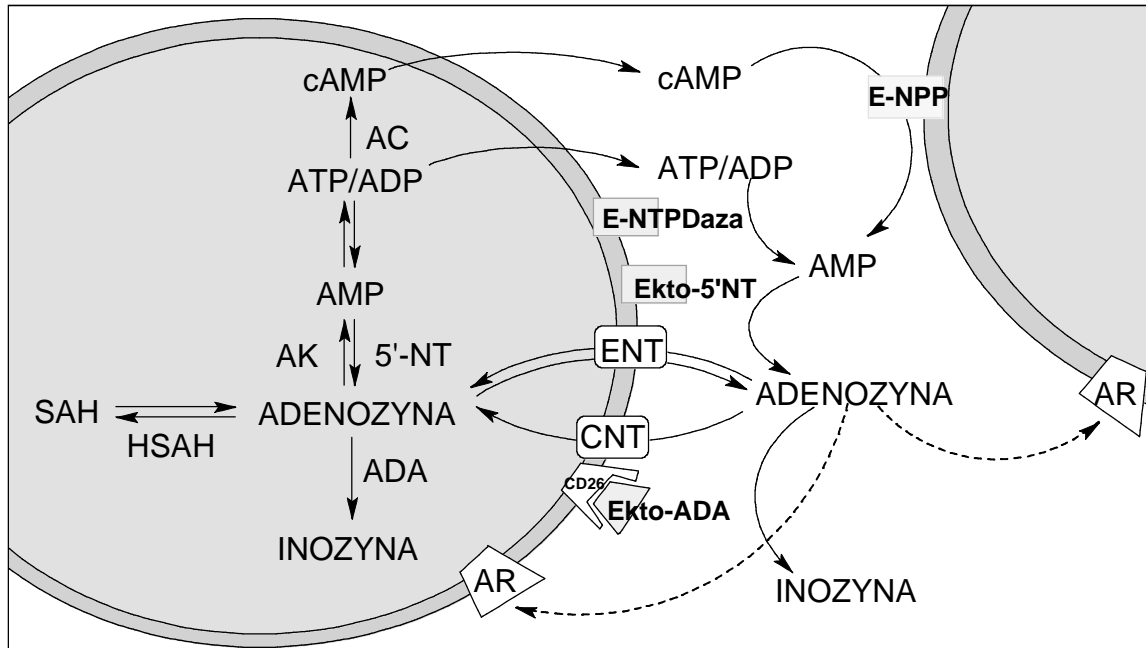
Adenozyna (**1**) (Rys. 1) jest nukleozydem purynowym obecnym we wszystkich komórkach organizmu. Jako prekursor i metabolit nukleotydów adeninowych stanowi budulec kwasów nukleinowych oraz bierze udział w przemianach energetycznych. Ponadto jest ważnym neuromodulatorem wpływającym na metabolizm [12, 13]. W warunkach fizjologicznych poziom adenozyny w przestrzeni pozakomórkowej utrzymywany jest na stałym, niskim poziomie ($<1\mu\text{M}$), a jej stężenie może szybko wzrosnąć w odpowiedzi na stres metaboliczny spowodowany np. hipoksją, niedokrwieniem, infekcją czy stanem zapalnym [14, 15]. Po raz pierwszy działanie zewnątrzkomórkowej adenozyny zostało opisane przez Drury'ego i Szent-Györgyi w 1929 roku [16]. Odkryli oni, że ten nukleozyd posiada właściwości rozszerzające obwodowe naczynia krwionośne oraz zwalniające rytm serca. Obecnie wiadomo, że wywołuje ona działanie ochronne na komórki i tkanki poprzez wiązanie się z czterema podtypami receptorów adenozyny: A_1 , A_{2A} , A_{2B} and A_3 , należącymi do rodziny receptorów sprzężonych z białkami G [14, 17]. Adenozyna stanowi czynnik protekcyjny w stanach niedokrwienia i niedotlenienia serca oraz innych tkanek, a także, w zależności od pobudzonego AR, wpływa m.in. na pracę serca, agregację płytek krwi, napięcie mięśni gładkich czy układ immunologiczny [18, 19].



Rys. 1. Struktura adenozyny **1**

2.2. Metabolizm adenozyzny

Na stężenie adenozyzny w komórce oraz w przestrzeni zewnątrzkomórkowej wpływają procesy jej syntezy, metabolizmu i transport przez błony komórkowe (Schemat 1). W warunkach fizjologicznych stężenie zewnątrzkomórkowej adenozyzny utrzymuje się na poziomie poniżej 1 μM , ale podczas stresu metabolicznego może wzrosnąć nawet do 100 μM [20].



Schemat 1. Przemiany adenozyzny w komórce i przestrzeni zewnątrzkomórkowej [20, 21].

Głównym źródłem tego nukleozydu w komórce, oprócz syntezy *de novo*, jest hydroliza *S*-adenozylohomocysteiny oraz enzymatyczna defosforylacja AMP. W warunkach dobrego utlenowania duża część adenozyzny powstaje z SAH, która jest hydrolizowana przez hydrolazę *S*-adenozylohomocysteiny do adenozyzny i homocysteiny. Z drugiej strony, w trakcie niedokrwienia i hipoksji aktywowana jest przede wszystkim 5'-nukleotydaza hydrolizująca wiązania fosforanowe AMP [21]. W cytozolu występuje 5 izoenzymów 5'-NT: cN-IA, cN-IB, cN-II, cN-III oraz cdN, z których cN-I wykazuje wysokie powinowactwo do AMP ($K_m \sim 1,9 \text{ mM}$) a także do deoksyprymidynowych monofosforanów [22, 23]. Pozakomórkowym źródłem adenozyzny jest enzymatyczna hydroliza nukleotydów purynowych, która może być stymulowana przez hipoksję [24]. ATP oraz ADP są hydrolizowane do AMP przez enzymy z grupy ektodifosfohydrolaz nukleotydów trifosforanowych [25]. Inny enzym, ektopyrofosfataza/fosfodiesteraza nukleotydowa, przekształca cAMP do AMP, które następnie jest degradowane do adenozyzny przez

ekto-5'-nukleotydazę [26]. Powstała adenozyne może być deaminowana przez deaminazę adenozyne (ADA) do inozyne lub fosforylowana przez kinazę adenozyne (AK) z powrotem do AMP. W warunkach fizjologicznych, przy niskich stężeniach zewnątrzkomórkowej adenozyne (25-250 nM), preferowana jest kataboliczna inaktywacja przez AK, ze względu na jej wysokie powinowactwo do substratu ($K_m \sim 0,5 \mu\text{M}$). Wysoki poziom adenozyne hamuje działanie AK [27-29]. Przy dużym stężeniu adenozyne aktywowana jest ADA, dla której substratem jest również 2'-deoksyadenozyne [30, 31]. Istnieją dwie izoformy tego enzymu, ADA1 i ADA2 [32]. ADA1 jest obecna zarówno w cytozolu jak i na zewnątrz komórki. Ekto-ADA1 związana jest z błoną plazmatyczną limfocytów poprzez białko dipeptydylopeptydazę IV (CD26, EC 3.4.14.5) [10]. Oddziałuje ona również z receptorami adenozyne A_1 i A_{2B} , zmieniając ich powinowactwo do substratu [33, 34]. Niedobór ADA1 jest przyczyną recesywnej mutacji objawiającej się ciężkim złożonym upośledzeniem odporności. Niewiele wiadomo o biochemii ADA2, badania sugerują, że jest to enzym aktywny w osoczu [10, 35].

2.3. Transport adenozyne

W warunkach stresu metabolicznego gwałtownie rośnie poziom adenozyne w przestrzeni zewnątrzkomórkowej [36]. Wpływa na to nie tylko katabolizm nukleotydów purynowych, ale także na transport adenozyne z komórki [37]. Wyróżniamy dwa typy systemu transportu nukleotydów przez błonę cytoplazmatyczną. Pierwszy z nich to transport bierny nośnikowy (ENT), zgodny z gradientem stężeń, drugi to transport Na^+ -zależny drogą aktywnego symportu z jonami sodu do wewnątrz komórki, niezależny od gradientu stężenia nukleotydu (CNT) [38].

Wyróżniamy cztery typy białek ENT. Najlepiej scharakteryzowane są ENT1 i ENT2, które są selektywne zarówno wobec nukleotydów purynowych, jak i pirymidynowych [39]. hENT3 ma podobną specyficzność substratową do hENT2, nie transportuje jednak hipoksantyny [40]. hENT4 jest wybiórczy tylko wobec adenozyne, ale transportuje także różne kationy organiczne [41]. Na podstawie wrażliwości na inhibicję przez nitrobenzylotioinozynę (NBTI) wyróżniono dwa typy Na^+ -niezależnego transportu. Transportery ENT1 zostały zaliczone do systemu es (ang. equilibrative-sensitive) i są hamowane już przez nanomolowe stężenia inhibitora. ENT2 należą do systemu ei (ang. equilibrative-insensitive) co oznacza, że NBTI w stężeniu do $1 \mu\text{M}$ nie ma wpływu na transport nukleotydów [42]. hENT1, hENT2 oraz hENT4 są zlokalizowane w błonie

cytoplazmatycznej, a hENT3 znajdują się wewnątrz komórki, częściowo w późnych endosomach i lizosomach, ale także w mitochondriach [40, 41, 43].

Wśród transporterów, które przemieszczają nukleozydy drogą aktywnego symportu z jonami sodu do wnętrza komórki niezależnie od gradientu stężeń nukleozydu (CNT), zostało zidentyfikowanych sześć izoform, ale do tej pory udało się wyizolować tylko trzy z nich: CNT1, CNT2 i CNT3 [44]. Ich podział opiera się na specyficzności substratowej i wrażliwości na inhibitory [45]. CNT1 transportuje nukleozydy pirymidynowe i wykazuje powinowactwo do adenozy, która jest jego inhibitorem. Za transport nukleozydów purynowych oraz urydyny odpowiada CNT2, a CNT3 przemieszcza zarówno nukleozydy purynowe jak i pirymidynowe [46, 47]. Wszystkie trzy izoformy są niewrażliwe na inhibicję przez NBTI [48].

2.4. Receptory adenozy

Adenoza obecna w przestrzeni zewnątrzkomórkowej wiąże się z receptorami adenozy, których zidentyfikowano do tej pory cztery podtypy: A_1 , A_{2A} , A_{2B} oraz A_3 . Należą one do rodziny receptorów sprzężonych z białkami G, które są zlokalizowane w błonach prawie wszystkich komórek organizmu [14, 17, 49]. AR zbudowane są z łańcucha polipeptydowego tworzącego siedem transbłonowych domen o strukturze α helisy. Koniec aminowy znajduje się po zewnętrznej stronie błony, a koniec z wolną grupą karboksylową zlokalizowany jest wewnątrz komórki. Domeny transbłonowe połączone są przez trzy pętle zewnątrzkomórkowe oraz trzy pętle cytoplazmatyczne [50]. AR różnią się między sobą właściwościami biochemicznymi, farmakologicznymi a także dystrybucją tkankową. Ich naturalnym ligandem jest adenoza, która aktywując receptory A_1 oraz A_3 powoduje inhibicję cyklazy adenylowej (EC 4.6.1.1), natomiast stymulacja receptorów A_{2A} i A_{2B} prowadzi do aktywacji tego enzymu [14]. W normalnych warunkach stężenie adenozy jest wystarczające do pobudzenia receptorów A_1 , A_{2A} oraz A_3 . Najmniejsze powinowactwo ma ona do receptora A_{2B} i jego aktywacja zachodzi tylko w warunkach patologicznych [51]. Ligandem dla receptora A_3 jest również inozyna, która wiąże się i aktywuje go w zakresie stężeń 10 - 50 μ M [52]. Inhibitorami AR A_1 , A_{2A} , A_{2B} i A_3 są naturalnie występujące metyloksantyny, takie jak kofeina czy teofilina [53].

2.4.1. Receptory A₁

Adenozyna poprzez receptor A₁, który jest związany z białkiem G_i, hamuje cyklazę adenylową, aktywuje fosfolipazę C oraz kinazy 1 i 2 regulowane zewnątrzkomórkowo (ERK1/2) [54]. Ponadto otwiera kanały potasowe i zamyka wapniowe typu N, P oraz Q [17].

Receptor A₁ jest szeroko rozpowszechniony w całym organizmie. Najwyższy poziom ekspresji mRNA tego receptora wykryto w mózgu, szczególnie w pre- i postsynaptycznych błonach neuronów kory mózgowej, hipokampu, mózdzku, rdzenia kręgowego, a także w oku, nadnerczu czy przedsionkach serca [12, 55]. Receptor ten można też zaobserwować w nerce, wątrobie, jądrach, tkance tłuszczowej oraz jelicie. W najmniejszym stopniu ekspresja zaznaczona jest w tkance płucnej i trzustce [12, 49].

Spośród wszystkich AR, adenozyna ma największe powinowactwo do podtypu A₁. W skutek aktywacji tego receptora w ośrodkowym układzie nerwowym adenozyna pełni rolę ochronną w stosunku do tkanki nerwowej. Zmniejsza ona uwalnianie pobudzających neurotransmiterów i hyperpolaryzację neuronów. Zapobiega także uszkodzeniom neuronów bądź osłabia ten proces [56, 57]. W nerkach hamuje wydzielanie reniny oraz powoduje zwężenie ścian naczyń tętniczek doprowadzających, co prowadzi do spadku filtracji kłębuszkowej [58]. Inne fizjologiczne efekty pobudzenia receptora A₁ to m.in.: działanie przeciwbólowe, hamowanie lipolizy w adipocytach czy zwolnienie rytmu serca [59-61].

2.4.2. Receptory A_{2A}

Receptor A_{2A} jest związany z białkiem G_s, poprzez które pobudza cyklazę adenylową. W prążkowie receptor ten wiąże się z białkiem G_{olf}. Wzrost stężenia cAMP stymuluje kinazę białkową A, która w konsekwencji fosforyluje białko wiążące się z elementem odpowiedzi na cAMP (CREB) regulujące transkrypcję niektórych genów [55, 62, 63].

U człowieka obecność receptora A_{2A} stwierdzono w śledzionie, grasicy, leukocytach, płytkach krwi, prążkowie i opuszkach węchowych [55]. W mniejszym stopniu ekspresja mRNA tego receptora zaznaczona jest w sercu, płucach i naczyniach krwionośnych [55].

Aktywacja receptora A_{2A} w układzie odpornościowym hamuje aktywność zapalną limfocytów. Adenozyna generowana przez limfocyty T regulatorowe powoduje immunosupresję. Ponadto, pobudzenie tego receptora na limfocytach T CD4⁺ zapobiega uszkodzeniu niedokrwiennie-reperfuzyjnemu mięśnia sercowego [64, 65]. Adenozyna poprzez

receptor A_{2A} hamuje agregację płytek krwi, rozszerza naczynia wieńcowe i naczynia krwionośne w nerkach, ponadto stymuluje transport cholesterolu wykazując właściwości przeciwmiażdżycowe [66].

2.4.3. Receptory A_{2B}

Tak jak receptor A_{2A} , receptor A_{2B} sprzężony jest z białkiem G_s , przez które aktywuje cyklazę adenylową. Receptor ten wiąże się również z białkiem G_q , poprzez który pobudzana jest fosfolipaza C. Prowadzi to do zwiększonej aktywacji kinazy proteinowej C i wzrostu wewnątrzkomórkowego poziomu Ca^{2+} [67, 68].

Charakterystyczną cechą receptora A_{2B} jest jego niskie powinowactwo do adenozy, która aktywuje go w stężeniu mikromolarnym. Taka ilość adenozy osiągnana jest w tkankach pod wpływem stresu metabolicznego [67]. Badania na myszach pozwoliły ustalić, że ekspresja tego receptora ma miejsce w prawie wszystkich organach. Najwyższym stężeniem receptora A_{2B} charakteryzują się komórki mięśni gładkich, komórki śródbłonna, makrofagi oraz błony komórek jelita [67]. Obecność tych receptorów stwierdzono również w komórkach tucznych, limfocytach, komórkach dendrytycznych i neutrofilach [69-72].

Adenozy, poprzez receptor A_{2B} pełni istotną rolę w procesie zapalnym, powodując aktywację i degranulację mastocytów, uwolnienie cytokin przez mięśnie gładkie oskrzeli, hamuje funkcje makrofagów i monocytów. Ponadto reguluje przepływ krwi w sercu, wpływa na rozszerzenie naczyń krwionośnych i neoangiogenezę [51, 73, 74].

2.4.4. Receptory A_3

Aktywacja receptora A_3 sprzężonego z białkiem G_i powoduje hamowanie cykazy adenylowej. Poprzez białko G_q stymuluje fosfolipazę C, co wpływa na wzrost poziomu trifosforanu inozytolu i wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} [75, 76]. W sercu stymulacja receptora A_3 pobudza kanały potasowe zależne od ATP, aktywuje również białko RhoA, które w konsekwencji pobudza fosfolipazę D chroniąc w ten sposób kardiomiocyty przed niedokrwieniem [77].

Najwyższą ekspresję receptora A_3 stwierdzono w płucach, wątrobie i komórkach układu odpornościowego. Występuje on także w nerkach, mózgu, sercu, aorcie. Badania wykazały obecność receptora A_3 w ludzkich nowotworowych liniach komórkowych (linia A375, Jurkat T) [78, 79].

Receptor A_3 pełni ważną rolę w ochronie komórek serca przed skutkami niedokrwienia i niedotlenienia, wpływa na uwalnianie czynnika tkankowego [80]. Agoniści receptora A_3 powodują podwyższenie ciśnienia śródgałkowego [81]. Pobudzenie receptora A_3 może wywoływać przeciwstawne efekty. Pośredniczy on w wywoływaniu zarówno efektów przeciw- i prozapalnych. Ochrona mózgu przed skutkami niedokrwienia zależy od podanej dawki agonisty AR A_3 . Wykazano, że stężenia powyżej 10 μM są cytotoksyczne, a mniejsze działają ochronnie na komórki ośrodkowego układu nerwowego. W przypadku komórek rakowych może on promować efekty cytotoksyczne, ale podanie agonisty w małych dawkach (100 nM) zwiększa proliferację tych komórek [82].

2.5. Mechanizm działania immunosupresyjnego adenozyiny

Poziom zewnątrzkomórkowej adenozyiny w normalnych warunkach utrzymuje się na poziomie 1 μM . Jednak w warunkach hipoksji, gdy jej stężenie wzrośnie do 3 μM lub więcej, wywiera ona działanie immunosupresyjne [83]. Adenozyina powstaje m.in. dzięki działaniu ektoenzymów CD39 i CD73, których ekspresję wykazują limfocyty T regulatorowe (Treg). Poprzez działanie na receptor A_{2A} na aktywowanych limfocytach T efektorowych (Teff) oraz Treg powoduje ona akumulację cytoplazmatycznego cAMP. W komórkach Treg znajduje się duża ilość cAMP, który mogą także bezpośrednio dostarczać do Teff poprzez połączenia gap junction. Powoduje to hamowanie proliferacji komórek efektorowych, ich ekspansji czy wydzielania prozapalnych cytokin, w tym IL-2 [84-86]. Ponadto wykazano, że adenozyina hamuje wydzielanie IL-12 poprzez różne rodzaje AR [83].

2.5. Pochodne i analogi adenozyiny

2.5.1. Agoniści receptorów adenozyiny

Adenozyina podawana w postaci szybkiego wstrzyknięcia dożylnego (Adenocard®, Astellas Pharma US, Inc.), ze względu na aktywację receptora A_1 , znalazła zastosowanie jako lek przeciwaritmiczny w napadowym częstoskurczu nadkomorowym (PSVT). W postaci preparatu Adenoscan® (Astellas Pharma US, Inc.) używana jest w diagnostyce obrazowej perfuzji mięśnia sercowego, gdzie wykorzystuje się jej działanie rozszerzające naczynia krwionośne poprzez receptor A_{2A} . Niestety, z powodu krótkiego czasu półtrwania adenozyiny we krwi istnieją ograniczenia w szerszym zastosowaniu tego nukleozydu [87]. Modyfikacja struktury adenozyiny pozwala poprawić właściwości farmakokinetyczne oraz ukierunkować

działanie na konkretny podtyp AR. Część otrzymanych pochodnych jest w trakcie badań klinicznych, a niektóre z nich zostały zarejestrowane jako leki.

2.5.1.1. Analogi adenozyne działające poprzez receptory A₁

Związki o działaniu przeciwartrytmicznym

Modyfikacja adenozyne grupami alkilowymi, cykloalkilowymi oraz aryloalkilowymi zwiększa jej selektywność w stosunku do receptora A₁ i uniemożliwia działanie deaminazy adenozyne na taki związek [88]. W związku z tym alternatywę dla Adenocardu w leczeniu arytmii stanowią N⁶-podstawione lipofilowe pochodne adenozyne, takie jak tecadenoson i selodenoson, o znacznie wydłużonym t_{1/2}.

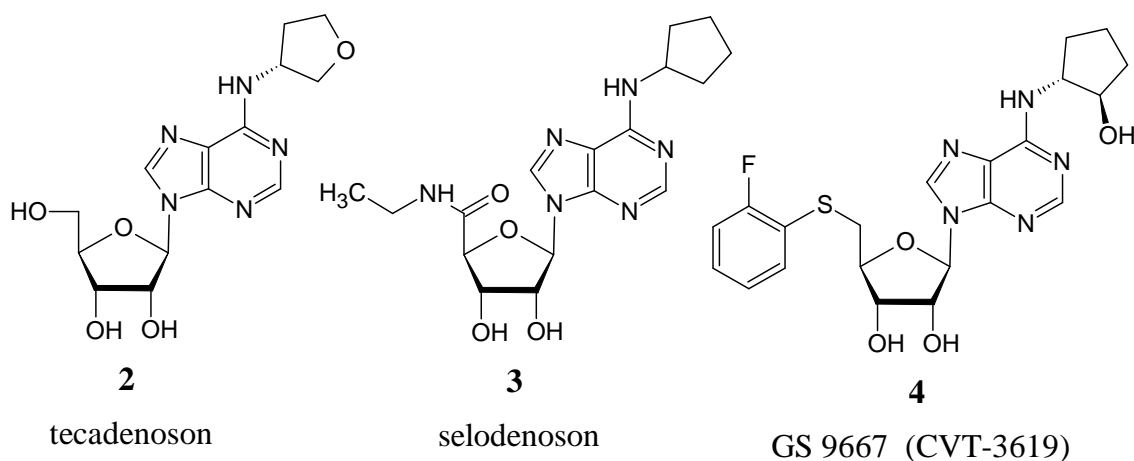
Tecadenoson (CVT-510, **2**) (Rys. 2) jest pochodną adenozyne z podstawnikiem tetrahydrofuranylowym w pozycji N⁶, o t_{1/2} wynoszącym około 30 min. Wykazano, że jest to związek selektywny dla receptorów A₁ i nie obniżający w znaczącym stopniu ciśnienia krwi [18]. Tecadenoson znajduje się obecnie w II i III fazie badań klinicznych jako lek stosowany odpowiednio w migotaniu przedsionków (AF) i PSVT [89]. Dane z badań wskazują, że związek ten przywraca normalny rytm serca bez wywoływania poważniejszych objawów ubocznych [90].

Zmodyfikowanie struktury adenozyne poprzez zamianę grupy metylohydroksylowej na N-etylo-uronamid w cząsteczce rybozy oraz przyłączenie podstawnika cyklopentylowego w pozycji N⁶ doprowadziło do otrzymania kolejnego agonisty receptora A₁, Selodenosonu (**3**) (Rys. 2). Związek ten charakteryzuje się znacznie wydłużonym biologicznym czasem półtrwania (ok. 150 min). Został on zaprojektowany tak, aby kontrolować rytm serca bez obniżenia ciśnienia krwi i osłabienia kurczliwości mięśnia sercowego [91]. Formulacja dożylna przeznaczona do użytku w leczeniu szpitalnym AF znajduje się obecnie w II fazie badań klinicznych. Wyniki badań są obiecujące – wszystkie sześć podawanych dawek leku prowadzi do zwolnienia rytmu komorowego w porównaniu z placebo [91, 92]. Ponadto, doustna postać leku przeszła pomyślnie I fazę badań klinicznych, a formulacja o kontrolowanym uwalnianiu, również do podania doustnego, została opatentowana [93, 94]. Taka możliwość podawania Selodenosonu zwiększa jego użyteczność, stwarzając możliwość wygodnego zażywania w warunkach poza szpitalnych.

Związki stosowane w leczeniu cukrzycy typu II

Agoniści receptora A_1 są obiecującymi związkami w leczeniu cukrzycy typu II w związku z ich działaniem hamującym lipolizę [95]. Aby osiągnąć oczekiwane działanie terapeutyczne agonistów receptora A_1 i zminimalizować niepożądane efekty sercowo-naczyniowe należy skupić się na związkach, które będą częściowymi agonistami tego receptora. Takie podejście pozwoli osiągnąć selektywność tkankową, tak aby większy efekt był widoczny w tkance tłuszczowej, w której receptory A_1 wykazują większą gęstość na błonie komórkowej w porównaniu z tkanką sercową [96].

GS 9667 (CVT-3619, **4**) (Rys. 2) jest pochodną adenozyiny z podstawnikiem 2-hydroksycyklopentylowym w pozycji N^6 oraz 2-fluorofenylotiometylowym w cząsteczce rybozy. Związek ten jest selektywnym, częściowym agonistą receptora A_1 o działaniu obniżającym poziom wolnych kwasów tłuszczowych we krwi. Badania potwierdziły jego skuteczność oraz dobrą tolerancję u pacjentów [97]. Dane z I fazy badań klinicznych nie wykazały znaczących zmian w rytmie serca i ciśnienia krwi w trakcie doustnego podawania GS-9667 [98]. Ponadto znacznie zmniejsza stężenie insuliny hamujące lipolizę w adipocytach [99]. Związek ten ma szansę stać się nowym środkiem stosowanym w terapii cukrzycy typu drugiego.



Rys. 2. Agoniści receptora A_1

2.5.1.2. Analogi adenozyiny działające poprzez receptory A_{2A}

Agoniści receptora A_{2A} są badani ze względu na ich właściwości przeciwzapalne, immunosupresyjne, hipotensyjne oraz chroniące tkanki przed uszkodzeniem w następstwie niedokrwienia i reperfuzji tkanek [19, 100]

Związki o działaniu immunomodulującym

Receptory A_{2A} są istotnymi modulatorami odpowiedzi immunologicznej. Ich aktywacja ma wpływ na funkcje neutrofilów – hamowana jest degranulacja i synteza ponadtlenków. Ponadto, obniża się produkcja czynnika martwicy nowotworu typu alfa przez monocyty i makrofagi oraz hamowane jest przyleganie neutrofilów do komórek śródbłonka naczyń [101, 102].

Agoniści receptora A_{2A} zostali przebadani jako potencjalne związki stosowane w leczeniu chorób o podłożu immunologicznym. Aby zapobiec niepożądanym efektom ubocznym ze strony układu sercowo-naczyniowego zaproponowano postaci leku do stosowania miejscowego, takie jak suchy proszek do inhalacji czy żel. Zarówno związek UK-432097 (**5**) jak i Sonedenoson (MRE-0094, **6**) (Rys. 3) znalazły się w II fazie badań klinicznych: UK-432097 jako lek stosowany w leczeniu przewlekłej obturacyjnej choroby płuc, a Sonedenoson jako środek indukujący gojenie wrzodów w zespole stopy cukrzycowej. Forma do inhalacji związku GW328267X (**7**) (Rys. 3) została przebadana u pacjentów z astmą i katarem siennym. Niestety, wszystkie badania kliniczne zostały przerwane ze względu na brak satysfakcjonujących rezultatów [19, 103, 104].

Innym rozwiązaniem, które może zagwarantować osiągnięcie efektu przeciwzapalnego bez obniżania ciśnienia krwi jest zastosowanie proleków. Ufosforylowane formy agonistów receptora A_{2A} mogą być aktywowane przez enzym ekto-5'-nukleazydazę (ekto-5'-NT), którego stężenie jest większe w tkankach z przebiegającym procesem zapalnym. Związkiem o obiecujących właściwościach jest 2-(cykloheksyloetylotio)-AMP (**8**), który jest defosforylowany do 2-(cykloheksyloetylotio)adenozyny (**9**) (Rys. 3) [105].

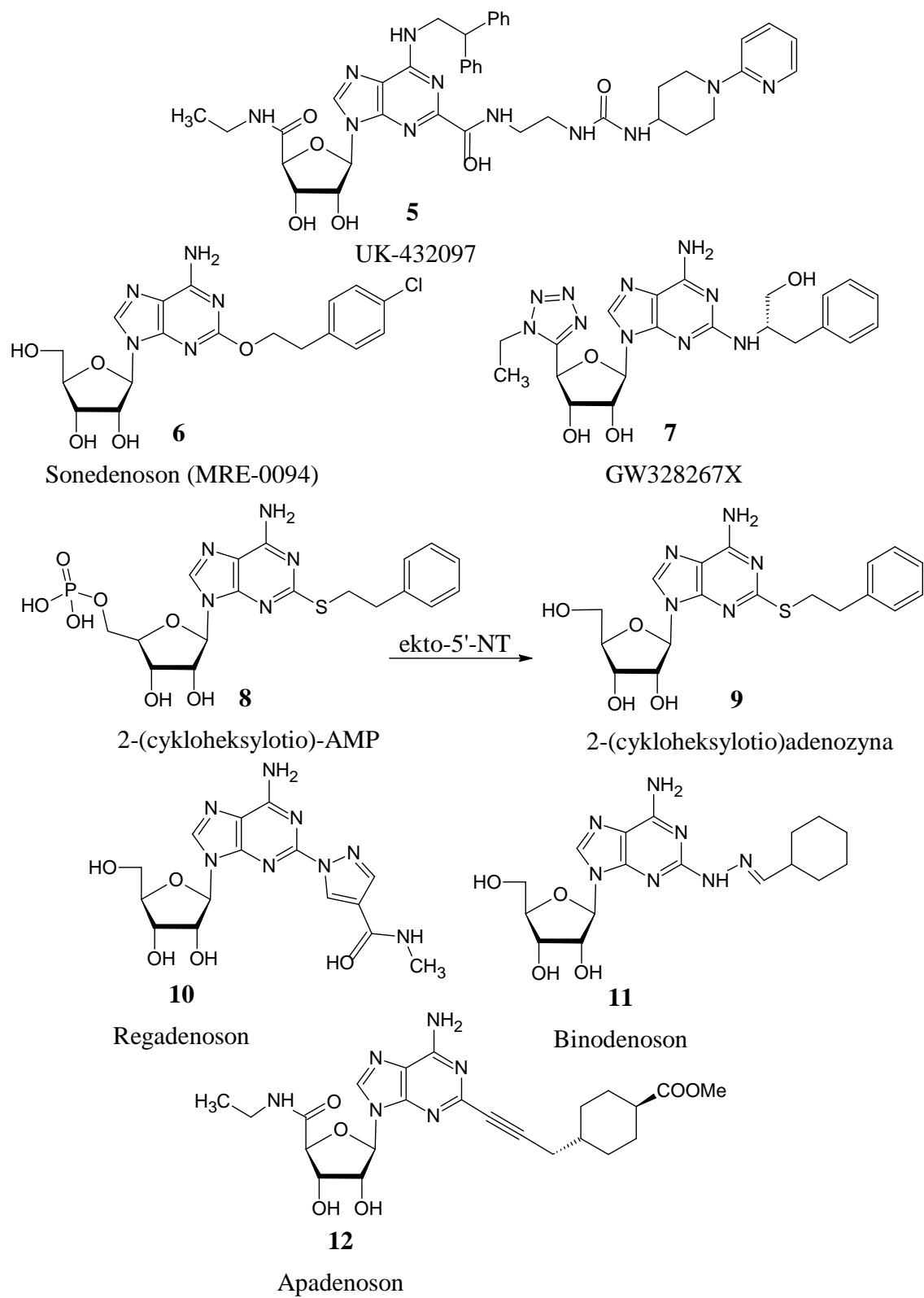
Związki o działaniu rozszerzającym naczynia krwionośne

Selektywni agoniści receptora A_{2A} stanowią nową klasę związków rozszerzających naczynia wieńcowe stosowanych w radioizotopowym obrazowaniu perfuzji mięśnia sercowego [106]. Metoda ta służy to nieinwazyjnej oceny przepływu krwi przez serce w celu wykrycia choroby wieńcowej.

Regadenoson (Lexiscan®), Astellas Pharma US, Inc., **10**) (Rys. 3) jest pierwszym selektywnym agonistą receptora A_{2A} dopuszczonym przez FDA do stosowania w lecznictwie. Podawany jest on dożylnie w postaci bolusa o ustalonej dawce leku. Jego skuteczność jest porównywalna do adenozyliny, która jest obecnie lekiem z wyboru w scyntygrafii perfuzyjnej

mięśnia sercowego (MPI). Regadenoson wykazuje niskie powinowactwo do receptorów A_{2A} . Ekspresja tych receptorów w naczyniach wieńcowych jest wysoka w porównaniu do innych tkanek, dzięki czemu stymulacja Regadenosonem pozwala na maksymalne rozszerzenie naczyń i jednocześnie zminimalizowanie skutków ubocznych w tkankach o większej gęstości receptorowej [107].

Binodenoson (CorVue™), King Pharmaceuticals, **11**) (Rys. 3) oraz Apadenoson (Stedivaze™, ATL146e, **12**) (Rys. 3) są kolejnymi selektywnymi agonistami receptora A_{2A} testowanymi jako potencjalne leki stosowane w MPI. Zostały opublikowane pozytywne rezultaty zakończonej III fazy badań klinicznych nad Binodenosonem. Związek ten, w porównaniu do adenozy, wywołuje mniej efektów ubocznych, nie zaobserwowano u pacjentów przypadków bloku przedsionkowo-komorowego. Kolejną zaletą Binodenosonu jest możliwość podawania go w postaci pojedynczego szybkiego wstrzyknięcia dożylnego [108, 109]. Niestety, w związku z nieścisłościami dotyczącymi wyników badań klinicznych FDA zablokował rejestrację tego agonisty. Apadenoson znajduje się obecnie w III fazie badań klinicznych, a wyniki I fazy są obiecujące. Związek jest dobrze tolerowany u pacjentów z astmą i przewlekłą obturacyjną chorobą płuc [88, 109].



Rys. 3. Agoniści receptora A_{2A}

2.5.1.3. Analogi adenozyliny działające poprzez receptory A_{2B}

Efekty aktywacji receptora A_{2B} tego podtypu AR są słabo scharakteryzowane w związku z problemem ze znalezieniem silnego i selektywnego agonisty. W ustaleniu znaczenia receptorów A_{2B} pomocne były badania na myszach transgenicznych, pozbawionych genu kodującego ten typ receptora, które wykazały ich istotną rolę ochronną w trakcie stanu zapalnego indukowanego hipoksją [110-112].

Hartowanie przez niedokrwienie (IP) jest procesem, w trakcie którego po krótkich epizodach subletalnego niedokrwienia następuje reperfuzja. Już w 1986 roku zostało odkryte, że IP zabezpiecza mięśniówkę serca przed skutkami późniejszego dłuższego epizodu niedokrwienia [113]. Ostatnie badania pokazują, że IP indukuje ekspresję receptorów A_{2B} w sercu, płucach i nerkach. Proces ten można zastąpić zastosowaniem agonistów A_{2B} AR, które chronią te organy przed uszkodzeniami spowodowanymi dłuższym niedokrwieniem. Związki te mają też potencjalne zastosowanie w leczeniu choroby wieńcowej dzięki hamowaniu agregacji płytek krwi oraz działaniu rozszerzającemu na naczynia krwionośne [112, 114, 115].

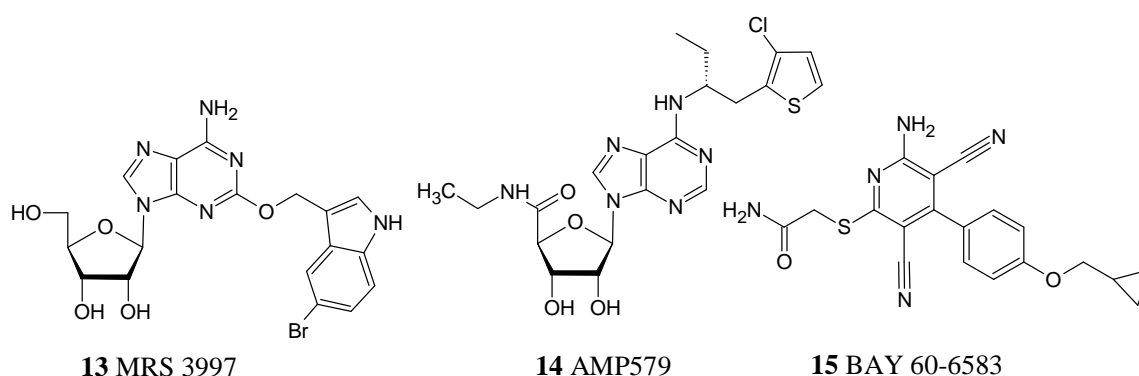
Nie jest jasna rola receptorów A_{2B} w chorobach układu oddechowego. W trakcie ostrego uszkodzenia płuc wzrasta poziom pozakomórkowej adenozyliny. Badania na mysim modelu uszkodzenia płuc związanym z wentylacją mechaniczną oraz na myszach transgenicznych pozbawionych receptora A_{2B} sugerują terapeutyczną rolę ich agonistów [114]. Z drugiej strony, rola tych receptorów w przewlekłych chorobach takich jak astma czy przewlekła obturacyjna choroba płuc, pozostaje niewyjaśniona. Wyniki jednych badań wskazują na ochronną rolę agonistów A_{2B} AR, a innych sugerują patologiczne działanie podwyższonego poziomu adenozyliny [116, 117].

A_{2B} jest głównym podtypem receptora dla adenozyliny obecnym w odcinku żołądkowo-jelitowym. Agoniści receptora A_{2B} mogą odgrywać ochronną rolę w chorobie Crohna, wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego, a także działać leczniczo w zaparciach poprzez wpływ na motorykę jelit [118, 119].

Inne potencjalne zastosowania agonistów A_{2B} to leczenie zaburzenia erekcji, stymulacja wzrostu włosów czy ochrona przed stwardnieniem kłębuszków nerkowych poprzez hamowanie wzrostu komórek mezangium kłębuszka nerkowego [120-122]. Badania

na szczurach wskazują także na korzystny efekt rozszerzania naczyń krwionośnych w nerkach [123].

W ostatnim czasie udało się otrzymać kilka pochodnych adenozyiny aktywujących receptor A_{2B} . Korzystne właściwości wykazuje związek MRS3997 (**13**) (Rys. 4), który jest pełnym agonistą receptora A_{2A} i A_{2B} (A_{2A} EC_{50} = 39,7 nM, A_{2B} EC_{50} = 109 nM) oraz częściowym agonistą receptora A_1 i A_3 [124]. AMP579 (**14**) (Rys. 4) jest agonistą receptora A_1 oraz A_{2A} , ale także A_{2B} z EC_{50} około 250 nM dla tego receptora. Najbardziej selektywnym agonistą jest BAY 60-6583 (**15**) (Rys. 4) (EC_{50} około 10 nM), związek niebędący pochodną adenozyiny [125].



Rys. 4. Agoniści receptora A_{2B}

2.5.1.4. Analogi adenozyiny działające poprzez receptory A_3

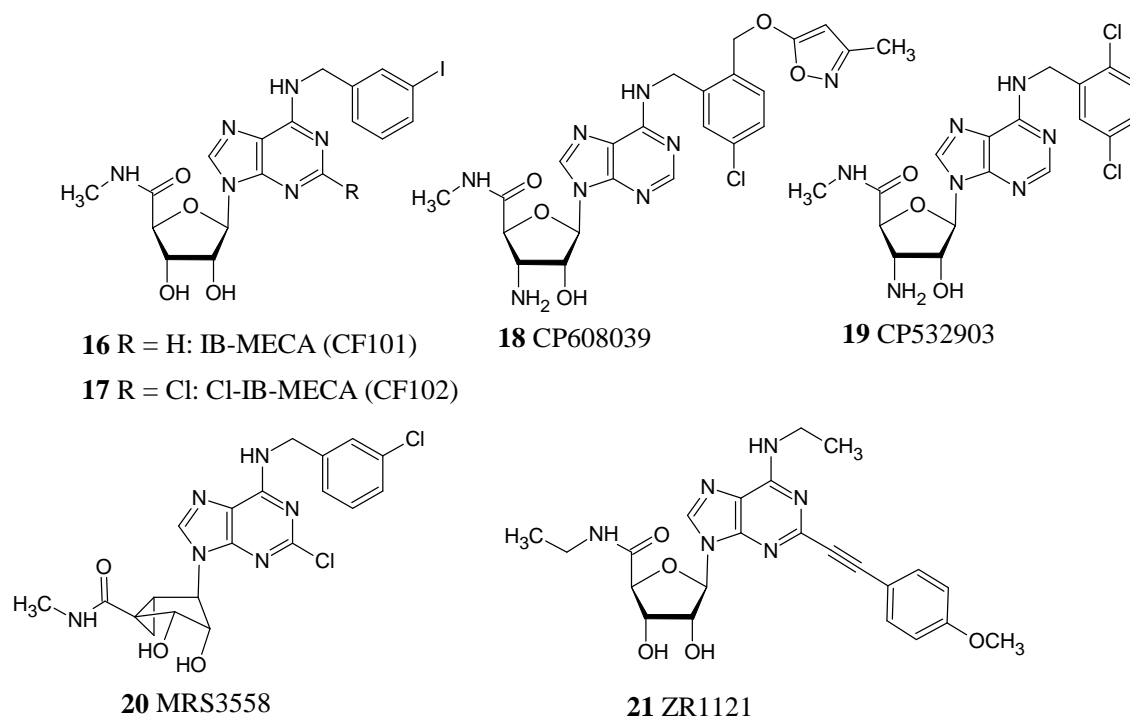
Selektywnymi agonistami receptora A_3 badanymi klinicznie są IB-MECA (CF101, Can-Fite Biopharma, **16**) (Rys. 5) oraz jego 2-chloro analog, Cl-IB-MECA (CF102, **17**) (Rys. 5). U pacjentów z chorobami przebiegającymi z procesem zapalnym, takimi jak łuszczyca, choroba Crohna i reumatoidalne zapalenie stawów ma miejsce zwiększona ekspresja receptorów A_3 [126]. Na tej podstawie zaproponowano leczenie wymienionych schorzeń za pomocą IB-MECA. Dane z II fazy badań klinicznych na pacjentach z łuszczycą zwykłą pokazały bezpieczeństwo, dobrą tolerancję i skuteczność doustnie podawanego związku, co pozwoliło rozpocząć przygotowania do kolejnej fazy badań [127]. Ponadto, IB-MECA znalazł się w fazie IIa badań klinicznych prowadzonych na pacjentach z reumatoidalnym zapaleniem stawów, którzy nie reagują na terapię Metotreksatem. Podawanie związku dwa razy dziennie przez 12 tygodni skutkowało złagodzeniem objawów choroby przy jednoczesnej dobrej tolerancji leku [128]. W trakcie badań nad wpływem doustnie podawanego IB-MECA na leczenie syndromu suchego oka dowiedziono nie tylko jego

skuteczność, ale zauważono również obniżenie ciśnienia wewnątrzgałkowego [129]. To skłoniło do zapoczątkowania badań leczenia jaskry tym związkiem [130].

Cl-IB-MECA znajduje się w fazie I/II badań klinicznych jako związek przeciwnowotworowy u pacjentów z zaawansowanym rakiem wątrobowo-komórkowym oraz w tej samej fazie badań u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C [131, 132]. Działanie przeciwnowotworowe obejmuje indukcję apoptozy w rakowych komórkach wątroby, a także deregulację ścieżek sygnałowych Wnt i NF- κ B [132]. Ponadto, wyniki badań przedklinicznych wykazały, że Cl-IB-MECA jest aktywny przeciwko HCV poprzez inhibicję NS5, RNA-zależnej polimerazy RNA [133]. Cl-IB-MECA jest także obiecującym lekiem w leczeniu zapalenia płuc. Wyniki badań wskazują, że związek ten osłabia indukowaną przez LPS przepuszczalność mikronaczyniową [134].

IB-MECA i Cl-IB-MECA posiadają dobrą selektywność w stosunku do receptorów A_3 występujących u szczurów. Niestety, selektywność tych związków u ludzi w stosunku do innych podtypów receptora jest obniżona. Pierwszym selektywnym agonistą ludzkiego receptora A_3 był CP-608039 (**18**) (Rys. 5), który razem z CP-532903 (**19**) (Rys. 5) był badany jako związek kardioprotekcyjny [135, 136]. Aktywność terapeutyczna CP-532903 była sprawdzana przy użyciu mysiego modelu *in vivo* zawału mięśnia sercowego oraz na modelu niedokrwienia/reperfuzji w izolowanym sercu myszy. Wyniki potwierdziły protekcyjną rolę związku CP-532903 w niedokrwionym mięśniu sercowym poprzez aktywację receptorów A_3 . Mechanizm działania obejmuje otwarcie kanałów K_{ATP} w sarkolemmie [136].

Inne pochodne adenozyne o dużej selektywności i aktywności w stosunku do receptorów A_3 to MRS3558 (**20**) (Rys. 5) oraz ZR1121 (**21**) (Rys. 5) [137-139]. Wyniki ostatnich badań pokazują, że MRS3558 jest bardziej skuteczny niż IB-MECA w łagodzeniu urazu niedokrwienia/reperfuzji płuc [140].



Rys. 5. Agoniści receptora A₃

2.6. Koniugaty adenozyne

Biwalentne ligandy stanowią obiecujący kierunek w projektowaniu leków, które mogą działać jednocześnie na dwa miejsca aktywne receptora lub na dwa różne receptory [141]. Opisano badania, których wyniki sugerują zwiększoną aktywność i powinowactwo takiej cząsteczki do dwóch osobnych ligandów [142].

W celu uzyskania związku o wzmocnionym działaniu kardioprotekcyjnym w stanach niedokrwienych mięśnia serca otrzymano koniugat zbudowany z agonisty receptora adenozyne A₃ (pochodnej IB-MECA) i receptora A₁ (pochodnej ADAC) [143]. Dwie pochodne zostały połączone poprzez grupę tiomocznikową a powstały podwójny agonista, MRS 1741 (**22**) (Rys. 6) aktywował jednocześnie receptory A₁ oraz A₃ wywołując silny efekt kardioprotekcyjny. Zastosowano zakres stężeń, przy którym reagowały tylko miocyty z oboma typami receptorów. Wyniki badań wskazują, że koniugat wywołuje efekt synergistyczny.

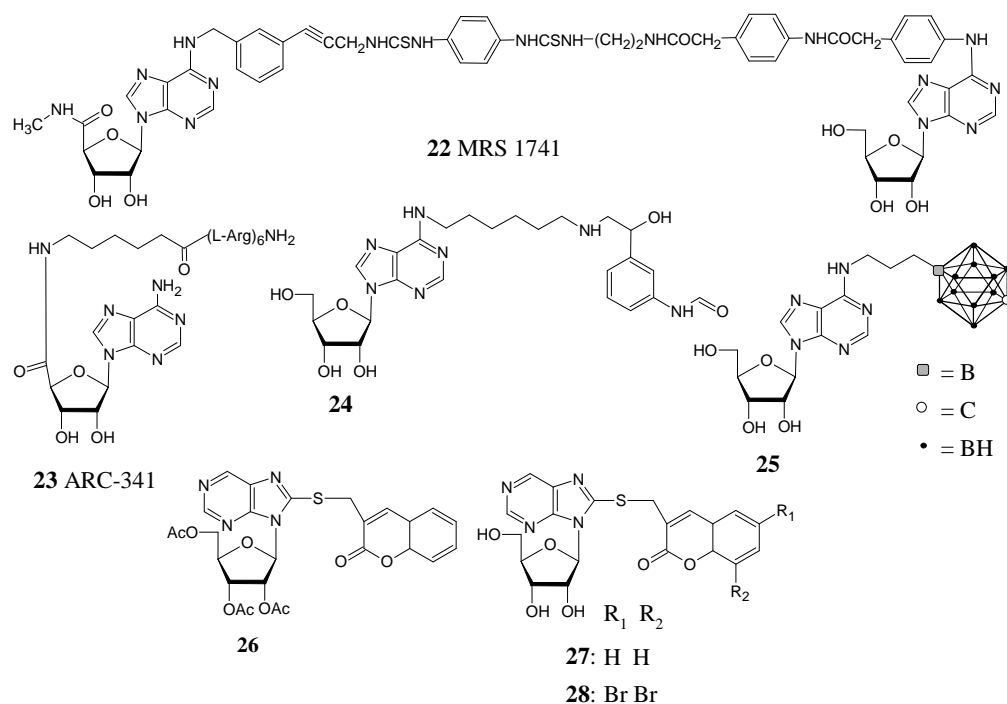
Kinazy białkowe wpływają m.in. na regulację dynamiki cytoszkieletu aktynowego, Rho-kinazę (ROCK) powodując formowanie się włókien aktyny. Nadmierna aktywacja ROCK skutkuje wzrostem ciśnienia oraz zaburzeniami sercowo-naczyniowymi. Możliwość hamowania kinaz białkowych ma nowy inhibitor, koniugat adenozyne z oligoargininą

ARC-341 (**23**) (Rys. 6) [144]. Oddziałuje on jednocześnie z miejscem wiązania ATP oraz substratu kinazy. ARC-341 skutecznie hamował ROCK, nie wykazywał cytotoksyczności i wstrzymywał zmiany w organizacji cytoszkieletu aktynowego.

Połączenie pochodnej adenozyiny z pochodną fentanylu dało związek o właściwościach antagonistycznych w stosunku do receptorów adenozyiny A_1 oraz opioidowego μ (**24**) (Rys. 6) [145]. Powinowactwo do receptorów było niskie, ale wystarczające do wywołania odpowiedniego efektu biologicznego. Koniugat ten może znaleźć zastosowanie w zapobieganiu obniżenia ciśnienia krwi w trakcie szoku septycznego, a także w terapii związanej z odstawieniem narkotyków.

Połączenia pochodnych adenozyiny z klasterem boru zostały zaproponowane jako potencjalne modulatory aktywności neutrofilii [146]. Adenozyina modyfikowana w pozycji 2'-C oraz N^6 *para*-karboranowym klasterem ($C_2B_{10}H_{11}$) efektywnie hamowała produkcję reaktywnych form tlenu przez aktywowane neutrofile, a najlepszy skutek uzyskano dla związku **25** (Rys. 6). Koniugaty wykazywały wysokie powinowactwo do receptora A_{2A} i mogą być rozważane jako potencjalne leki w badaniach aktywności przeciwzapalnej.

Ze względu na duże zapotrzebowanie na nowe leki przeciwko HCV, zsyntetyzowano koniugaty adenozyiny z kumaryną [147]. Cząsteczka kumaryny modyfikowana różnymi podstawnikami została przyłączona do rybofuranozydu puryny w pozycji C8 poprzez łącznik -SCH₂-. 7 spośród 26 otrzymanych koniugatów hamowało replikację subgenomowego replikonu HCV w linii komórkowej Huh 5-2. Najlepsze rezultaty uzyskano dla związków **26-28** (Rys. 6), których EC₅₀ odnoszące się do hamowania replikacji HCV wynosiły odpowiednio 6,6, 5,5 oraz 5,9 μ M. Cząsteczka kumaryny okazała się niezbędna do wywołania aktywności antywirusowej, natomiast obecność struktury rybofuranozydu potęgowała jej działanie.

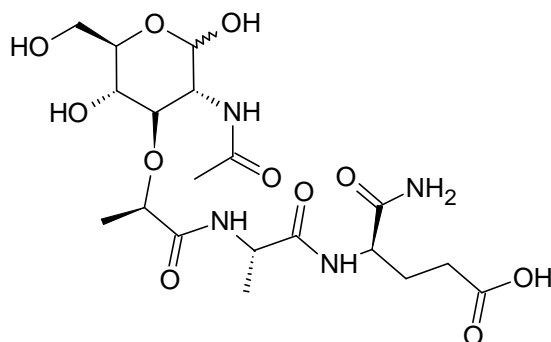


Rys. 6. Koniugaty adenozyzny

2.7. Właściwości biologiczne muramyldipeptydu

Muramyldipeptyd (*N*-acetylmuramylo-L-alanylo-D-izoglutamina, **29**) (Rys. 7) jest najmniejszym fragmentem peptydoglikanu tworzącego szkielet ściany komórkowej bakterii, który wykazuje aktywność adiuwantową. Został odkryty w 1974 roku, jako minimalna struktura odpowiedzialna za skuteczność kompletnego adiuwantu Freund'a, składającego się z nieżywych prątków *Mycobacterium tuberculosis* zawieszonych w emulsji olejowej [148]. MDP stymuluje niespecyficzną odporność przeciwko infekcjom bakteryjnym, wirusowym i pasożytniczym, a także stanowi czynnik protekcyjny przed nowotworami poprzez pobudzenie komórek immunokompetentnych, takich jak monocyty i makrofagi [149]. Aktywowane makrofagi zwiększają produkcję prozapalnych cytokin, co prowadzi m.in. do różnicowania i proliferacji limfocytów [150]. Niestety, MDP wywołuje także szereg działań ubocznych, np. jest pirogenny, wywołuje reakcje zapalne, artretyzm, zapalenie błony naczyniowej oka, reakcje anafilaktyczne powodujące zaburzenie czynności nerek, wątroby i śledziony [151-154]. Związek ten ulega szybkiej eliminacji z organizmu a także słabo przenika przez błony komórkowe [155]. Dotychczas zsyntetyzowano szereg analogów mających na celu znalezienie pochodnych MDP, które zachowałyby korzystne właściwości immunostymulujące, przy zminimalizowaniu efektów toksycznych i poprawieniu właściwości

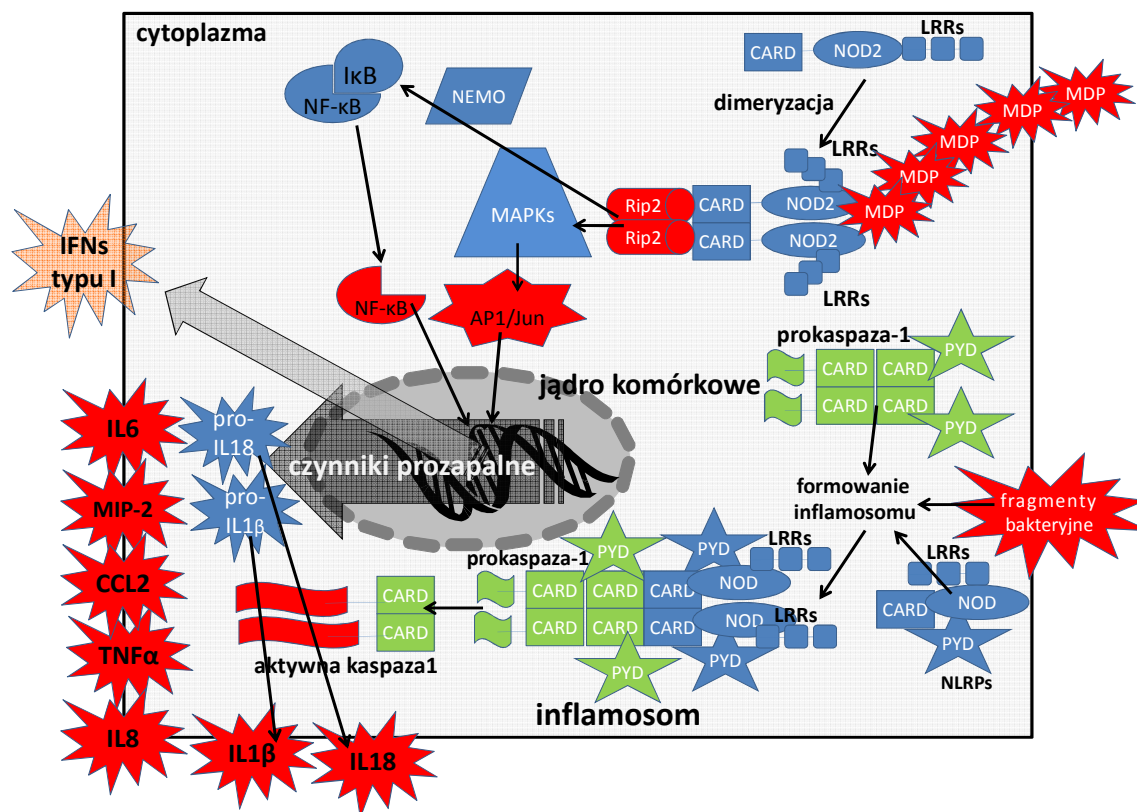
farmakokinetycznych. Poszukiwania te zaowocowały otrzymaniem wielu interesujących pochodnych, z których część została przebadana klinicznie.



Rys. 7. Budowa MDP (29)

2.7.1. Mechanizm działania MDP

MDP oraz jego analogi są intensywnie badane jako adiuwanty w szczepionkach oraz w leczeniu infekcji wirusowych i nowotworów [156, 157]. Działanie MDP związane jest z aktywacją komórek układu immunologicznego. MDP jest ligandem NOD2/CARD15, wewnątrzkomórkowego białka znajdującego się w makrofagach, monocytach, komórkach dendrytycznych i komórkach nabłonkowych jelit. Białko NOD2/CARD15 zbudowane jest z dwóch domen CARD znajdujących się na *N*-końcu, następnie jest centralnie położony receptor NOD, a na *C*-końcu występuje rejon bogaty w powtórzenia leucynowe (LRRs), dzięki któremu rozpoznawana jest cząsteczka MDP [158, 159]. Prowadzi to do oligomeryzacji NOD2 i przyłączenia kinazy białkowej RIP2 (receptor interacting protein 2, EC 2.7.11.1), co aktywuje kinazę sp38 MAP (EC 2.7.11.24) oraz NF- κ B. Dochodzi do zwiększonej ekspresji prozapalnych cytokin, takich jak IL-1 β , IL-6, TNF- α oraz chemokin i cząstek adhezyjnych [160, 161]. Ponadto, MDP oddziałuje na NLRP3, czyli złożony układ białek, który warunkuje przejście prokaspazy 1 do jej aktywnej formy, kaspazy 1. Kaspaza 1 jest z kolei niezbędna do aktywacji prozapalnych cytokin, takich jak IL-1 β (Rys. 8) [162].



Rys 8. Formowanie inflamosomu i aktywacja prokaspazy 1 [163]. Opublikowano na licencji Creative Commons.

2.7.2. Modyfikacje cząsteczki MDP

MDP składa się z *N*-acetylowanego kwasu muraminowego i dipeptydu przyłączonego do reszty mleczanowej za pomocą wiązania peptydowego. Zachowanie aktywności MDP zależy od odpowiedniej stereoizomerycznej konfiguracji cząsteczki dipeptydu. Do utrzymania immunostymulatorowych i adiuwantowych efektów niezbędna jest konfiguracja L pierwszego aminokwasu oraz D drugiego [164]. W 1976 roku zauważono, że zmiana L-Ala na D-Ala w części peptydowej MDP powoduje zahamowanie odpowiedzi humoralnej przez *N*-AcMur-D-Ala-D-Glu-NH₂ [165]. Późniejsze badania wykazały, że jest to związane z utratą aktywności wobec białka NOD2/CARD15 [166]. MDP pozbawione części cukrowej noszą nazwę desmuramyldipeptydów. Część *N*-acetylo-muramylova może być zastąpiona przez ugrupowania acylowe, co zwiększa lipofilowość związków. Des-MDP wykazują aktywność immunostymulującą, z jednoczesnym ograniczeniem właściwości pirogennych [167]. Grupa hydroksylowa przy C1 nie jest niezbędna dla aktywności biologicznej MDP. Może być zastąpiona przez ugrupowanie tiolowe a także podstawiona glikozydem α lub β benzylovym czy alkilowym [168, 169]. Glikozydy β -alkilowe MDP wykazały większą aktywność

immunostymulującą w porównaniu do odpowiednich α -glikozydów [170]. Synteza lipofilowych alkilowych β -glikozydów za pomocą alkoholowych aglikonów pozwoliła uzyskać związki stymulujące aktywność przeciwbakteryjną [171]. Zamiana grup hydroksylowych przy C4 i C6 w MDP na atom wodoru lub chloru prowadzi do prawie całkowitej utraty aktywności [172]. 6-*S*-acyłowe pochodne MDP nie wykazują właściwości adiuwantowych, w przeciwieństwie do lipofilowych 6-*O*-acyłowych pochodnych. *O*-acylowanie kwasami mykolowymi i tłuszczowymi zwiększa aktywność przeciwnowotworową [173, 174]. Grupa acetyloamidowa przy C2 jest niezbędna dla aktywności biologicznej, ale może być zamieniona na grupę hydroksylową, aminową czy *N*-metyloacetoamidową, a deaminacja tej grupy prowadzi do utraty aktywności [175]. Analogi MDP z grupą metylową zastąpioną atomem wodoru w łańcuchu bocznym kwasu muraminowego to nor-muramyłodipeptydy. Taka zmiana prowadzi do obniżenia aktywności adiuwantowej ale zarazem do obniżenia toksyczności [176].

2.8. Właściwości i zastosowanie wybranych pochodnych muramyłodipeptydu

Mimo, że zidentyfikowanie MDP i określenie jego właściwości nastąpiło w latach 70-tych, nadal jest to interesujący temat dla naukowców. W ciągu ostatnich kilku lat pojawiły się doniesienia na temat nowych pochodnych MDP oraz opublikowano obiecujące wyniki badań znanych już związków z tej grupy. Jednym z nich jest mifamurtyd, który został zarejestrowany jako lek.

Poprawienie właściwości farmakologicznych MDP można uzyskać poprzez zwiększenie lipofilowości związku. Pozwala to ograniczyć takie problemy, jak słabe wnikanie do makrofagów i szybką eliminację z organizmu [174]. Taki efekt osiągnięto dzięki zamknięciu pochodnej MDP w liposomach lub modyfikacji części peptydowej poprzez dołączenie hydrofobowego łańcucha.

Mifamurtyd (L-MTP-PE, **30**) (Rys. 9) jest liposomalnym preparatem muramylotripeptydu fosfatydyloetanolaminy (MTP-PE). MTP-PE to analog MDP o właściwościach lipofilowych i może być inkorporowany do dwuwarstwowej struktury lipidowej liposomu [177]. Dzięki takiej formulacji zwiększona jest aktywacja monocytów i makrofagów, a lek w ciągu kilku minut od podania przenika z krążenia ogólnego do tkanek. W marcu 2009 L-MTP-PE, jako preparat pod nazwą handlową Mepact®, został dopuszczony w 27 krajach Unii Europejskiej oraz Norwegii, Islandii i Lichtensteinu do leczenia kostniakomięsaka. Lek może być stosowany w terapii skojarzonej z pooperacyjną

chemioterapią wielolekową. Mifamurtyd nie jest pozbawiony działań ubocznych. W trakcie badań klinicznych zaobserwowano u pacjentów objawy niepożądane, takie jak dreszcze, gorączka czy zmęczenie [178].

MDP-Lys(L18) (Muroctasin, **31**) (Rys. 9) jest pochodną MDP o właściwościach lipofilowych, dzięki obecności łańcucha stearylowego. W porównaniu do MDP wykazuje większą aktywność biologiczną i niższą pirogenność. Badania wykazały, że w połączeniu z IFN- β hamuje wzrost komórek czerniaka złośliwego u myszy, podczas gdy monoterapia nie wpływała znacząco na rozwój nowotworu. Stymulacja komórek dendrytycznych pochodzących z monocytów krwi obwodowej przez MDP-Lys(L18) razem z IFN- β zwiększała produkcję IL-12, TNF- α oraz IL-6 [179].

Związek norAbuMDP jest apirogeną pochodną MDP, w której kwas muraminowy został zastąpiony kwasem nor-muraminowym, a L-alanina kwasem L-2-aminobutanowym. Dalsze modyfikacje polegające na przyłączeniu hydrofobowych ligandów pozwoliły uzyskać związki MT06 (**32**) i MT05 (**33**) (Rys. 9), które można inkorporować do struktury liposomu. Oba związki wykazały właściwości adiuwantowe podobne do MDP, ale nie stwierdzono wywoływania efektów ubocznych. Wykazano, że MT06 i MT05 mogą mieć potencjalne zastosowanie przy konstruowaniu szczepionki przeciwko boreliozie, która zawiera antygeny będące słabymi immunogenami [180].

Muramylo-dipeptyd C (MDP-C, **34**) (Rys. 9) jest związkiem apirogennym, niealergizującym i wykazującym niską toksyczność. Indukuje on dojrzewanie i aktywację komórek dendrytycznych, prowadząc do wydajniejszego niszczenia zainfekowanych komórek. Badania wykazały, że stymuluje on aktywność cytolityczną makrofagów w stosunku do komórek nowotworowych typu P388. MDP-C zwiększa także aktywność cytotoksyczną limfocytów T w stosunku do komórek nowotworowych typu P815. Ponadto, znacząco stymuluje odpowiedź układu immunologicznego na antygen powierzchniowy wirusa zapalenia wątroby typu B u myszy transgenicznych [181]. MDP-C jest obiecującym związkiem o potencjalnym zastosowaniu w diagnostyce, immunoterapii i profilaktyce takich chorób jak wirusowe zapalenie wątroby typu B czy nowotwory.

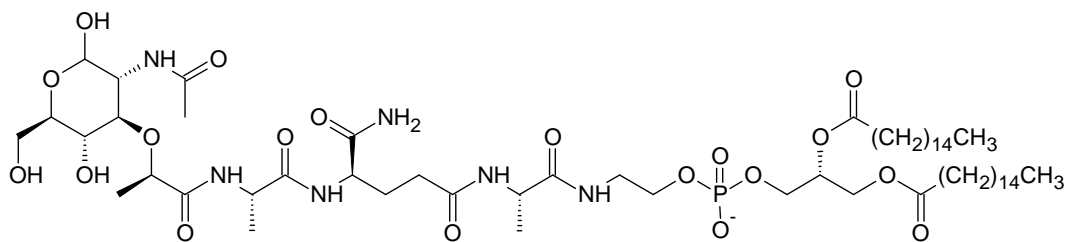
N-Acetylo-glukozamino-muramylo-dipeptyd (GMDP, **35**) (Rys. 9) jest pochodną MDP o mniejszej od niego pirogenności i toksyczności. Najnowsze badania na myszach z guzem Ehrlicha oraz czerniakiem pokazały, że związek ten zwiększa odpowiedź przeciwnowotworową na cisplatynę oraz na kombinację cisplatyny z TNF- α , a także redukuje

ich toksyczność. Ponadto, podanie GMDP pozwoliło na zmniejszenie dawek związków cytotoksycznych [182].

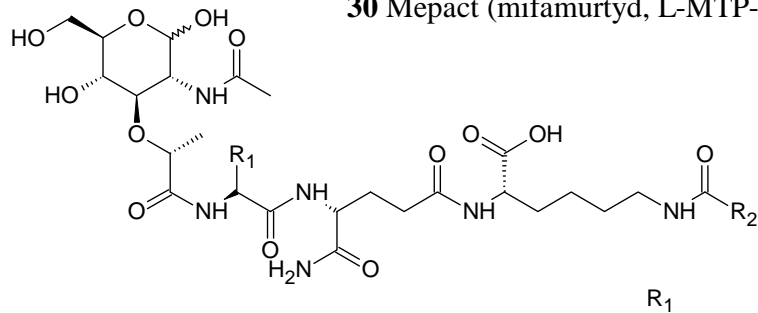
Wykazano, że podając GMDP w mikroemulsji olej w wodzie wzrosła 10-krotnie jego biodostępność w porównaniu do zwykłego roztworu. Dzięki takiej formulacji związek chroniony jest przed degradacją i polepsza się jego przenikalność jelitowa [183].

Wcześniejsze badania wykazały, że GMDP ma właściwości adiuwantowe. Z tego względu postanowiono podać go doustnie pacjentom otrzymującym szczepionkę przeciwko grypie. Niestety, nie stwierdzono lepszej efektywności szczepionki, za to odnotowano wzrost występowania efektów ubocznych, takich jak gorączka, bóle głowy i złe samopoczucie [184].

Cykloalkilowe glikozydy MDP są nowymi pochodnymi o korzystnych właściwościach. Ostatnie badania wykazały, że β -cykloheksyloetyloglikozyd MDP (**36**) (Rys. 9) zwiększa odporność na sepsę u myszy wywołaną wstrzyknięciem dootrzewnowym bakterii *E.Coli*. Wszystkie zwierzęta, którym podano ten glikopeptyd w dawce 1,5 mg/kg, przeżyły. Ponadto wykazano, że w większym stopniu niż MDP stymuluje on produkcję *in vitro* interleukin, TNF- α oraz IFN- γ przez ludzkie jednojądrowe komórki krwi obwodowej. Są zaplanowane dalsze badania, które mają na celu określenie jego interakcji z receptorem NOD2 [185].



30 Mepact (mifamurtyd, L-MTP-PE)



31 MDP-Lys(L18) (muroctasin): CH₃

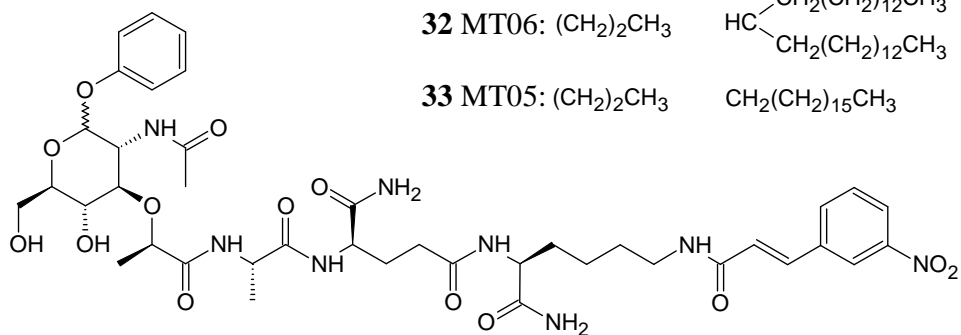
CH₂(CH₂)₁₅CH₃

32 MT06: (CH₂)₂CH₃

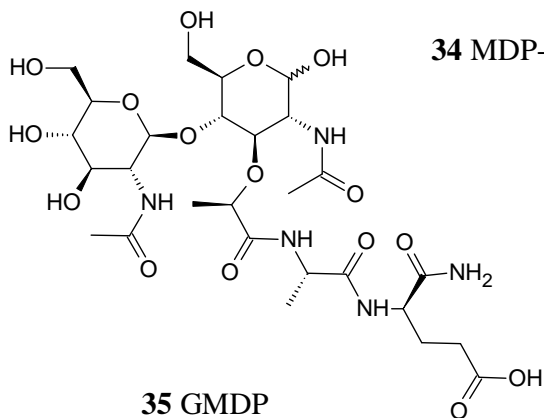
CH₂(CH₂)₁₂CH₃
HC
CH₂(CH₂)₁₂CH₃

33 MT05: (CH₂)₂CH₃

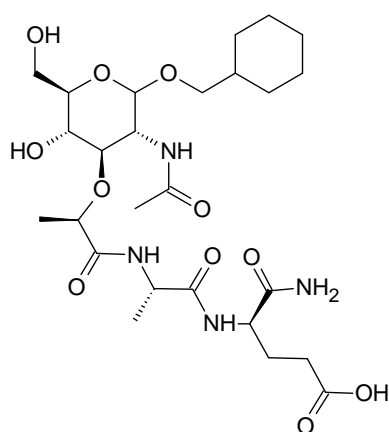
CH₂(CH₂)₁₅CH₃



34 MDP-C



35 GMDP

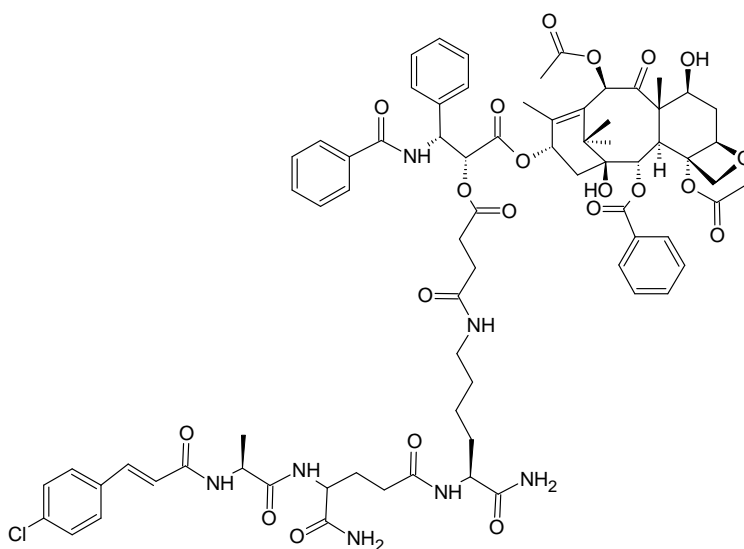


36 β-cykloheksyloetyloglikozyd MDP

Rys. 9. Pochodne MDP

2.9. Koniugaty muramyldipeptydu

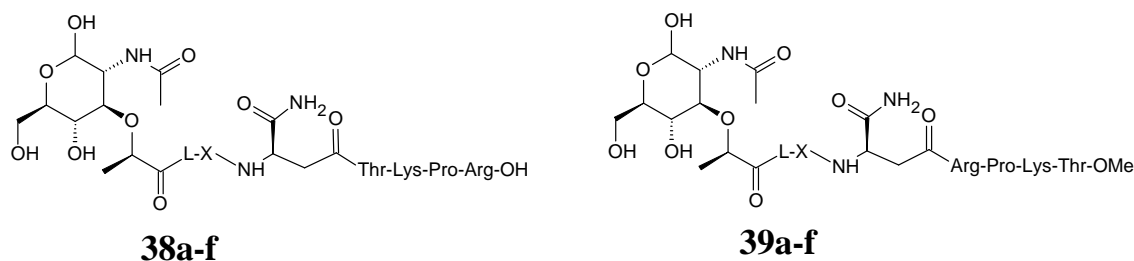
Paklitaksel jest chemioterapeutyką stosowaną w leczeniu m.in. raka jajnika, piersi oraz niedrobnokomórkowego raka płuc. Mechanizm działania przeciwnowotworowego związany jest z wpływem na mikrotubule poprzez zwiększanie polimeryzacji tubuliny oraz hamowanie depolimeryzacji mikrotubuli. Ostatnio dowiedziono, że Paklitaksel jest także ligandem Toll-podobnych receptorów, poprzez które stymulują makrofagi do produkcji TNF- α [186]. Testy biologiczne wykazały, że koniugat analogu MDP z Paklitaksem (MTC-220, **37**) (Rys. 10) hamuje wzrost nowotworu u myszy oraz hamuje jego przerzutowanie *in vivo*. Wyniki wskazują na synergizm działania koniugatu. Paklitaksel podany osobno nie zapobiegał przerzutom komórek nowotworowych u myszy z rakiem piersi (uzyskanego przez wszczepienie komórek linii 4T1) oraz u myszy z wszczepionym rakiem płuc Lewisa. Mechanizm działania MTC-220 obejmuje hamowanie akumulacji komórek supresorowych pochodzenia mieloidalnego w śledzionie i szpiku kostnym. Ponadto, dochodzi do obniżenia poziomu mRNA cytokin zapalnych [187].



Rys. 10. Budowa MTC-220 (**37**)

Tuftsyna jest tetrapeptydem (H-Thr-Lys-Pro-Arg-OH), najmniejszym endogennym modulatorem występującym we krwi człowieka i innych ssaków. W Katedrze Chemii Organicznej Politechniki Gdańskiej zaproponowano syntezę koniugatów tuftsyny z MDP jako nowych związków o potencjalnym działaniu immunostymulującym i przeciwbakteryjnym. Związki te zostały przebadane w Zakładzie Immunologii Klinicznej i Transplantologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego na mysim modelu sepsy. Spośród wielu zsyntetyzowanych koniugatów dwa wykazały obiecującą aktywność *in vivo* (Rys. 11).

Związek, który w części peptydowej MDP zawierał alaninę (**38a**), w znacznym stopniu redukował ilość patogennych bakterii, jednocześnie zwiększając aktywność makrofagów we wszystkich badanych tkankach. Drugi koniugat, zawierający walinę (**38c**), zwiększał aktywność fagocytarną bez wpływu na ilość bakterii w organizmie [188, 189].



a: R = CH₃; X = Ala

b: R = H; X = Ala

c: R = CH₃; X = Val

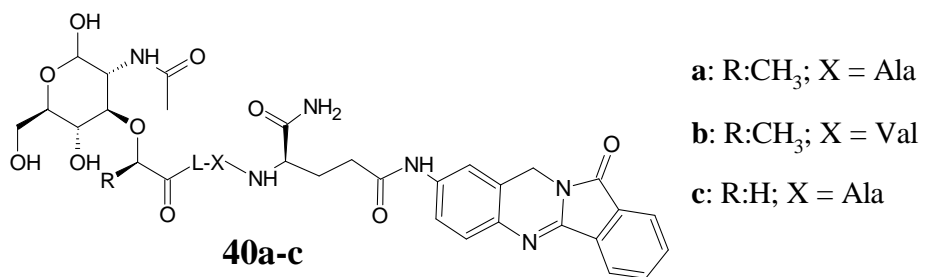
d: R = H; X = Val

e: R = CH₃; X = Pro

f: R = H; X = Pro

Rys. 11. Budowa koniugatów MDP z tuftsyną

Kolejną grupę koniugatów MDP zsyntetyzowanymi w Katedrze Chemii Organicznej Politechniki Gdańskiej stanowią jego połączenia z batracyliną (BAT). Batracylina jest związkiem o wysokiej aktywności przeciwnowotworowej. Ograniczenia w jej zastosowaniu u ludzi to przede wszystkim duża toksyczność oraz bardzo niska rozpuszczalność w wodzie [190]. Badania wykazały, że koniugaty MDP z BAT powodowały śmierć komórek nowotworowej linii WEHI 164 zmieszanej z komórkami immunologicznymi na drodze apoptozy (związki **40a**, **40b**, **40c**, Rys. 12). W przeciwieństwie do koniugatów, BAT i MDP powodowały nekrozę komórek immunologicznych. Zaskakujący jest fakt, że niektóre analogi zwiększały żywotność komórek linii K562 i Ab. Niska toksyczność koniugatów oraz ich zdolność do indukcji apoptozy wskazuje na potencjalne zastosowanie niektórych analogów jako leków przeciwnowotworowych. Przeznaczenie koniugatów należy ograniczyć do zwalczania wytypowanych nowotworów, o pochodzeniu mezenchymalnym takim jak linia komórkowa WEHI 164, wyizolowana z mysiego włókniakomięsaka [191].



Rys. 12. Budowa koniugatów MDP i nor-MDP z batracyliną

3. CEL I ZAKRES PRACY

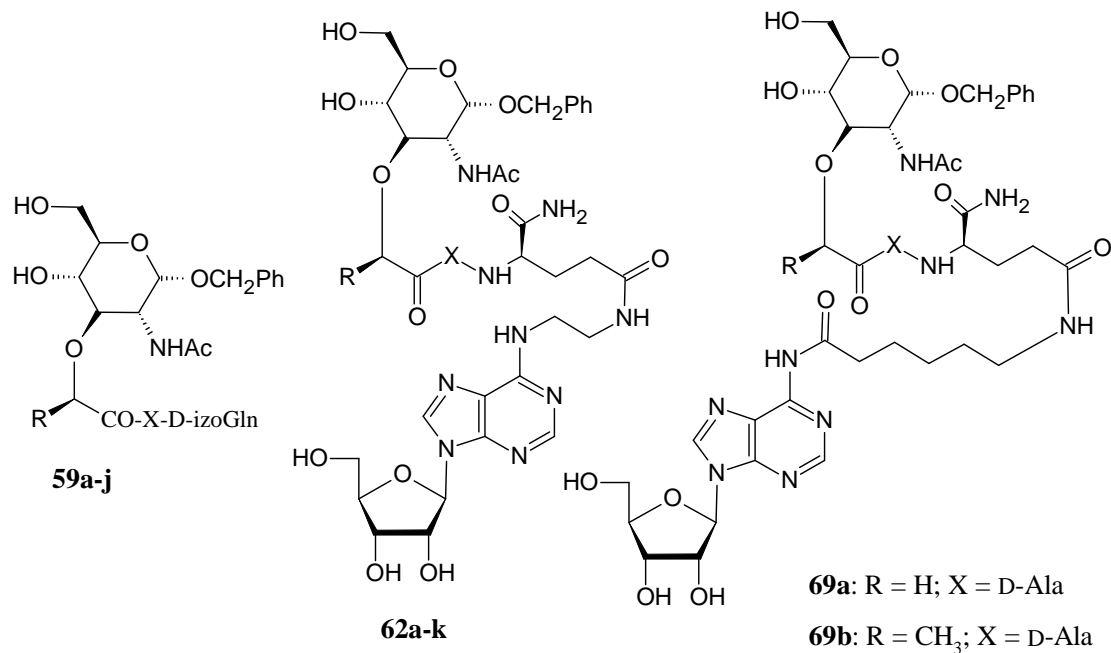
Celem mojej rozprawy doktorskiej jest synteza oraz badania aktywności biologicznej koniugatów adenozyiny z pochodnymi muramylo-dipeptydu i nor-muramylo-dipeptydu zawierających D-aminokwasy jako potencjalnych związków immunosupresyjnych.

Praca syntetyczna obejmowała:

- syntezę 5 chronionych dipeptydów:
 - Z-D-Ala-D-izoGln(O*t*-Bu) (**56a**)
 - Z-D-2-ABA-D-izoGln(O*t*-Bu) (**56b**)
 - Z-D-Pro-D-izoGln(O*t*-Bu) (**56c**)
 - Z-D-Ser-D-izoGln(O*t*-Bu) (**56d**)
 - Z-D-Val-D-izoGln(O*t*-Bu) (**56e**);
- syntezę podstawionego kwasu muraminowego (**45**) i nor-muraminowego (**46**);
- syntezę 10 pochodnych MDP i nor-MDP poprzez kondensację podstawionego Mur i nor-Mur z otrzymanymi dipeptydami (**59a-j**);
- syntezę koniugatów adenozyiny z podstawionymi MDP i nor-MDP poprzez łącznik aminoetylowy (**62a-k**);
- syntezę koniugatów adenozyiny z podstawionymi MDP i nor-MDP poprzez łącznik 6-aminoheksanoilowy (**69a-b**).

Badania biologiczne obejmowały:

- badanie żywotności komórek testem kolorymetrycznym MTT poddanych działaniu związków **59e**, **59f**, **59i**, **59j**, **62a-k**, **69a-b** wobec limfoidalnych linii komórkowych Jurkat oraz L1210, a także na komórkach docelowych dla związków immunosupresyjnych (PBMC);
- określenie aktywności antyproliferacyjnej testem inkorporacji tymidyny znakowanej trytem związków **59e**, **59f**, **59i**, **59j**, **62a-k**, **69a-b** wobec limfoidalnych linii komórkowych Jurkat oraz L1210, a także na komórkach docelowych dla związków immunosupresyjnych (PBMC)



- | | |
|---|---|
| a: R = CH ₃ ; X = D-Ala | f: R = H; X = D-Ala |
| b: R = CH ₃ ; X = D-2-ABA | g: R = H; X = D-2-ABA |
| c: R = CH ₃ ; X = D-Pro | h: R = H; X = D-Pro |
| d: R = CH ₃ ; X = D-Ser | i: R = H; X = D-Ser |
| e: R = CH ₃ ; X = D-Val | j: R = H; X = D-Val |
| | k: R = CH ₃ ; X = L-Val |

Rys. 13. Struktury badanych związków

Prace syntetyczne przeprowadziłam w Katedrze Chemii Organicznej Politechniki Gdańskiej pod kierunkiem dr hab. inż. Krystyny Dzierzbickiej, prof. nadzw. PG.

Badania aktywności biologicznej wykonałam w Zakładzie Immunologii Klinicznej i Transplantologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem dr hab. med. Piotra Trzonkowskiego, prof. nadzw. GUMed.

4. WYNIKI I WNIOSKI

4.1. Prace syntetyczne

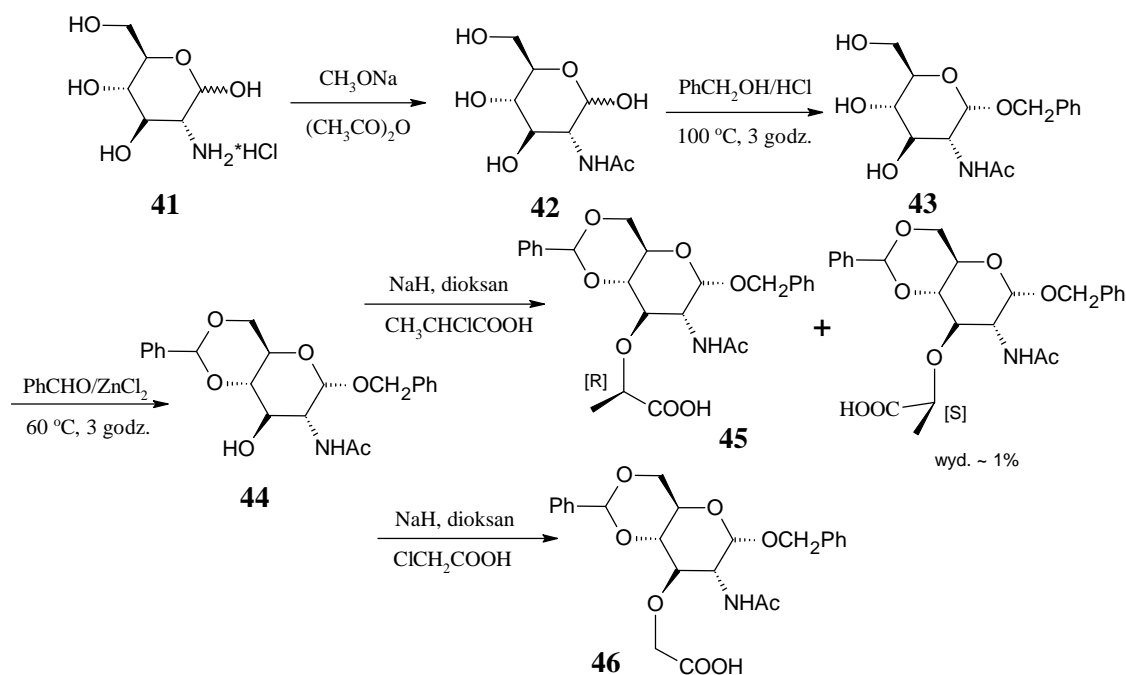
Część syntetyczna pracy obejmowała otrzymanie: pochodnych muramyldipeptydu i nor-muramyldipeptydu (**59a-j**) oraz koniugatów tych związków z adenozyną poprzez łącznik aminoetylowy (**62a-k**) oraz 6-aminoheksanoilowy (**69a-b**) (Rys.13).

4.1.1. Synteza pochodnych muramyldipeptydu i nor-muramyldipeptydu

Muramyldipeptyd otrzymano na podstawie procedury opisanej przez Jeanloza i Flowersa, modyfikując niektóre etapy [192]. Synteza zaczyna się od przeprowadzenia chlorowodoru glukozyminy w kwas muraminowy (Mur) lub nor-muraminowy (nor-Mur). Kolejnym krokiem jest uzyskanie chronionego dipeptydu. Następnie zdejmuje się osłonę z dipeptydu (L-Ala-D-izoGln) i przyłącza się go do chronionego Mur lub nor-Mur. Na koniec usuwa się grupy ochronne. Możliwa jest również synteza MDP na fazie stałej [193]. Syntezę nowych pochodnych MDP(D,D) i nor-MDP(D,D) oparto na procedurze opisanej przez Lefranciera oraz na metodzie opracowanej w Katedrze Chemii Organicznej PG przez zespół prof. Krystyny Dzierzbickiej dla pochodnych MDP [194].

4.1.1.1. Synteza podstawionego kwasu muraminowego i nor-muraminowego

W celu otrzymania chronionego kwasu muraminowego (**45**) i nor-muraminowego (**46**) należało przeprowadzić chlorowodorek D-glukozyminy (**41**) do *N*-acetyloglukozyminy (**42**). Następne etapy syntezy polegały na zablokowaniu grup hydroksylowych pierścienia glukopiranozowego, z wyjątkiem grupy OH w pozycji C3. W pierwszej kolejności założono osłonę benzylową na grupę OH przy C1, po czym ochroniono jednocześnie obie grupy hydroksylowe na C4 i C6 za pomocą osłony benzylidenowej. Następnie przeprowadzono reakcję 3-*O*-alkilowania kwasem DL- α -chloropropionowym lub kwasem chlorooctowym, w celu otrzymania odpowiednio podstawionego Mur (**45**) i nor-Mur (**46**) (Schemat 2).



Schemat 2. Synteza podstawionego kwasu muraminowego i nor-muraminowego

4.1.1.1.1. 2-Acetamido-2-deoksy-D-glukopiranozyd (42)

N-acetyloglukozaminę (**42**) otrzymano według metody opisanej przez Hortona (Schemat 2) [195]. W celu otrzymania wolnej zasady aminocukru rozpuszczono chlorowodorek *D*-glukozaminy w roztworze metanolanu sodu. Reakcję *N*-acetylowania przeprowadzono traktując *D*-glukozaminę nadmiarem bezwodnika octowego w obniżonej temperaturze i pozostawiono do krystalizacji produktu.

4.1.1.1.2. 2-Acetamido-1-*O*-benzylo-2-deoksy- α -*D*-glukopiranozyd (43)

Pochodną benzylową *N*-acetyloglukozaminy otrzymano według metody opisanej przez Arendta i in. (Schemat 2) [196]. Reakcja polegała na ogrzewaniu przez 3 godziny *N*-acetyloglukozaminy w bezwodnym alkoholu benzylowym zawierającym 2% chlorowodoru. Następnie ochłodzony roztwór wiano do benzenu i wytrącono produkt wkraplając mieszaninę reakcyjną do kolby zawierającej bezwodny eter dietylowy. Produkt krystalizowano z etanolu.

4.1.1.1.3. 2-Acetamido-4,6-*O*-benzylideno-1-*O*-benzylo-2-deoksy- α -*D*-glukopiranozyd (44)

2-Acetamido-4,6-*O*-benzylideno-1-*O*-benzylo-2-deoksy- α -*D*-glukopiranozyd (**44**) otrzymano według metody opisanej przez Arendta i in. (Schemat 2) [196]. Jednocześnie ochronę grup hydroksylowych przy C4 i C6 uzyskano tworząc cykliczny acetal za pomocą aldehydu benzoowego. Reakcję przeprowadzono ogrzewając pochodną benzylową *N*-

acetyloglukozaminy z aldehydem benzoesowym w obecności $ZnCl_2$, pełniącego rolę katalizatora i odczynnika odwadniającego. Otrzymany roztwór ochłodzono, rozcieńczono etanolem a następnie produkt wytrącono z wody. W celu pozbycia się nieprzereagowanego aldehydu benzoesowego przeprowadzono krystalizację w układzie dioksan: butanon-2: heksan (21:10:17, v/v). Czystość otrzymanego produktu potwierdzono chromatograficznie na płytkach TLC w układzie B.

4.1.1.1.4. 2-Acetamido-4,6-*O*-benzylideno-1-*O*-benzylo-2-deoksy-3-*O*-karboksyetylo- α -D-glukopiranozyd (45)

Pochodną (45) otrzymano według metody opisanej przez Osawę (Schemat 2) [197].

3-*O* alkirowanie pochodnej 44 przeprowadzono na drodze syntezy Williamsona. Z pochodnej benzylidenowej uzyskano alkohol za pomocą NaH. Następnie alkirowano kwasem DL- α -chloropropionowym uzyskując mieszaninę podstawionych kwasów muraminowego (izomer R) oraz izomuraminowego (izomer S). Produkt krystalizowano z metanolu, następnie rekrystalizowano z tego samego rozpuszczalnika. Kwas izomuraminowy krystalizuje szybciej, co pozwala na rozdzielenie stereoizomerów. Osawa i Jeanloz wykazali, że jest to w dużym stopniu stereospecyficzna metoda otrzymywania naturalnego izomeru pochodnej kwasu *N*-acetylmuraminowego, dzięki zastosowaniu anomeru α glikozydu benzyloвого [197]. Czystość otrzymanego produktu potwierdzono chromatograficznie na płytkach TLC w układzie C.

4.1.1.1.5. 2-Acetamido-4,6-*O*-benzylideno-1-*O*-benzylo-2-deoksy-3-*O*-karboksymetylo- α -D-glukopiranozyd (46)

Podstawiony kwas nor-muraminowy (46) otrzymano według metody opisanej przez Lefranciera (Schemat 2) [198].

Pochodną benzylidenową rozpuszczono w bezwodnym dioksanie i przeprowadzono w alkohol za pomocą NaH. Następnie alkirowano kwasem chlorooctowym uzyskując podstawiony kwas nor-muraminowy. Produkt krystalizowano z metanolu. Czystość otrzymanego produktu sprawdzano chromatograficznie na płytkach TLC w układzie C.

4.1.1.2. Chronione aminokwasy

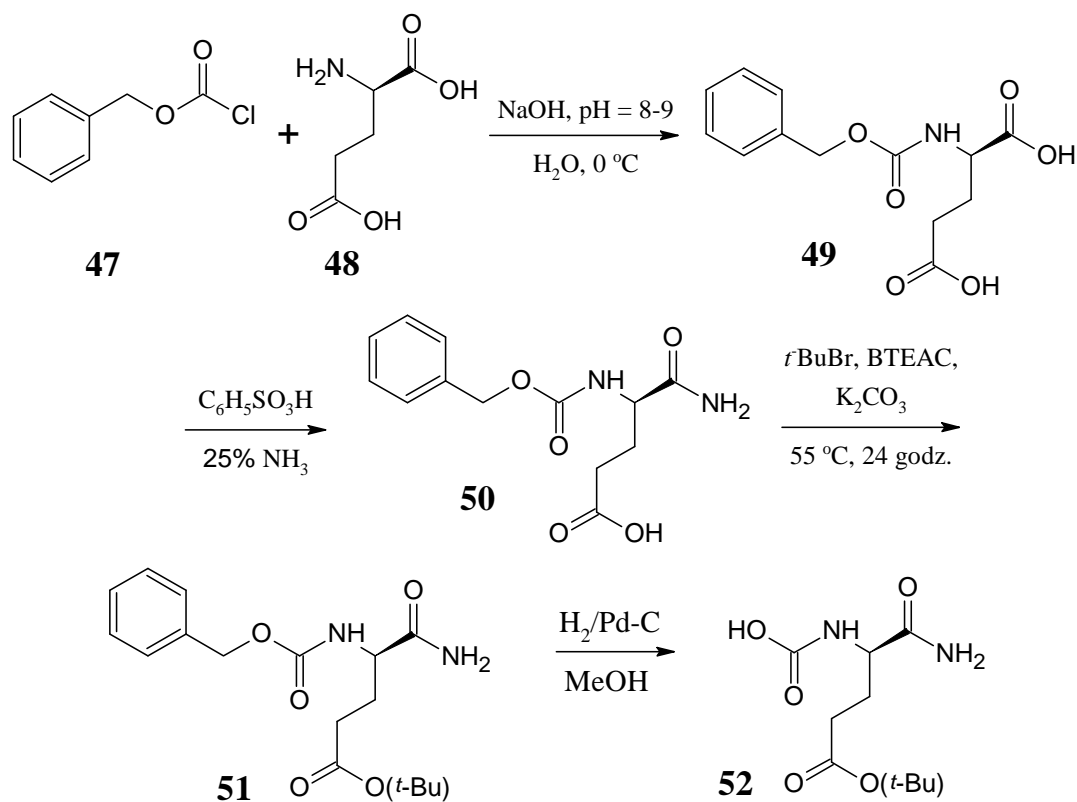
W celu otrzymania dipeptydów należało czasowo osłonić grupę aminową aminokwasu acylującego oraz karboksylową aminokwasu acylowanego. Najczęściej stosowanymi grupami

ochronnymi funkcji α -aminowej w syntezie w roztworze jest osłona Z, Nps oraz Bpoc w połączeniu z osłoną *tert*-butylową łańcucha bocznego, bądź osłona Boc w połączeniu z osłoną benzylową łańcucha bocznego [199]. Zdecydowano się zastosować osłonę Z, ze względu na nieskomplikowany proces jej założenia, łatwość usunięcia katalityczną wodorolizą, oraz jej wpływ na hamowanie racemizacji w trakcie tworzenia wiązania peptydowego [200].

4.1.1.2.1. Z-D-izoGln(O*t*-Bu) (51) [201]

Na grupę aminową kwasu D-glutaminowego (**48**) założono osłonę benzyloksykarbonylową za pomocą chloromrówczanu benzylu (**47**). *N*-acylowanie prowadzono w warunkach reakcji Schottena-Baumanna, w obecności zasady NaHCO₃ i NaOH. Związek (**48**) rozpuszczono w roztworze NaHCO₃ i wody, ochłodzono do 0°C. Do silnie mieszanego roztworu wkraplano jednocześnie chloromrówczan benzylu oraz 2N NaOH w ciągu 1,5 godz., utrzymując pH = 8-9. Całość mieszano 24 godz. W celu pozbycia się nieprzereagowanego chloromrówczanu benzylu mieszaninę ekstrahowano eterem dietylowym, a wodną warstwę zakwaszono 6N HCl do pH = 2-3. Powstały olej ekstrahowano eterem dietylowym, połączone roztwory organiczne przemyto wodą i suszono bezwodnym MgSO₄. Po odparowaniu eteru na wyparce obrotowej Z-D-Glu (**49**) krystalizowano z octanu etylu i heksanu [202].

Następnie związek **49** poddano kondensacji z paraformaldehydem w obecności kwasu benzenosulfonowego i amonolizie powstałego oksazolidynonu uzyskując Z-D-izoGln (**50**). Powstającą z w trakcie reakcji wodę usuwano poprzez destylację azeotropową [203]. Kolejnym etapem było ochronienie grupy karboksylowej Z-D-izoGln, co uzyskano poprzez reakcję z bromkiem *tert*-butylu w obecności BTEAC i K₂CO₃ [201]. Otrzymano produkt Z-D-izoGln(O*t*-Bu) (**51**) (Schemat 3).



Schemat 3. Synteza Z-D-izoGln(O*t*-Bu) (**51**) i zdejmowanie osłony Z

4.1.1.2.2. Z-D-Ala (**53a**), Z-D-2-ABA (**53b**), Z-D-Pro (**53c**), Z-D-Ser (**53d**), Z-D-Val (**53e**)

Chronione aminokwasy, Z-D-Ala (**53a**), Z-D-2-ABA (**53b**), Z-D-Pro (**53c**), Z-D-Ser (**53d**), Z-D-Val (**53e**), zostały zsyntetyzowane według metody opisanej dla Z-D-Glu (**49**).

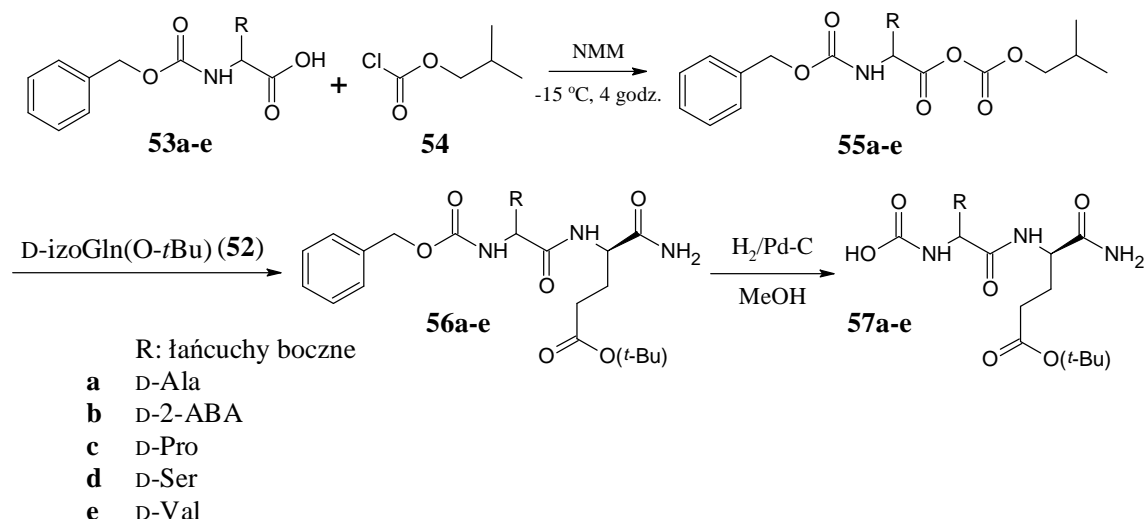
4.1.1.3. Dipeptydy

W syntezie dipeptydów: Z-D-Ala-D-izoGln(O*t*-Bu) (**56a**), Z-D-2-ABA-D-izoGln(O*t*-Bu) (**56b**), Z-D-Pro-D-izoGln(O*t*-Bu) (**56c**), Z-D-Ser-D-izoGln(O*t*-Bu) (**56d**), Z-D-Val-D-izoGln(O*t*-Bu) (**56e**), zastosowałam metodę mieszanych bezwodników według procedury podanej przez Lefranciera [204]. Wcześniej usunięto osłonę benzyloksykarbonylową z chronionej izoglutaminy (**51**) poprzez katalityczną wodorolizę. W takich warunkach pozostaje nienaruszona osłona *tert*-butylowa.

Reakcję prowadzono w temperaturze -15 °C stosując jako odczynnik kondensujący chloromrówczan izobutyli w obecności zasady trzeciorzędowej NMM. Zastosowano równomolowe ilości aminokwasu acylującego (**53a-e**) i chloromrówczanu izobutyli (**54**) zgodnie z opisaną procedurą. Po około 3 min. otrzymany odpowiedni bezwodnik (**55a-e**) użyto w nadmiarze do acylowania D-izoGln(O*t*-Bu) (**55**). Reakcję prowadzono 4 godz. w

temp. -15°C . Po tym czasie podwyższono temperaturę do 0°C i dodano 2,5 M roztwór KHCO_3 . Mieszaninę reakcyjną wylano do nasyconego roztworu NaCl . Osad odsączono i krystalizowano z octanu etylu (Schemat 4). Strukturę otrzymanych chronionych dipeptydów (**56a-e**) potwierdzono na podstawie analizy widm $^1\text{H NMR}$.

Bezpośrednio przed łączeniem dipeptydów z podstawionym Mur lub nor-Mur zdjęto osłonę Z za pomocą katalitycznej wodorolizy, otrzymując związki **57a-e** (Schemat 4).

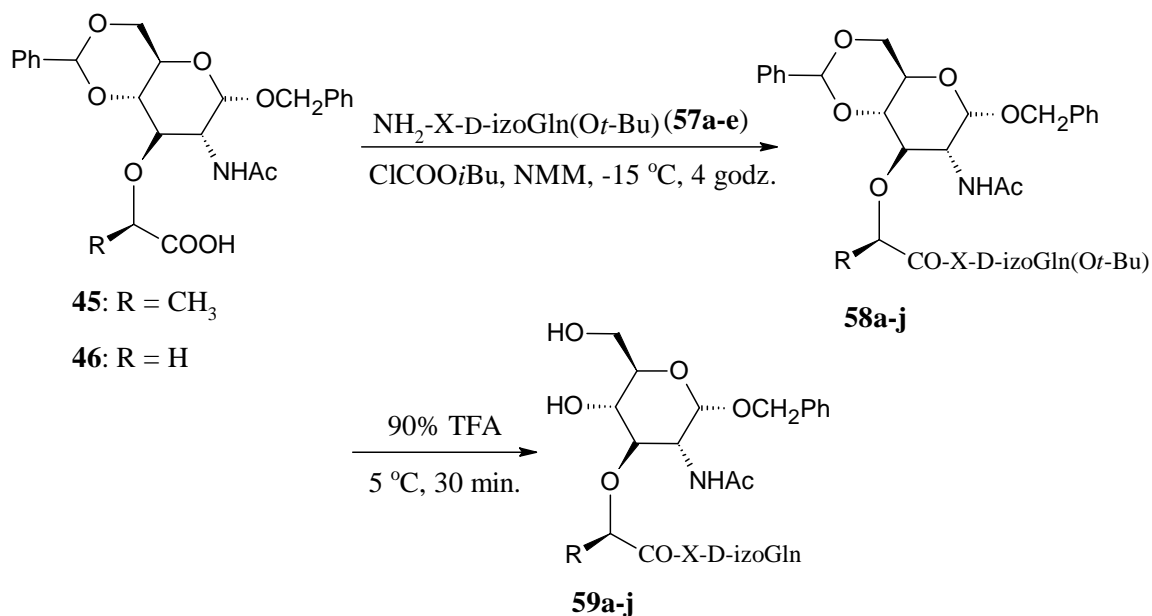


Schemat 4. Synteza chronionych dipeptydów metodą mieszanych bezwodników

4.1.1.4. Podstawione muramyldipeptydy i nor-muramyldipeptydy

Do syntezy podstawionych MDP i nor-MDP wykorzystano metodę mieszanych bezwodników [204].

Dipeptydy ze zdjętą osłoną benzyloksykarbonylową w wyniku katalitycznej wodorolizy łączono z podstawionym kwasem muraminowym (**45**) i nor-muraminowym (**46**) (Schemat 5). Do podstawionego Mur lub nor-Mur dodawano chloromrówczanu izobutyli w obecności NMM. Po około 3 min. otrzymany bezwodnik użyto w nadmiarze do acylowania dipeptydów (**57a-e**). Reakcja była prowadzona 4 godz. w temp. -15°C . Po tym czasie podwyższono temperaturę do 0°C i dodano 2,5 M roztworu KHCO_3 . Mieszaninę reakcyjną wylano do wody. Osad odsączono i oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej oraz preparatywnej na płytkach TLC w układach C-F. Strukturę związków potwierdzono na podstawie analizy widm $^1\text{H NMR}$. Małe stałe sprzężenia $J_{\text{H1,H2}} = 2,93\text{-}3,42\text{Hz}$ wskazują na formę α glikozydu.



- | | |
|---|------------------------------|
| a: R = CH ₃ ; X = D-Ala | f: R = H; X = D-Ala |
| b: R = CH ₃ ; X = D-2-ABA | g: R = H; X = D-2-ABA |
| c: R = CH ₃ ; X = D-Pro | h: R = H; X = D-Pro |
| d: R = CH ₃ ; X = D-Ser | i: R = H; X = D-Ser |
| e: R = CH ₃ ; X = D-Val | j: R = H; X = D-Val |

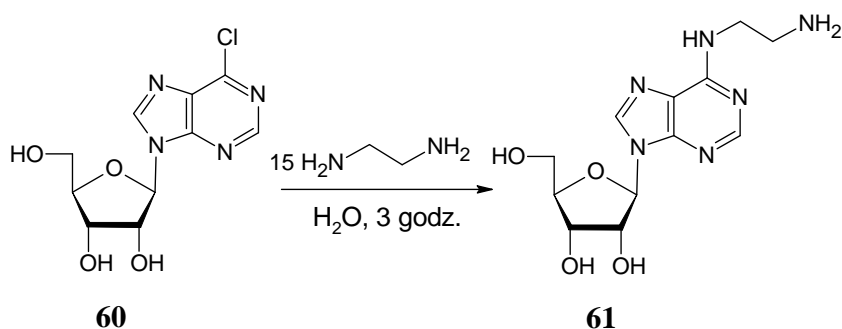
Schemat 5. Synteza podstawionych muramylodipeptydów i nor-muramylodipeptydów oraz usuwanie osłon *tert*-butylowej i benzyldenowej

4.1.1.5. Pochodne MDP i nor-MDP bez osłon *tert*-butylowej i benzyldenowej (59a-j)

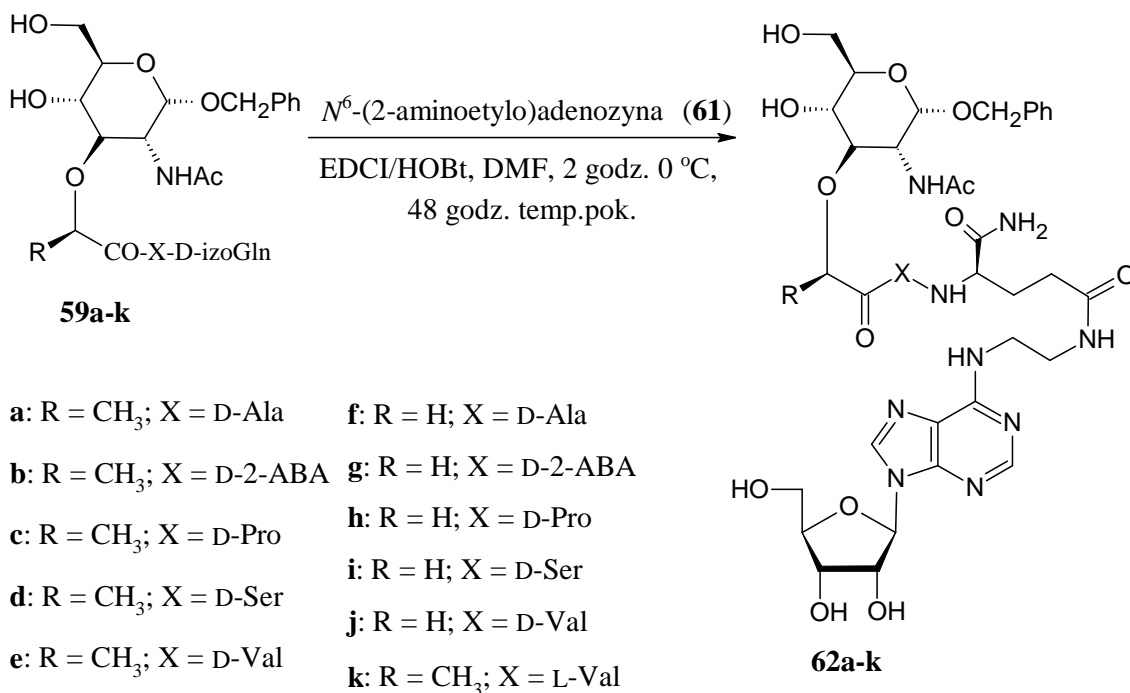
Do usunięcia osłony *tert*-butylowej i benzyldenowej z podstawionego MDP i nor-MDP użyto 90% kwasu trifluorooctowego (TFA) (Schemat 5). Roztwory związków w TFA wstawiono do lodówki (temp. 5°C) na okres ok. 30 min. W takich warunkach pozostaje nienaruszona osłona benzylova w części cukrowej. Wykazano, że jej obecność nie zmienia aktywności biologicznej pochodnych MDP [181, 205]. Zakończenie reakcji sprawdzono metodą TLC. TFA odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem a pozostałość przemyto 3-krotnie eterem. Po każdym przemyciu dekantowano eter, na końcu odsączono produkt w postaci osadu. Produkty oczyszczano za pomocą chromatografii preparatywnej na płytkach TLC w układzie G.

4.1.2. Koniugaty pochodnych MDP i nor-MDP z adenozyzną

Początkowo planowano otrzymanie koniugatów adenozyzny z pochodnymi MDP za pomocą odczynników kondensujących takich jak: EDCI, HBTU, DPPA czy NMM. Niestety, nie udało się uzyskać oczekiwanego produktu, prawdopodobnie ze względu na obniżony charakter zasadowy grupy aminowej adenozyzny, związany z delokalizacją elektronów do pierścienia aromatycznego. W związku z tym opracowano metodę syntezy, wykorzystując jako substrat rybozyd 6-chloropuryny (**60**), do którego przyłączono 1,2-diaminoetan (Schemat 6). Umożliwiło to utworzenie wiązania amidowego pomiędzy wolną grupą karboksylową pochodnej MDP i nor-MDP a reaktywnym ugrupowaniem aminowym N^6 -(2-aminoetylo)adenozyzny (**61**) (Schemat 7). Warto zaznaczyć, że użycie łącznika do połączenia dwóch cząsteczek jest powszechnie stosowaną metodą, a od jego długości często zależy aktywność biologiczna koniugatu [206, 207]. Jako odczynniki kondensujące wybrano EDCI oraz HBTU opierając się na wcześniejszych badaniach dotyczących syntezy koniugatów MDP z akrydynami [208]. Obie metody dały dobre rezultaty. Wydajność reakcji dla związku **62j** z zastosowaniem EDCI wyniosła 53% a z HBTU 43%. Do syntezy kolejnych koniugatów wykorzystano wydajniejszą metodę, stosując EDCI jako odczynnik kondensujący. Jako kontrolę wpływu D-aminokwasu na aktywność biologiczną pochodnych MDP zsyntezowano dodatkowo związek **62k** z L-walinalą. Strukturę otrzymanych związków potwierdzono na podstawie analizy widm ^1H NMR i MS, a także ^{13}C NMR dla związków **62d** i **62i**. Ze względu na skomplikowaną strukturę koniugatów dla związków **62a** oraz **62j** zrobiono dodatkowo widma 2D ^1H NMR ROESY oraz TOCSY (odpowiednio Załącznik 1, Załącznik 2).



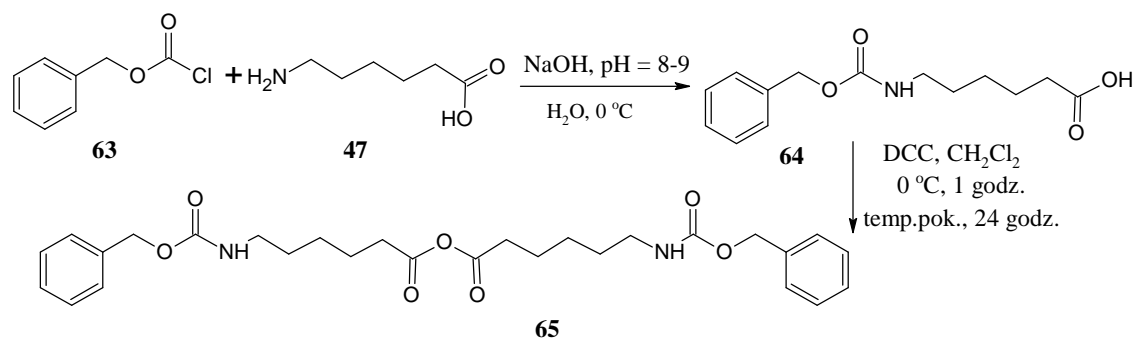
Schemat 6. Otrzymywanie N^6 -(2-aminoetylo)adenozyzny



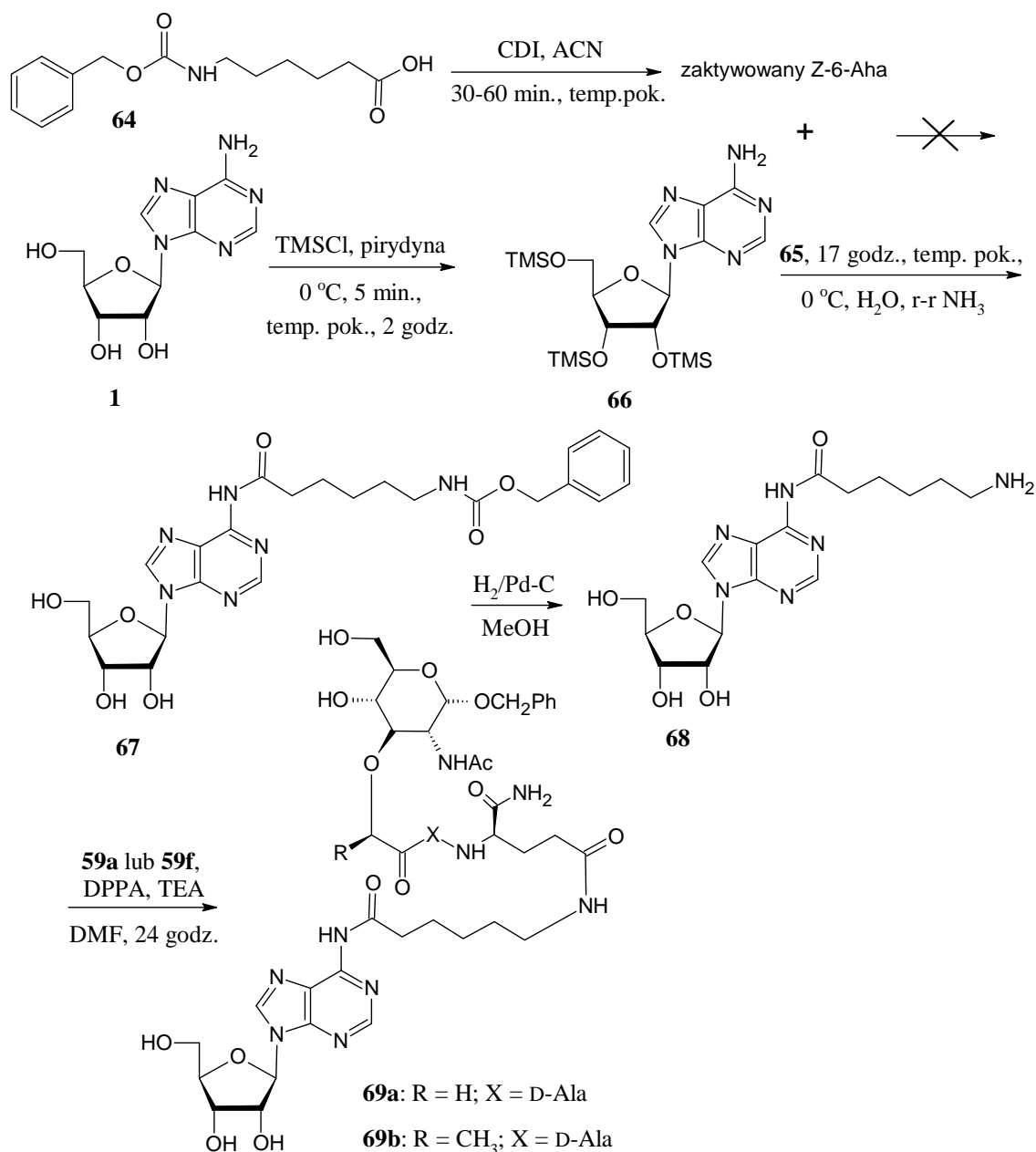
Schemat 7. Synteza koniugatów adenozyzny z pochodnymi MDP poprzez łącznik 2-aminoetylowy

W celu sprawdzenia wpływu łącznika na aktywność biologiczną koniugatów zsyntetyzowano dwa związki, w których adenozyne połączono z podstawionym MDP lub nor-MDP poprzez łącznik 6-aminoheksanoilowy (**47**). W pierwszym etapie założono osłonę Z na grupę aminową kwasu 6-amioheksanowego. Początkowo próbowano przyłączyć chroniony kwas za pomocą odczynnika kondensującego CDI do chronionej adenozyzny wg metody opisaną przez Sinhę [209]. Synteza obejmowała ochronę grup hydroksylowych adenozyzny nadmiarem TMSCl w pirydynie, a następnie reakcję nukleozydu z roztworem preaktywowanego *N*-acyloimidazolu w acetonitrylu. Ostatnim krokiem było zdjęcie osłon poprzez dodanie etanolu i wody. Niestety, mimo dodania DMF jako dodatkowego rozpuszczalnika chronionego kwasu czy podgrzaniu reakcji do 50°C nie uzyskano oczekiwanego produktu (Schemat 9). W związku z tym postanowiono zastosować inną strategię, polegającą na przyłączeniu bezwodnika do chronionego nukleozydu [210]. Z chronionego kwasu utworzono jego bezwodnik (**65**) (Schemat 8). Tak samo jak w pierwszej metodzie, kolejnym krokiem było założenie osłon trimetylosililowych na grupy hydroksylowe adenozyzny. Następnie chronioną adenozyne poddano reakcji z nadmiarem bezwodnika kwasu 6-aminoheksanowego (1:2,5) i przeprowadzono deprotekcję grup hydroksylowych. Z uzyskanego związku (**67**) zdjęto osłonę benzyloksykarbonylową za pomocą katalitycznej wodorolizy. Otrzymany związek **68** połączono wiązaniem amidowym z podstawionym MDP

lub nor-MDP stosując EDCI lub DPPA jako odczynnik kondensujący (Schemat 9). Metoda z zastosowaniem DPPA dała lepsze wydajności, ok. 58%. Strukturę otrzymanych związków **69a-b** potwierdzono na podstawie analizy widm ^1H NMR i MS.



Schemat 8. Synteza chronionego bezwodnika kwasu 6-aminoheksanowego



Schemat 9. Synteza koniugatów adenozyiny z pochodnymi MDP poprzez łącznik 6-aminoheksanoilowy

4.1.2.1 *N*⁶-(2-aminoetylo)adenozyina (61)

*N*⁶-(2-aminoetylo)adenozyinę (61) otrzymano według metody opisanej przez Brodeliusa [211].

Wykorzystując mechanizm podstawienia nukleofilowego przyłączono 1,2-diaminoetan do rybozydu 6-chloropuryny (60). Aminę dodano w 15-krotnym nadmiarze, aby zapobiec tworzeniu się dimerów. Roztwór wodny obu związków mieszano przez 3 godz.

w temp. pokojowej. Po tym czasie odsączono wytrącony osad, przemyto etanolem i wodą destylowaną w celu pozbycia się niezmienionej aminy. Do celów analitycznych oczyszczono część produktu za pomocą chromatografii preparatywnej na płytkach TLC w układzie H. Pozostała ilość użyto bez dalszego oczyszczania do kolejnych reakcji. Strukturę związku potwierdzono na podstawie analizy widm ^1H NMR i MS.

4.1.2.2. Koniugaty podstawionych MDP i nor-MDP z adenozyną poprzez łącznik aminoetylowy

Do ochłodzonego do 0°C roztworu podstawionego MDP lub nor-MDP (**59a-k**) w bezwodnym DMF dodano chlorowodoru EDCI oraz HOBt. Po 30 min. mieszania w temp. pok. ochłodzono roztwór ponownie do 0°C i dodano roztwór N^6 -(2-aminoetylo)adenozyny (**61**) w bezwodnym DMF. Stosunek pochodnych MDP lub nor-MDP (**59a-k**) do N^6 -(2-aminoetylo)adenozyny (**61**) wynosił 1:1. Syntezę prowadziłam kontrolując przebieg za pomocą TLC. Po stwierdzeniu braku dalszego postępu reakcji po 48 godz. rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a powstały olej zawieszono w chloroformie z dodatkiem metanolu. Produkt oczyszczano stosując ekstrakcję do fazy stałej (SPE) w układzie faz normalnych. Otrzymaną zawiesinę naniesiono na kolumnę SPE. Po zaadsorbowaniu zawiesiny eluowałam chloroformem a następnie chloroformem z dodatkiem metanolu. Produkty (**62a-k**) doczyszczalam na płytkach TLC w układzie I. Wydajności reakcji wynosiły 27-58%. Strukturę związku potwierdzono na podstawie analizy widm ^1H NMR i MS.

4.1.2.3. Kwas Z-6-aminoheksanowy (64)

Chroniony kwas 6-aminoheksanowy otrzymano wg procedury dla Z-D-Glu (**49**), opisanej w punkcie 4.1.1.2.1.

4.1.2.4. Bezwodnik kwasu Z-6-aminoheksanowego (65)

Kwas Z-6-Aha (**64**) rozpuszczono w bezwodnym dichlorometanie i wstawiono do łaźni lodowej do ochłodzenia. Do mieszanego roztworu wkrapłano ochłodzony roztwór DCC w bezwodnym dichlorometanie. Po około 5 min. z roztworu zaczął wytrącać się dicykloheksylomocznik. Kiedy skończono dodawać DCC pozostawiono mieszaninę reakcyjną do powolnego ogrzania się do temp. pok., mieszano całą noc. Mieszaninę przesączono uzyskując bezwodnik w postaci białego osadu z wydajnością 95% [212].

4.1.2.5. *N*⁶-Z-(6-aminoheksanoilo)adenozyna (67)

W pierwszym etapie ochroniono funkcje 2', 3' i 5' hydroksylowe adenozyne grupami trimetylosilylowymi. Adenozyne (1) rozpuszczono w bezwodnej pirydynie i dodano powoli TMSCl w temp. 0°C ciągle mieszając, następnie mieszano przez 2 godz. w temp. pok. Wydzielający się w trakcie reakcji HCl neutralizowany jest przez zasadę – pirydynę. Reakcję prowadzono z zachowaniem warunków bezwodnych, w atmosferze azotu. Kolejnym krokiem było dodanie bezwodnika Z-6-Aha (65) w temp. 0°C. Po 17 godz. uwolniono grupy hydroksylowe poprzez dodanie wody i stężonego amoniaku do osiągnięcia pH = 8. Odsączono powstały osad a rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Dodano acetonitrylu i ponownie odsączono powstały osad. Przesącz odparowano i związek krystalizowano z chloroformu z dodatkiem metanolu. Do celów analitycznych oczyszczono część produktu za pomocą chromatografii preparatywnej na płytkach TLC w układzie A. Otrzymano biały osad *N*⁶-Z-(6-aminoheksylokarbonylo)adenozyny (67) z wydajnością 80%.

4.1.2.6. *N*⁶-(6-aminoheksanoilo)adenozyna (68)

Ze związku (67) zdjęto osłonę benzyloksykarbonylową poprzez katalityczną wodorolizę, otrzymując *N*⁶-(6-aminoheksylokarbonylo)adenozynę (68).

4.1.2.7. Koniugaty podstawionych MDP i nor-MDP z adenozyną poprzez łącznik 6-aminoheksanoilowy (69a-b)

Do ochłodzonego do 0°C roztworu podstawionego MDP lub nor-MDP (59a, 59f) oraz *N*⁶-(6-aminoheksylokarbonylo)adenozyny (68) (stosunek 1:1,1) w bezwodnym DMF dodano DPPA oraz TEA. Syntezę prowadziłam kontrolując przebieg za pomocą TLC. Po stwierdzeniu braku dalszego postępu reakcji po 48 godz. rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a powstały olej zawieszono w wodzie. Produkt oczyszczano stosując ekstrakcję do fazy stałej (SPE) w układzie faz odwróconych. Otrzymaną zawiesinę naniesiono na kolumnę SPE. Po zaadsorbowaniu zawiesiny eluowano początkowo wodą z dodatkiem 0,1% TFA, do których następnie dodawano stopniowo ACN. Produkty (69a-b) doczyszczano na płytkach TLC w układzie J. Wydajności reakcji wynosiły 55-58%. Strukturę związku potwierdzono na podstawie analizy widm ¹H NMR i MS.

4.2. Badania biologiczne

Pierwszym etapem badania potencjalnych leków są testy *in vitro*, które służą określeniu ich wpływu na żywotność i proliferację komórek. Testy żywotności opierają się na wykrywaniu integralności błony komórkowej czy mierzeniu aktywności metabolicznej komórek [213]. Integralność błony komórkowej można wykryć m.in. dzięki błękitowi trypanu, który barwi tylko martwe komórki lub dzięki barwnikom fluorescencyjnym, m.in. bromkowi etydyny (EtBr) i jodkowi propydyny (PI). EtBr oraz PI przechodzą przez uszkodzoną błonę i akumulują się w martwych komórkach poprzez specyficzne wiązanie z DNA. Utrata integralności błony prowadzi również do wycieku enzymu dehydrogenazy mleczanowej, czego efekty można zmierzyć spektrofotometrycznie. Metody kolorymetryczne służą do pomiaru aktywności metabolicznej. Najczęściej stosowanymi odczynnikami są MTT (bromek 3-[4,5-dimetylotiazolo-2-ilo]-2,5-difenylo-tetrazoliowy) oraz XTT (sól sodowa 2,3-bis[2-metoksy-4-nitro-5-sulfofenilo]-2H-tetrazolio-5-karboksyanilidu), które pod wpływem enzymów są redukowane do barwnych formazanów [214, 215]. Testy określające stopień proliferacji komórek opierają się na wbudowywaniu w trakcie S-fazy podziału komórkowego do puli DNA znakowanych izotopowo prekursorów, takich jak [³H]-tymidyny lub nie promieniotwórczej 5-bromo-2-deoksyurydyny (BrdU) [216].

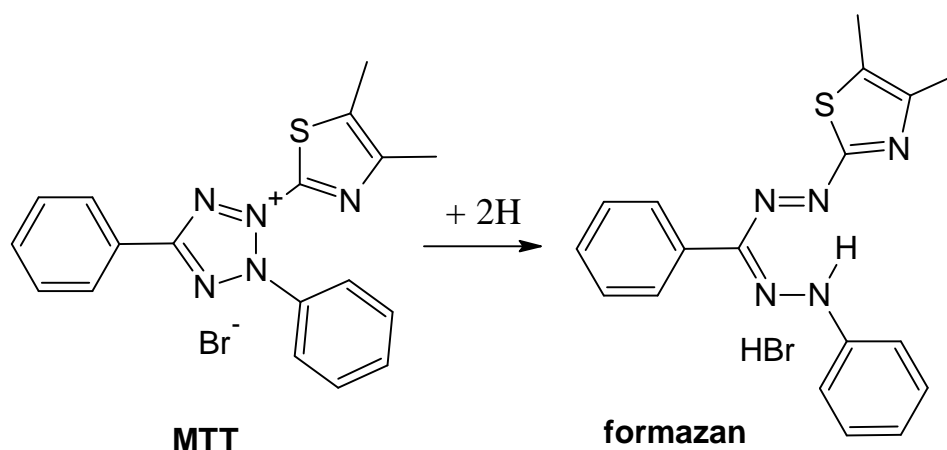
Badanie właściwości immunosupresyjnych zsyntetyzowanych związków przeprowadzono na linii komórkowej Jurkat czyli modelu ostrej, ludzkiej białaczki komórek T oraz na linii białaczki limfoblastycznej L1210 pochodzenia mysiego. Ponadto, przeprowadzono badania na mononuklearnych komórkach krwi obwodowej (PBMC) pobranych i wyizolowanych od zdrowych ochotników, które były aktywowane monoklonalnymi przeciwciałami anti-CD3 i anti-CD28. Do oceny wpływu związków na żywotność komórek wybrano test kolorymetryczny MTT a do oceny stopnia zahamowania proliferacji komórek test inkorporacji tymidyny znakowanej trytem ([³H]TdR).

Wszystkie testy przeprowadzono w trzykrotnych powtórzeniach. Związki rozpuszczono w DMSO i przygotowano seryjne rozcieńczenia roztworów. Sprawdzono wpływ na żywotność komórek oraz aktywność antyproliferacyjną wszystkich zsyntetyzowanych koniugatów, połączonych zarówno przez łącznik aminoetylowy (**62a-j**) i 6-aminoheksanoilowy (**69a-b**). Aby ocenić wpływ D-aminokwasów na aktywność koniugatów zbadano także związek **62k**, zawierający w strukturze MDP L-walinę. Przygotowano również rozcieńczenia adenozyiny (**1**) oraz pochodnych MDP(D,D) i

nor-MDP(D,D). Ze względu na słabą rozpuszczalność pochodnych, ograniczono się do związków **59e**, **59f**, **59i**, **59j**. W celu zbadania wpływu osłony benzylowej na aktywność MDP przeprowadzono testy na MDP(D,D) (**70**). Zrobiono również odpowiednie rozcieńczenia rozpuszczalnika w celu sprawdzenia jego wpływu na komórki.

4.2.1. Analiza przeżywalności komórek testem kolorymetrycznym MTT

W celu określenia cytotoksyczności pochodnych MDP(D,D) i nor-MDP(D,D) oraz ich koniugatów z adenozyzną przeprowadzono test z użyciem odczynnika MTT. Jest to powszechnie stosowany test do określenia żywotności komórek i opiera się na reakcji redukcji MTT do fioletowego formazanu (Schemat 10). MTT jest solą tetrazolową rozpuszczalną w wodzie, która dzięki dodatniemu ładunkowi z łatwością przenika do wnętrza komórki. Tam, w metabolicznie aktywnych komórkach, dzięki działaniu enzymów redukujących, powstaje nierozpuszczalny w wodzie formazan [215].



Schemat 10. Struktura chemiczna MTT i jego zredukowanej formy formazanu

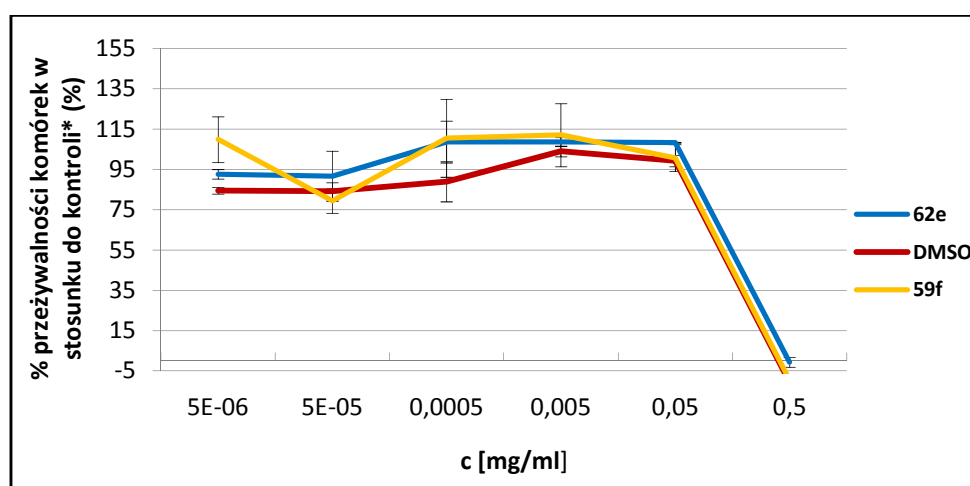
Przez długi czas uważano, że głównym enzymem redukującym MTT jest dehydrogenaza bursztynianowa znajdująca się w mitochondriach. Jednak najnowsze badania pokazują, że przemiana ta związana jest raczej z produkcją NADH w efekcie glikolizy a nie oddychania wewnątrzkomórkowego. Dlatego też przyjmuje się, że MTT jest redukowany przede wszystkim dzięki aktywności enzymatycznej retikulum endoplazmatycznego, w mniejszym stopniu dzięki produkcji NADH w mitochondriach, endosomach/lizosomach i błonie komórkowej. Niedogodnością testu jest konieczność rozpuszczenia wytrąconych kryształów formazanu rozpuszczalnikiem organicznym [217, 218]. Intensywność zabarwienia mierzona jest spektrofotometrycznie i jest wprost proporcjonalna do aktywności metabolicznej

komórki. Zaletą tej metody jest możliwość przeprowadzenia pomiaru dużej liczby próbek i niskie koszty badania.

4.2.1.1. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej otrzymanych związków wobec linii

Jurkat

Badane związki nie wpływały na żywotność komórek linii Jurkat w badanych stężeniach. Analiza stężeń powyżej 0,05 mg/ml była niemożliwa ze względu na wpływ rozpuszczalnika DMSO na żywotność komórek (Wykres 1). W stężeniu 0,05 mg/ml i mniejszych procent żywych komórek wahał się w zakresie 75-120% w stosunku do komórek kontrolnych.



Wykres 1. Krzywe zależności przeżywalności komórek dla związków **59f** oraz **62e** w porównaniu do DMSO wobec linii Jurkat. Wyniki zaprezentowane jako średnia \pm SD.

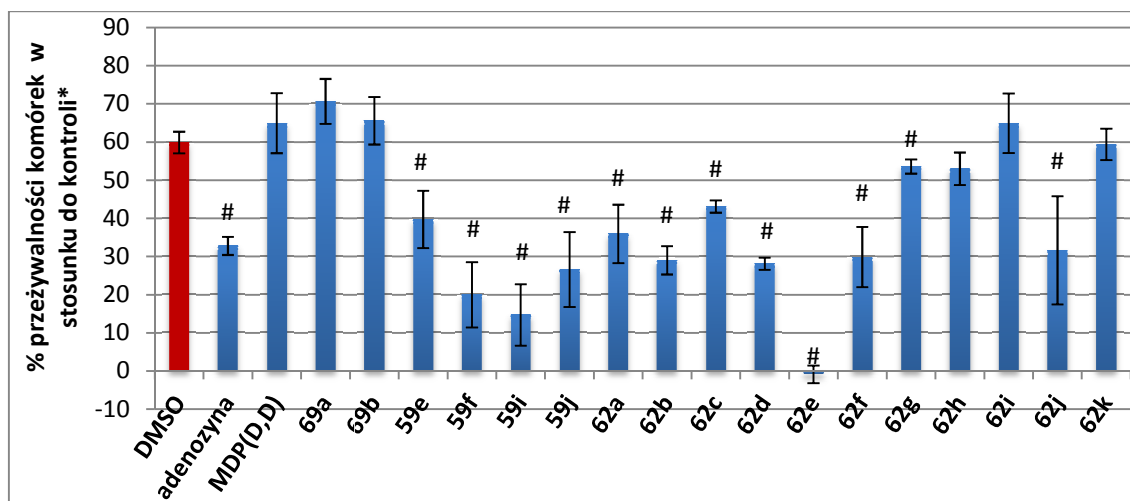
* kontrolą traktowaną jako 100% były komórki hodowane w czystej pożywce

4.2.1.2. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej otrzymanych związków wobec linii

L1210

Część związków wykazała aktywność cytotoksyczną w najwyższym badanym stężeniu w stosunku do komórek linii mysiej białaczki limfoblastycznej L1210 (Wykres 2). Poziom przeżywalności komórek po dodaniu 10% DMSO wynosił 60%. Koniugaty adenozyiny z pochodnymi MDP(D,D) i nor-MDP(D,D) połączonymi przez łącznik 6-aminoheksanoilowy (**69a-b**), koniugat **62i** oraz MDP(D,D) **70** zwiększały żywotność w porównaniu do rozpuszczalnika. Linia komórkowa L1210 była najbardziej wrażliwa na

działanie koniugatu **62e** ($IC_{50} = 0,145 \pm 0,018$ mg/ml (0,161 mM) oraz pochodnej nor-MDP **59j** ($IC_{50} = 0,101 \pm 0,020$ mg/ml (0,17 mM)) (Tabela 1).

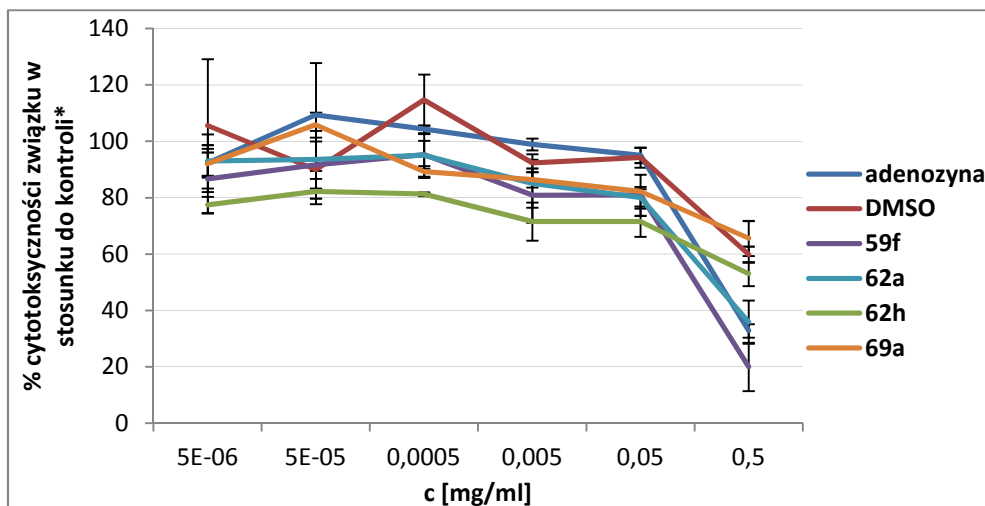


Wykres 2. Wpływ badanych związków na żywotność komórek linii L1210. Słupki przedstawiają średnie wartości potrójnego testu \pm SD. Pochodna **59j** $c = 0,215$ mg/ml, **59e**: $c = 0,25$ mg/ml, pozostałe związki $c = 0,5$ mg/ml, DMSO: 10% roztwór.

- istnieje statystyczna różnica ($P < 0,05$) w porównaniu do komórek traktowanych DMSO.

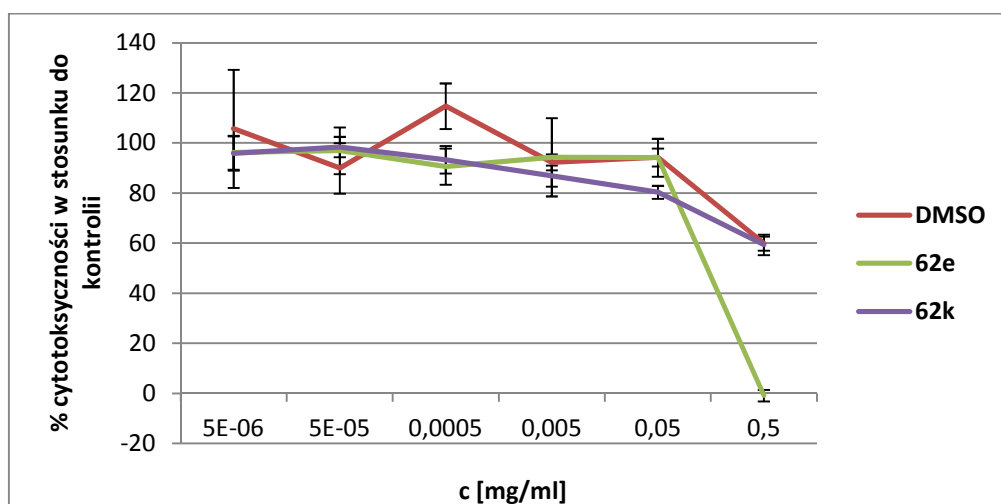
* kontrolą traktowaną jako 100% były komórki hodowane w czystej pożywce

Aktywność cytotoksyczna związków: **59e**, **59f**, **59i**, **59j**, koniugatów **62a-g**, **62j** oraz adenozyiny różniła się istotnie ($P < 0,05$) od aktywności DMSO. Koniugat adenozyiny z pochodną MDP zawierającą D-Val (**62e**) w zakresie stężeń $5 \times 10^{-1} - 5 \times 10^{-6}$ mg/ml posiadał niską aktywność cytotoksyczną, ale przy stężeniu 0,5 mg/ml hamował całkowicie żywotność komórek. Aktywność cytotoksyczna jego analogu, koniugatu zawierającego L-walinę (**62k**), rosła stopniowo w całym zakresie stężeń i nie przekroczyła wartości 60% dla $c = 0,5$ mg/ml, tym samym nie różniąc się istotnie od wartości kontrolnej rozpuszczalnika ($P > 0,05$ (Wykres 4).



Wykres 3. Krzywe zależności przeżywalności komórek od stężenia dla wybranych związków wobec linii L1210 (test MTT).

* kontrolą traktowaną jako 100% były komórki hodowane w czystej pożywce



Wykres 4. Krzywe zależności przeżywalności komórek od stężenia dla wybranych związków wobec linii L1210 (test MTT).

* kontrolą traktowaną jako 100% były komórki hodowane w czystej pożywce

Porównując wartości IC_{50} koniugatów z wolnymi pochodnymi MDP(D,D) i nor-MDP(D,D) można stwierdzić, że nie ma znaczących różnic w ich aktywności cytotoksycznej. W przypadku związków **59e**, **62e** wartości IC_{50} mają ten sam rząd wielkości, przy czym koniugat w większym stopniu hamuje żywotność komórek. Odwrotna zależność jest dla związków **59j** i **62j**. Nie ma istotnej różnicy w aktywności koniugatu **62f** oraz pochodnej **59f**. Wyjątek

stanowi koniugat **62i**, który w małym stopniu hamuje żywotność komórek w przeciwieństwie do pochodnej **59i**. Adenozyna wykazała aktywność cytotoksyczną przy stężeniu 0,991 mM.

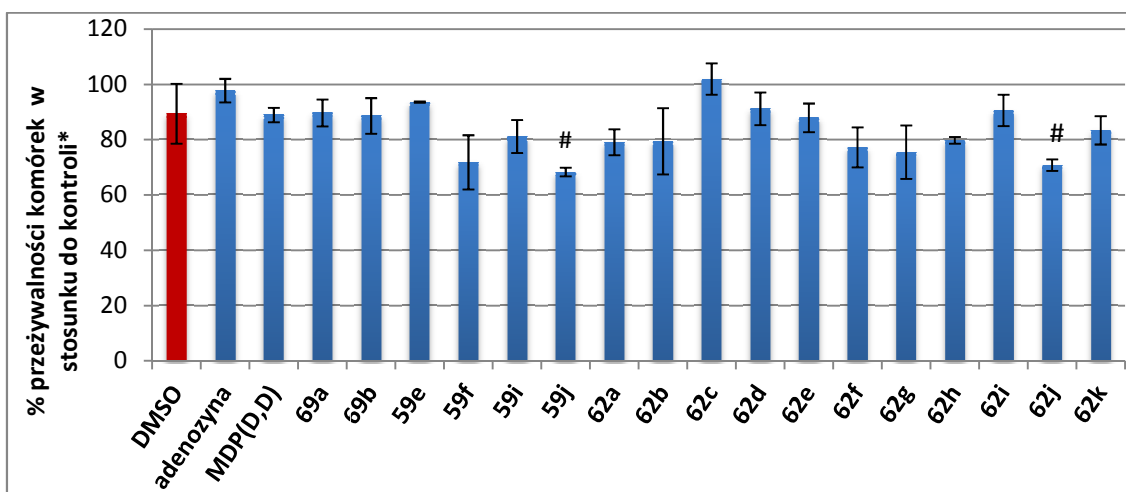
Tabela 1. Wartości IC₅₀ obliczone na podstawie testu MTT dla PBMC oraz dla linii L1210 (mg/ml; średnia ± SD). * związek w stężeniu 0,5 mg/ml hamował żywotność < 50% komórek; ** związek w stężeniu 0,5 mg/ml zwiększał żywotność komórek w porównaniu z DMSO; kolorem szarym wyróżniono związki najbardziej aktywne;

Nr związku	IC ₅₀ (mg/ml)	
	L1210	PBMC B
59e	0,162 ± 0,057 (0,266 mM)	0,149 ± 0,005 (0,244 mM)
59f	0,163 ± 0,028 (0,287 mM)	0,190 ± 0,029 (0,335 mM)
59i	0,183 ± 0,033 (0,314 mM)	0,5* (0,858 mM)
59j	0,101 ± 0,020 (0,170 mM)	0,215* (0,361 mM)
62a	0,251 ± 0,067 (0,287 mM)	0,341 ± 0,016 (0,389 mM)
62b	0,196 ± 0,017 (0,220 mM)	0,390 ± 0,091 (0,439 mM)
62c	0,280 ± 0,050 (0,311 mM)	0,244 ± 0,022 (0,271 mM)
62d	0,195 ± 0,013 (0,218 mM)	0,289 ± 0,026 (0,324 mM)
62e	0,145 ± 0,018 (0,161 mM)	0,212 ± 0,046 (0,234 mM)
62f	0,232 ± 0,046 (0,270 mM)	0,257 ± 0,032 (0,298 mM)
62g	0,5* (0,571 mM)	0,408 ± 0,059 (0,466 mM)
62h	0,5* (0,562 mM)	0,249 ± 0,040 (0,280 mM)
62i	0,5** (0,570 mM)	0,420 ± 0,025 (0,479 mM)
62j	0,254 ± 0,127 (0,285 mM)	0,5* (0,561 mM)
62k	0,5* (0,555 mM)	0,5* (0,555 mM)
69a	0,5** (0,537 mM)	0,5* (0,537 mM)
69b	0,5** (0,529 mM)	0,5* (0,529 mM)
Adenozyna	0,265 ± 0,017 (0,991 mM)	0,5* (1,867 mM)
MDP(D,D)	0,5** (1,015 mM)	0,5* (1,015 mM)

4.2.1.3. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej otrzymanych związków wobec PBMC

W przypadku badania aktywności immunosupresyjnej, konieczne jest przeprowadzenie badań na komórkach docelowych, jakimi są pobudzone ludzkie limfocyty. Limfocyty uzyskano z kożucha leukocyтарно-пłytkowego pochodzącego od dawców z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Gdańsku (RCKiK). Z kożucha

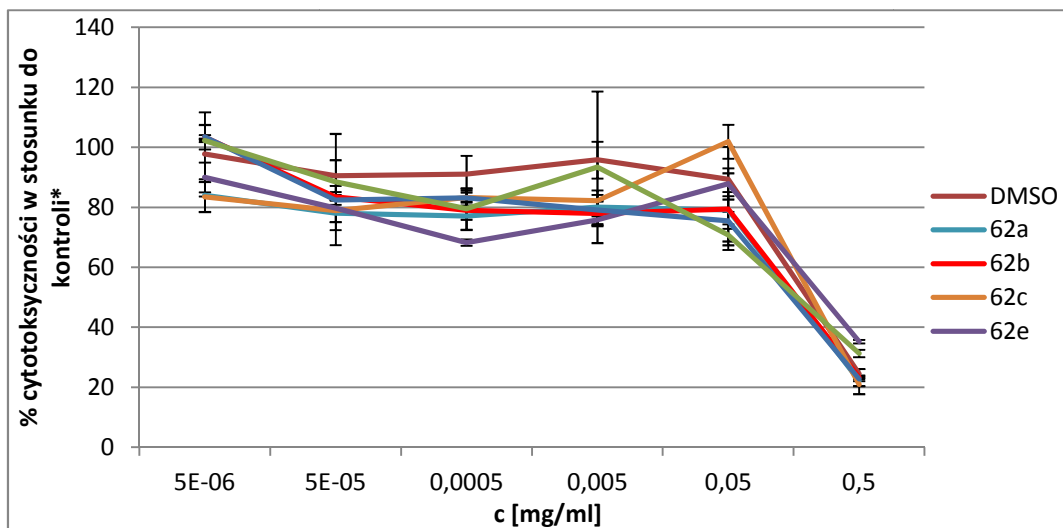
wyzolowano PBMC, które aktywowano sztucznymi komórkami prezentującymi antygen (plastikowe kulki opłaszczone monoklonalnymi przeciwciałami anti-CD3 i anti-CD28). Ze względu na różnice osobnicze test MTT wykonany był na próbkach krwi od 2 różnych osób (PBMC A i B). Wpływ na hamowanie żywotności PBMC A w najwyższym stężeniu miał rozpuszczalnik. Zarówno dla DMSO, pochodnych **59e**, **59f**, **59i**, **59j** jak i koniugatów **62a-j** procent przeżywalności komórek w stosunku do kontroli był na poziomie ok. 20%. Różnica widoczna była w przypadku adenozyiny, oraz koniugatów **62k** i **69a-b**, dla których przeżywalność komórek była odpowiednio na poziomie 40%, 80% i 85%. Dla pochodnej **59j** ($c = 0,021$ mg/ml) oraz koniugatu **62j** ($c = 0,05$ mg/ml) istniała istotnie statystycznie różnica w aktywności cytotoksycznej w porównaniu do DMSO ($P < 0,05$) (Wykres 5). W przypadku niektórych koniugatów można było stwierdzić słabą aktywność cytotoksyczną w zakresie stężeń 5×10^{-6} - 5×10^{-2} (Wykres 6). Ze względu na brak istotnych różnic pomiędzy DMSO a badanymi związkami w przebiegu krzywej bądź bardzo niskiej aktywności cytotoksycznej niektórych pochodnych nie podano wartości IC_{50} .



Wykres 5. Wpływ badanych związków na żywotność PBMC próbki A. Słupki przedstawiają średnie wartości potrójnego testu \pm SD. Pochodna **59j** $c = 0,021$ mg/ml, **59e**: $c = 0,025$ mg/ml, pozostałe związki $c = 0,05$ mg/ml, DMSO: 1% roztwór.

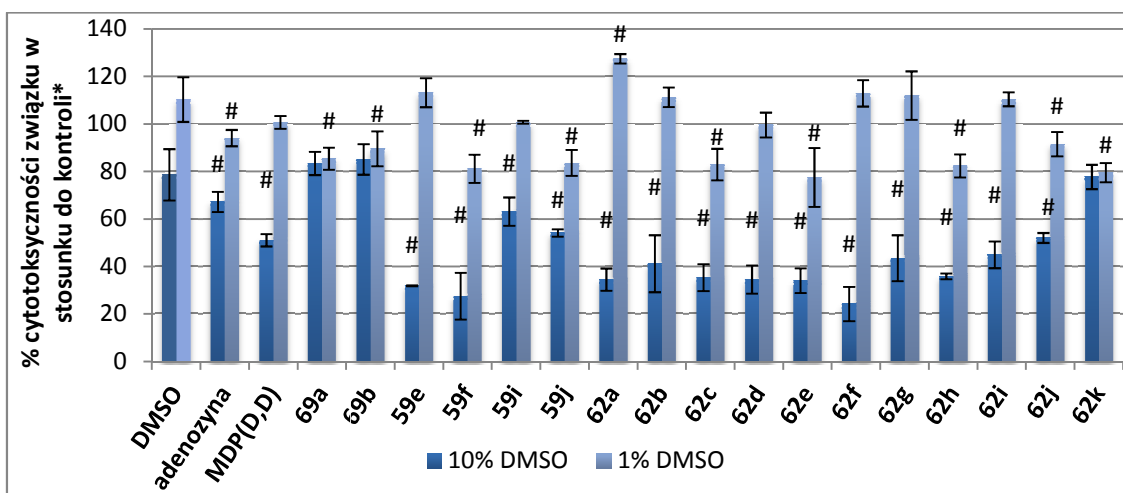
- istnieje statystyczna różnica ($P < 0,05$) w porównaniu do komórek traktowanych DMSO.

* kontrolą traktowaną jako 100% były komórki hodowane w czystej pożywce



Wykres 6. Krzywe zależności przeżywalności komórek od stężenia dla wybranych związków wobec PBMC A (test MTT).

* kontrolą traktowaną jako 100% były komórki hodowane w czystej pożywce

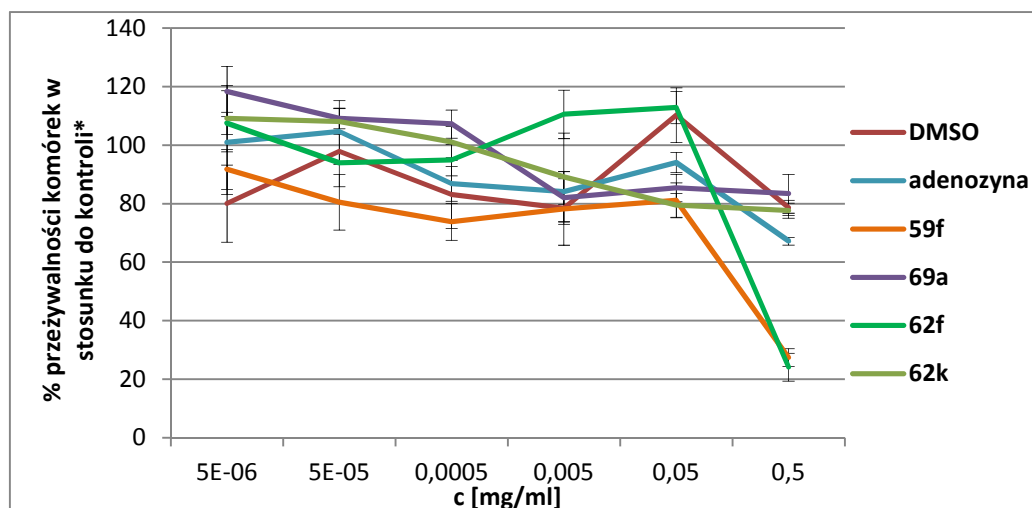


Wykres 7. Wpływ badanych związków na żywotność PBMC B. Słupki przedstawiają średnie wartości potrójnego testu \pm SD. 10% roztwór DMSO: pochodna **59j** $c = 0,215$ mg/ml, **59e**: $c = 0,25$ mg/ml, pozostałe związki $c = 0,5$ mg/ml, 1% roztwór DMSO: pochodna **59j** $c = 0,021$ mg/ml, **59e**: $c = 0,025$ mg/ml, pozostałe związki $c = 0,05$ mg/ml.

- istnieje statystyczna różnica ($P < 0.05$) w porównaniu do komórek traktowanych DMSO.

* kontrolą traktowaną jako 100% były komórki hodowane w czystej pożywce

Wobec PBMC B wartości IC_{50} koniugatów **62a-i** znajdowały się w zakresie 0,212 – 0,420 mg/ml (Tabela 1). Podobnie jak dla PBMC A, koniugaty połączone poprzez łącznik 6-aminoheksanoilowy **69a-b**, koniugat **62k** oraz adenozyzna wykazały bardzo słabą aktywność cytotoksyczną. Najbardziej aktywnymi związkami była pochodna MDP(D,D) **59e** ($IC_{50} = 0,212 \pm 0,046$ (0,244 mM)) oraz koniugat **62e** ($IC_{50} = 0,150 \pm 0,005$ (0,234 mM)).



Wykres 8. Krzywe zależności przeżywalności komórek od stężenia dla wybranych związków wobec PBMC B (test MTT).

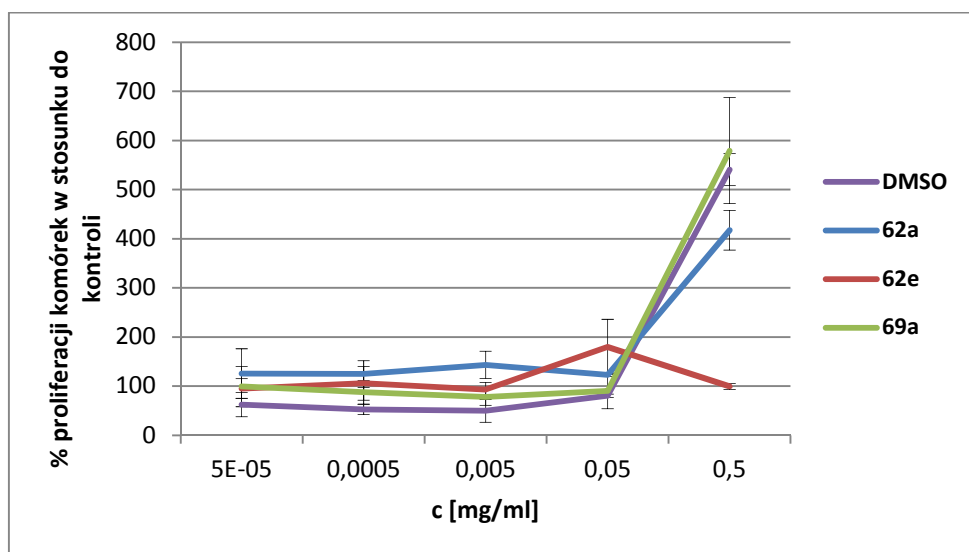
* kontrolą traktowaną jako 100% były komórki hodowane w czystej pożywce

4.2.2. Ocena aktywności antyproliferacyjnej związków testem inkorporacji [³H]TdR

Aktywność antyproliferacyjną pochodnych MDP(D,D) i nor-MDP(D,D) oraz ich koniugatów z adenozyzną oceniono na podstawie wyników testu inkorporacji tymidyny znakowanej trytem. Metoda ta polega na inkubacji komórek traktowanych badanym związkiem przez 72 godz. i dodaniu na ostatnie 18 godz. [³H]TdR. W tym czasie [³H]TdR wbudowuje się do DNA proliferujących komórek. Na koniec eksperymentu zbiera się komórki na filtr i mierzy się promieniowanie β za pomocą spektrometru scyntylicyjnego. Wyniki otrzymujemy jako zależność radioaktywności (w jednostkach CPM) od stężenia związku. Wadą tej metody jest wpływ promieniowania β na komórki, mogący się objawiać m.in. we fragmentacji DNA, zatrzymaniu cyklu komórkowego, abberacjach chromosomowych oraz indukcji apoptozy zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo* [219].

4.2.2.1. Oznaczanie aktywności antyproliferacyjnej otrzymanych związków wobec linii Jurkat

Wobec linii komórkowej Jurkat wszystkie badane koniugaty oraz pochodne MDP(D,D) i nor-MDP(D,D) nie wykazały aktywności antyproliferacyjnej. Analiza stężeń powyżej 0,05 mg/ml była niemożliwa ze względu na wpływ rozpuszczalnika DMSO na proliferację. DMSO w niższych stężeniach hamowało, a przy $c = 10\%$ indukowało proliferację komórek linii Jurkat. Badane związki nie wpływały na proliferację komórek bądź ją stymulowały (Wykres 9).



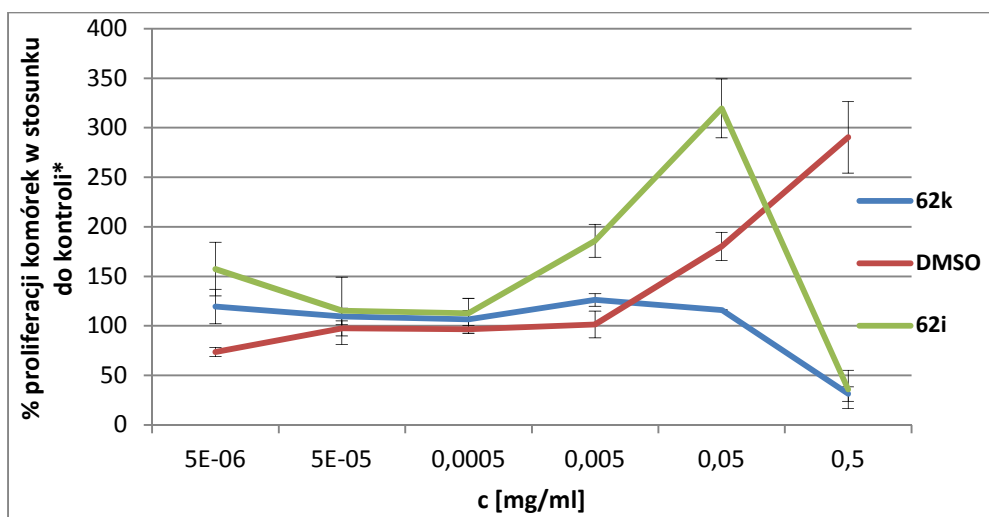
Wykres 9. Przykładowe krzywe zależności zahamowania stopnia proliferacji komórek w porównaniu do DMSO w zależności od stężenia wobec linii Jurkat (metoda inkorporacji [^3H]TdR).

* kontrolą traktowaną jako 100% były komórki hodowane w czystej pożywce

4.2.2.2. Oznaczanie aktywności antyproliferacyjnej otrzymanych związków wobec linii L1210 oraz ocena ich selektywności

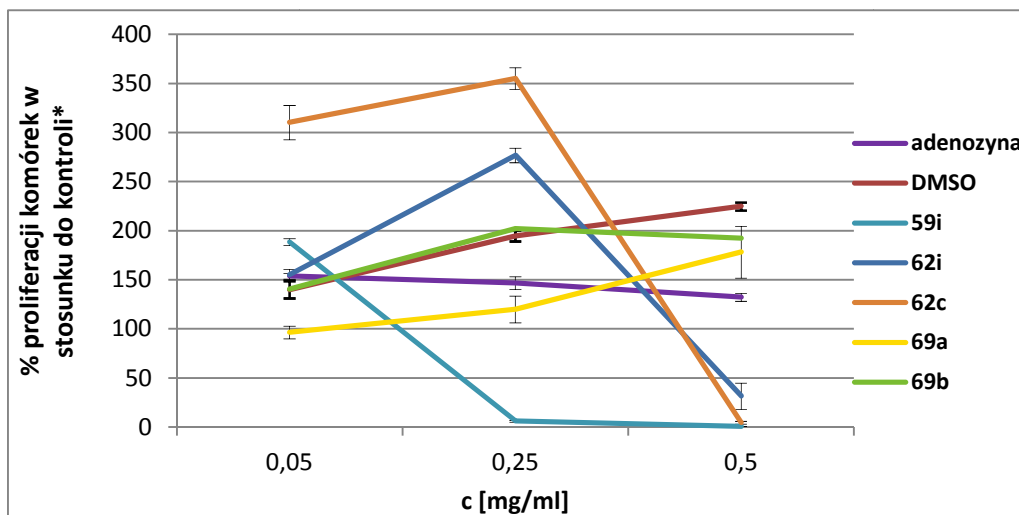
Wszystkie koniugaty połączone poprzez łącznik aminoetylowy (**62a-k**) oraz pochodne **59e**, **59f**, **59i**, **59j** wykazały aktywność antyproliferacyjną wobec linii L1210 w najwyższym badanym stężeniu. Związki w najniższych stężeniach nie hamowały proliferacji komórek, a przy $c = 0,05$ mg/ml (0,021 mg/ml dla **59j**; 0,025 mg/ml dla **59e**) gwałtownie rósł procent proliferujących komórek (Wykres 10). W celu dokładniejszego obliczenia wartości EC_{50} przeprowadzono dodatkowy test z poszerzonym zakresem stężeń. W Tabeli 2 podane są wyliczone wartości EC_{50} . Wyniki pokazały, że wszystkie koniugaty są aktywne tylko przy $c =$

0,5 mg/ml, podczas gdy pochodne **59f**, **59i** przy $c = 0,25$ mg/ml, **59j** przy $c = 0,105$ mg/ml oraz **59e** przy $c = 0,125$ mg/ml (Wykres 11). Adenozyna, koniugat **69a-b** oraz MDP(D,D) wykazały brak aktywności wobec tej linii. Najniższą wartością EC_{50} ($0,398 \pm 0,0125$ mg/ml ($0,446$ mM)) charakteryzował się koniugat **62b**. Koniugaty charakteryzowały się wyższymi wartościami EC_{50} ($0,446 - 0,541$ mM) niż pochodne MDP(D,D) i nor-MDP(D,D) ($0,193 - 0,363$ mM). Koniugat **62k**, zawierający w strukturze MDP L-Val, nie powodował nagłego wzrostu proliferacji komórek przy stężeniu $0,05$ mg/ml, dlatego też obliczona dla niego wartość EC_{50} jest relatywnie niska ($0,292$ mM), mimo że w mniejszym stopniu hamował proliferację w stężeniu $0,5$ mg/ml niż np. **62c**, o wyższym EC_{50} . W związku z tym wydaje się, że bardziej miarodajne od porównania wartości EC_{50} jest porównanie aktywności antyproliferacyjnej koniugatów dla $c = 0,5$ mg/ml, przedstawione na Wykresie 12 oraz w Tabeli 2.



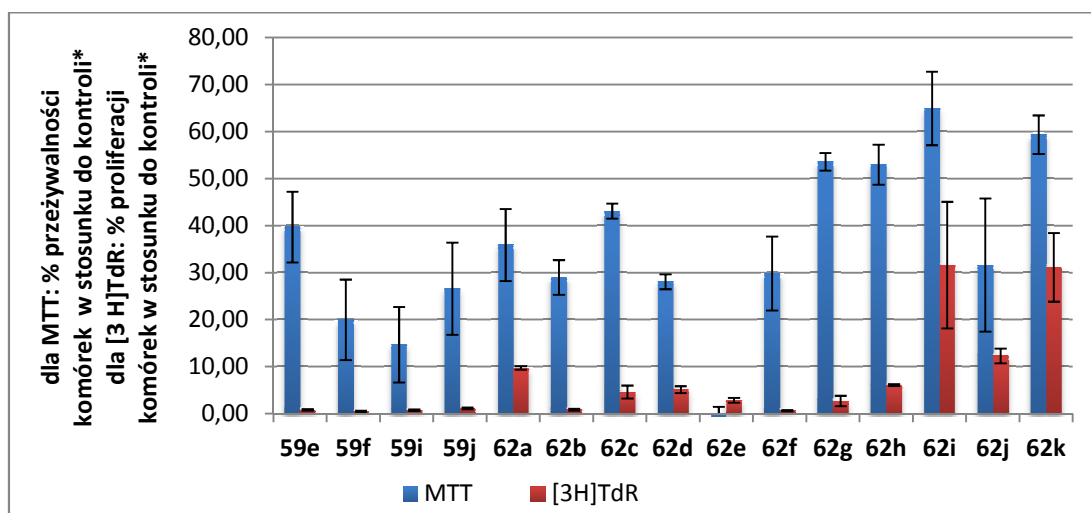
Wykres 10. Krzywa zależności zahamowania stopnia proliferacji komórek dla związków **62i** oraz **62k** w porównaniu do DMSO w zależności od stężenia wobec linii L1210 (metoda inkorporacji [3 H]TdR).

* kontrolą traktowaną jako 100% były komórki hodowane w czystej pożywce



Wykres 11. Przykładowe krzywe zależności zahamowania stopnia proliferacji komórek w zależności od stężenia wobec linii L1210 (metoda inkorporacji [³H]TdR).

* kontrolą traktowaną jako 100% były komórki hodowane w czystej pożywce



Wykres 12. Porównanie wpływu badanych związków na żywotność i proliferację komórek linii L1210. Słupki przedstawiają średnie wartości potrójnego testu ± SD dla c = 0,5 mg/ml (59j c = 0,215 mg/ml, 59e: c = 0,25 mg/ml)

* kontrolą traktowaną jako 100% były komórki hodowane w czystej pożywce

W związku z tym, że związki hamowały żywotność komórek lub ich proliferację w najwyższym badanym stężeniu, porównano uzyskane wartości w celu określenia selektywności (Tabela 2). Najbardziej korzystne właściwości ma związek, który w małym stopniu wpływa na żywotność komórek (miara cytotoksyczności), a w dużym stopniu hamuje

ich proliferację. Im większa wartość indeksu selektywności dla $c = 0,5 \text{ mg/ml}$ (SI^c), tym większa selektywność związku. SI^c obliczono według równania:

$$SI^c = \frac{\% \text{ przeżywalności komórek w stosunku do kontroli dla } c = 0,5 \text{ mg/ml}}{\% \text{ proliferacji komórek w stosunku do kontroli dla } c = 0,5 \text{ mg/ml}}$$

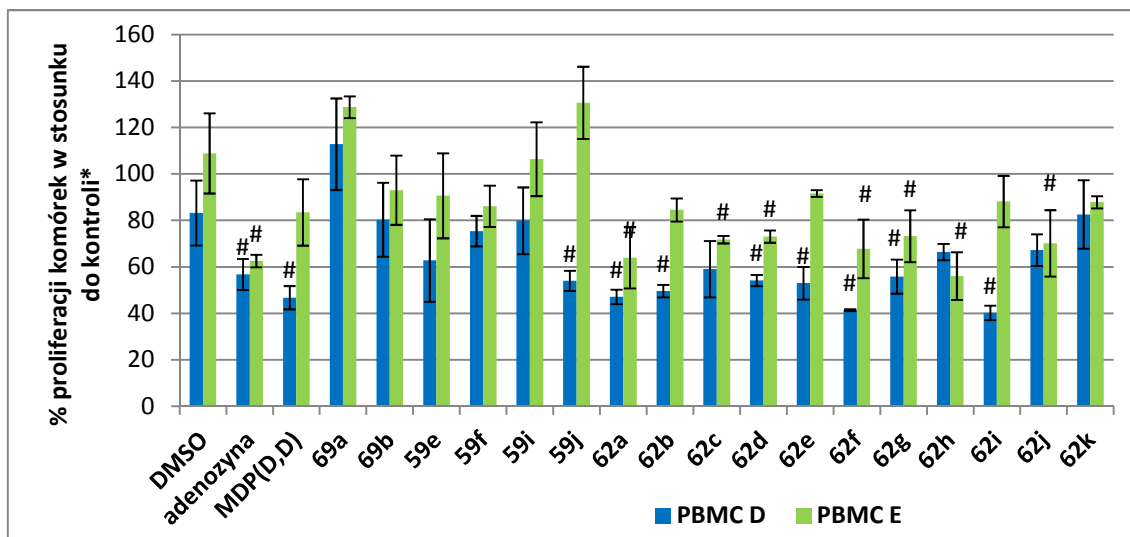
Najbardziej selektywnymi koniugatami były związki **62f** ($SI^c = 44,7$), **62b** ($SI^c = 33,8$) oraz **62g** ($SI^c = 19,6$). Pozostałe koniugaty charakteryzowały się niską selektywnością, a związki **62e**, **69a-b** w większym stopniu wpływały na żywotność komórek niż na ich proliferację. Wszystkie pochodne MDP(D,D) i nor-MDP(D,D) wykazały się dość wysoką selektywnością, przy czym najkorzystniejsze właściwości wykazał związek **59e** ($SI^c = 47,9$). Obliczono również indeks selektywność SI, który jest ilorazem IC_{50} oraz EC_{50} .

Tabela 2. Wartości EC₅₀ uzyskane dla badanych związków (mg/ml; średnia ± SD) oraz porównanie % żywotności komórek* z % proliferacji# w stosunku do kontroli dla c = 0,5 mg/ml (**59j** c = 0,215 mg/ml, **59e**: c = 0,25 mg/ml). ** Związek zwiększał proliferację komórek w porównaniu z kontrolą. Kontrolą traktowaną jako 100% były komórki hodowane w czystej pożywce. SI- IC₅₀/EC₅₀

L1210					
nr związku	EC₅₀ (mg/ml)	SI	MTT* (%)	[³H]TdR# (%)	SI^C
59e	0,139 ± 0,003 (0,228 mM)	1,16	39,72 ± 7,52	0,83 ± 0,18	47,9
59f	0,206 ± 0,004 (0,363 mM)	0,79	19,97 ± 8,56	0,55 ± 0,13	36,6
59i	0,169 ± 0,001 (0,290 mM)	1,08	14,68 ± 8,04	0,76 ± 0,16	19,3
59j	0,115 ± 0,001 (0,193 mM)	0,87	26,60 ± 9,81	1,12 ± 0,19	23,7
62a	0,453 ± 0,002 (0,517 mM)	0,55	35,91 ± 7,66	9,75 ± 0,39	3,7
62b	0,398 ± 0,012 (0,446 mM)	0,49	29,01 ± 3,69	0,86 ± 0,21	33,8
62c	0,457 ± 0,001 (0,507 mM)	0,61	43,10 ± 1,60	4,65 ± 1,37	9,3
62d	0,443 ± 0,006 (0,497 mM)	0,44	28,09 ± 1,59	5,14 ± 0,74	5,5
62e	0,414 ± 0,007 (0,458 mM)	0,35	-0,87 ± 2,33	2,90 ± 0,51	-0,3
62f	0,431 ± 0,009 (0,500 mM)	0,54	29,84 ± 7,88	0,67 ± 0,10	44,7
62g	0,443 ± 0,001 (0,506 mM)	1,12	53,60 ± 1,87	2,73 ± 1,11	19,6
62h	0,454 ± 0,003 (0,511 mM)	1,10	52,99 ± 4,26	6,10 ± 0,21	8,7
62i	0,475 ± 0,017 (0,541 mM)	1,05	64,95 ± 7,80	31,63 ± 13,46	2,1
62j	0,455 ± 0,001 (0,512 mM)	0,56	31,65 ± 14,16	12,31 ± 1,58	2,6
62k	0,263 ± 0,032 (0,292 mM)	1,90	59,37 ± 4,10	31,15 ± 7,29	1,9
69a	0,5**	1	70,64 ± 5,89	178,39 ± 26,39	0,4
69b	0,5**	1	65,58 ± 6,22	192,38 ± 14,71	0,3
adenozyna	0,5**	0,53	32,79 ± 2,38	132,32 ± 4,01	0,2
MDP(D,D)	0,5**	1	64,93 ± 7,86	146,06 ± 23,78	0,4

4.2.2.3. Oznaczanie aktywności antyproliferacyjnej otrzymanych związków wobec PBMC oraz ocena ich selektywności

Ze względu na różnice osobnicze mogące wpływać na wrażliwość związków wobec PBMC, badania przeprowadzono w 3 niezależnych testach (PBMC pobrano od 3 pacjentów, oznaczono PBMC C, D, E), każdorazowo z trzema powtórzeniami. W pierwszej próbie, PBMC C, nie wykazano różnicy między wpływem DMSO na komórki a aktywnością związków. W próbie PBMC D oraz PBMC E różnica ta była widoczna dla niektórych związków w stężeniu 0,05 mg/ml (Wykres 13). W najwyższych stężeniach nie było istotnej statystycznie różnicy pomiędzy wpływem 10% DMSO a badanymi związkami na komórki.



Wykres 13. Wpływ badanych związków na proliferację PBMC próbki D i E. Słupki przedstawiają średnie wartości potrójnego testu \pm SD. Pochodna **59j** $c = 0,021$ mg/ml, **59e**: $c = 0,025$ mg/ml, pozostałe związki $c = 0,05$ mg/ml, DMSO: 1% roztwór.

- istnieje statystyczna różnica ($P < 0.05$) w porównaniu do komórek traktowanych DMSO.

* kontrolą traktowaną jako 100% były komórki hodowane w czystej pożywce

Aktywowane limfocyty były wrażliwe na koniugaty połączone łącznikiem aminoetylowym, z których najbardziej aktywnymi były **62a**, **62d**, **62f**, **62g**. Dla tych koniugatów stwierdzono istotną różnicę w aktywności w obu próbkach w porównaniu z

DMSO. Koniugaty **69a-b** oraz koniugat zawierający L-walinę – **62k**, nie wykazały aktywności antyproliferacyjnej. Tylko jedna pochodna nor-MDP(D,D) **59j** hamowała w sposób istotny proliferację limfocytów. Adenozyna w stężeniu 0,187 mM (0,05 mg/ml) hamowała proliferację 60% komórek w porównaniu do kontroli.

Wobec PBMC związki nie charakteryzowały się korzystnymi wartościami SI^C (Tabela 3). Dla koniugatów **62a-j** współczynnik selektywności wahał się w granicach 0,85 – 2,74, dla pochodnych MDP(D,D) i nor-MDP(D,D) 0,52 – 1,80, dla **62a-b** 0,66 – 1,11.

Tabela 3. Porównanie % żywotności komórek* z % proliferacji# w stosunku do kontroli dla c = 0,05 mg/ml (**59j** c = 0,021 mg/ml, **59e**: c = 0,025 mg/ml). Kontrolą traktowaną jako 100% były komórki hodowane w czystej pożywce.¹ – związek najbardziej aktywny w serii

nr związku	MTT* (%)			[³ H]TdR# (%)	SI ^C
	PBMC A	PBMC B	PBMC D	PBMC E	
59e	93,55 ± 0,19	113,16 ± 6,09	62,82 ± 17,76	90,62 ± 18,27	1,03 – 1,80
59f	71,78 ± 9,83	81,17 ± 5,94¹	75,44 ± 6,53	86,09 ± 8,86	0,83 – 1,08
59i	81,12 ± 5,97	100,72 ± 0,59	79,90 ± 14,33	106,38 ± 15,84	0,76 – 1,26
59j	68,28 ± 1,54¹	83,61 ± 5,48	54,06 ± 4,34	130,61 ± 15,54	0,52 – 1,55
62a	79,07 ± 4,70	127,43 ± 2,02	47,14 ± 3,08	63,99 ± 13,18	1,24 – 1,99
62b	79,41 ± 12,00	111,23 ± 4,12	49,62 ± 2,65	84,58 ± 4,96	0,94 – 2,24
62c	101,93 ± 5,64	82,91 ± 6,63	59,07 ± 12,15	71,79 ± 1,64	1,15 – 1,73
62d	91,12 ± 5,91	99,55 ± 5,23	54,16 ± 2,38	73,07 ± 2,66	1,25 – 1,84
62e	87,87 ± 5,21	77,52 ± 12,39	53,01 ± 7,00	91,62 ± 1,47	0,85 – 1,66
62f	77,23 ± 7,24	112,88 ± 5,55	41,38 ± 0,39	67,82 ± 12,57	1,14 – 2,73
62g	75,49 ± 9,66	111,95 ± 10,21	55,87 ± 7,33	73,27 ± 11,14	1,35 – 2,00
62h	79,77 ± 1,22	82,33 ± 4,87	66,43 ± 3,53	56,08 ± 10,26¹	1,20 – 1,47
62i	90,59 ± 5,65	110,40 ± 2,91	40,26 ± 3,06¹	88,14 ± 11,04	1,03 – 2,74
62j	70,77 ± 2,10	91,52 ± 5,12	67,26 ± 6,83	70,20 ± 14,27	1,01 – 1,36
62k	83,37 ± 5,13	79,49 ± 4,05	82,60 ± 14,77	87,85 ± 2,63	0,90 – 1,01
69a	89,64 ± 4,89	85,39 ± 4,66	112,83 ± 19,68	128,76 ± 4,70	0,66 – 0,79
69b	88,58 ± 6,45	89,55 ± 7,34	80,33 ± 15,90	93,04 ± 14,91	0,95 – 1,11
adenozyna	97,75 ± 4,24	94,07 ± 3,43	56,77 ± 6,70	62,60 ± 2,69	1,50 – 1,72
MDP(D,D)	88,93 ± 2,60	100,65 ± 2,73	46,80 ± 5,04	83,47 ± 14,28	1,07 – 2,15

5. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

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

Widma masowe zarejestrowano na aparacie BIFLEX III Bruker w Pracowni Spektrometrii Mas MALDI-TOF Uniwersytetu Gdańskiego na Wydziale Chemii, z zastosowaniem CCA lub DHB jako matrycy.

Masa związku **62j** oraz jego widmo UV zostały uzyskane metodą HPLC z detekcją widm UV-VIS i ESI-MS przez dr Marka Ślebiodę w Katedrze Chemii Organicznej Politechniki Gdańskiej.

Pomiary scyntylicyjne zostały wykonane za pomocą czytnika scyntylicyjnego fazy płynnej (LSC-Beckman) w czasie 5 min/próbka w Katedrze i Zakładzie Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Oczyszczanie związków metodą ekstrakcji do fazy stałej przeprowadzono na kolumnach polipropylenowych o niezmodyfikowanej fazie krzemionkowej CHROMABOND® SiOH oraz na kolumnach CHROMABOND® C18 firmy MACHEREYNAGEL.

Do oczyszczania związków metodą chromatografii kolumnowej użyto żelu krzemionkowego Merck 60 (0,063-0,200 mm). Do chromatografii cienkowarstwowej użyto gotowych płytek pokrytych żelem krzemionkowym (Merck 60 F₂₅₄). Zarówno do chromatografii kolumnowej jak i TLC zastosowano następujące układy rozwijające:

- | | |
|---------------------------------------|----------------|
| A. chloroform : metanol | (4:1, v/v) |
| B. chloroform : metanol | (9:1, v/v) |
| C. chloroform : metanol | (10:1, v/v) |
| D. chloroform : octan etylu : metanol | (1:9:1, v/v) |
| E. chloroform : octan etylu : metanol | (5:5:1, v/v) |
| F. chloroform : octan etylu : metanol | (7:3:1, v/v) |
| G. woda : octan etylu : kwas octowy | (1:4:1, v/v) |
| H. chloroform : metanol : woda | (12:6:1, v/v) |
| I. chloroform : metanol : woda | (6:3:0,7, v/v) |
| J. woda : n-butanol : kwas octowy | (1:4:1, v/v) |

Jako odczynniki wywołujące stosowano:

- wywoływacz ninhydrynowy o składzie:

200 mg ninhydryny

100 mL etanolu

2 mL kwasu octowego

Temperatura topnienia związków mierzona była w aparacie Kofler-block i jej wartości nie były korygowane.

5.1. Synteza pochodnych muramyldipeptydu i nor-muramyldipeptydu

5.1.1. Synteza podstawionego kwasu muraminowego i nor-muraminowego

(Schemat 2)

5.1.1.1. Synteza 2-acetamido-2-deoksy- α -D-glukopiranozydu (42) [195]

Z 30 g (139,13 mmola) chlorowodoru D-glukozaminy (**41**) i 16,5 g (171,6 mmola) bezwodnika octowego otrzymano 27,3 g (123,41 mmola) związku **42** (wyd. 90%), temp. top. 203-205°C.

Lit.: wyd. 93%, temp. top. 203-205°C [195].

5.1.1.2. Synteza 2-acetamido-1-O-benzylo-2-deoksy- α -D-glukopiranozydu (43)

[196]

Z 20,5 g (92,68 mmola) związku **42** i 235 mL alkoholu benzyłowego zawierającego 2% chlorowodoru otrzymano 21,7 g (69,7 mmola) związku **43** (wyd. 75%), temp. top. 183-184°C.

Lit.: wyd. 82%, temp. top. 183-184°C [196].

5.1.1.3. Synteza 2-acetamido-4,6-O-benzylideno-1-O-benzylo-2-deoksy- α -D-glukopiranozydu (44) [196]

Z 10,2 g (32,8 mmola) związku **43** i 36 ml aldehydu benzoesowego otrzymano 8,46 g (21,17 mmola) związku **44** (wyd. 65%), temp. top. 256-258°C, TLC w układzie B.

Lit.: wyd. 66%, temp. top. 252-254°C [196]; 262°C [220].

5.1.1.4. Synteza 2-acetamido-4,6-*O*-benzylideno-1-*O*-benzylo-2-deoksy-3-*O*-karboksyetylo- α -D-glukopiranozydu (45) [197]

Z 5 g (12,5 mmola) związku **44**, 7,2 g 60% wodoru sodu i 7,0 g kwasu DL- α -chloropropionowego otrzymano 4,7 g (9,96 mmola) związku **45** (wyd. 80%), temp. top. 232-235°C, TLC w układzie C.

Lit.: wyd. 76%, temp. top. 243-244°C [197]; 236-238°C [196]; 237-239°C [192]; 229-230°C [221].

5.1.1.5. Synteza 2-acetamido-4,6-*O*-benzylideno-1-*O*-benzylo-2-deoksy-3-*O*-karboksymetylo- α -D-glukopiranozydu (46) [198]

Z 3,2 g (8 mmola) związku **44**, 1,15 g 60% wodoru sodu i 1,3 g kwasu chlorooctowego otrzymano 1,8 (3,93 mmola) związku **46** (wyd. 50%), temp. top. 212-215°C, TLC w układzie C.

Lit.: wyd. 52%, temp. top. 209-213°C [222].

5.1.2. Synteza chronionych aminokwasów

5.1.2.1. Synteza Z-D-izoGln(*Or*-Bu) (51) [223]

5.1.2.1.1. Synteza Z-D-Glu (49) [202]

22 g (149,53 mmola) kwasu D-glutaminowego (**48**) rozpuszczono w roztworze 25 g NaHCO₃ w 115 ml wody. Do silnie mieszanego roztworu w temperaturze 0°C wkraplano w ciągu 1,5 godz. jednocześnie 24 ml chloromrówczanu benzylu i 75 ml 2N NaOH. Cały czas utrzymywano pH = 8-9. Po tym czasie całość mieszało 24 godz. w temperaturze pokojowej. Następnie mieszaninę ekstrahowano trzykrotnie eterem. Warstwę wodną zakwaszono 6N HCl do pH = 2-3, a powstały olej ekstrahowano pięciokrotnie eterem dietylowym. Warstwę organiczną przemyto dwukrotnie 100 ml wody, suszono bezwodnym MgSO₄. Po 15 min. pozbyto się środka suszącego sącąc zawiesinę przez sącdek karbowany a przesąc odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Powstały gęsty olej rozpuszczono na gorąco w małej ilości octanu etylu, po ochłodzeniu dodano heksan do zmętnienia i wstawiono do lodówki na ok. 15 min. Po rozpoczęciu krystalizacji dodano ok. 200 ml heksanu i pozostawiono na 24h w

temperaturze 0°C. Otrzymano 25,2 g (89,59 mmola) Z-D-Glu (**49**) (wyd. 60%), temp. top. 120-121°C.

Lit.: temp. top. 120-121°C [202].

5.1.2.1.2. Synteza Z-D-izoGln (50**) [203]**

11,2 g (40 mmol) Z-D-Glu, 0,5 g kwasu benzenosulfonowego, 2 g paraformaldehydu i 300 ml bezwodnego benzenu poddano wolnej destylacji (1-3 krople/sekundę), wkraplając jednocześnie benzen. Po ok. 30 min., gdy usunięto wodę, zakończono destylację i ostudzono mieszaninę reakcyjną. Następnie odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem i do oleistej pozostałości dodano 40 ml 25% roztworu amoniaku. Pozostawiono na 1 godz. w temperaturze pokojowej. Po tym czasie mieszaninę rozcieńczono dwukrotną ilością wody a następnie zakwaszono 6N HCl do pH = 2-3. Po kilkunastu minutach osad przesączono, przemyto dużą ilością wody, suszono. Otrzymano 8,93 g (31,86 mmola) Z-D-izoGln (**50**) (wyd. 80%), temp. top. 170-173°C.

Lit.: temp. top. 173-175°C [203].

5.1.2.1.3. Synteza Z-D-izoGln(Ot-Bu) (51**) [201]**

3,22 g (11,5 mmola) Z-D-izoGln i 2,6 g BTEAC rozpuszczono w 86 ml bezwodnego DMF. Następnie dodano 63,6 ml bromku *tert*-butylu i 43,6 g K₂CO₃. Całość mieszano 24 godz. w temperaturze 55°C. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną ochłodzono i wylano do 1l zimnej wody jednocześnie mieszając. Pozostawiono na 30 minut, potem wypadnięty osad przesączono i przemyto wodą. Otrzymano 2,9 g (8,62 mmola) Z-D-izoGln(Ot-Bu) (**51**) (wyd. 75%), temp. top. 134-136°C.

Lit.: temp. top. 134-135,5°C [201].

5.1.2.2. Synteza N-chronionych aminokwasów (53a-e**)**

Pozostałe chronione aminokwasy zostały zsyntetyzowane według metody dla otrzymywania Z-D-Glu (**49**) podanej w punkcie 5.1.2.1.1.

5.1.2.2.1. Synteza Z-D-Ala (53a**) [200]**

Z 1,333 g (14,96 mmola) D-Ala otrzymano 2,740 g (12,27 mmola) Z-D-Ala (**53a**) (wyd. 82%), temp. top. 83-84°C.

Lit.: temp. top. 85-86°C (dla Z-Ala) [224].

5.1.2.2.2. Synteza Z-D-2-ABA (53b)

Z 0,540 g (5,23 mmola) D-2-ABA otrzymano 0,870 g (3,67 mmola) Z-D-2-ABA (**53b**) (wyd. 70%), temp. top. 66-67°C.

5.1.2.2.3. Synteza Z-D-Pro (53c)

Z 0,560 g (4,87 mmola) D-Pro otrzymano 0,910 g (3,65 mmola) Z-D-Pro (**53c**) (wyd. 75%), temp. top. 76-78°C.

Lit.: temp. top. 77°C (dla Z-Pro) [224].

5.1.2.2.4. Synteza Z-D-Ser (53d) [200]

Z 0,569 g (5,4 mmola) D-Ser otrzymano 0,880 g (3,67 mmola) Z-D-Ser (**53d**) (wyd. 68%), temp. top. 116-119°C.

Lit.: temp. top. 118,5-119,5°C (dla Z-Ser) [224].

5.1.2.2.5. Synteza Z-D-Val (53e)

Z 0,536 g (4,57 mmola) D-Val otrzymano 0,920 g (3,66 mmola) Z-D-Val (**53e**) (wyd. 80%), temp. top. 58-60°C.

Lit.: temp. top. 57-58,5°C (dla Z-Val) [224].

5.1.3. Synteza chronionych dipeptydów

5.1.3.1. Synteza D-izoGln(Ot-Bu) (55)

2,7 g (8,03 mmol) Z-D-izoGln(Ot-Bu) (**51**) rozpuszczono w 50 ml bezwodnego metanolu i poddano wodorowaniu stosując jako katalizator 10% pallad na węglu. Koniec procesu sprawdzano chromatograficznie na płytkach TLC w układzie A, używając wywoływacza ninhydrynowego. Następnie zawiesinę przesączono przez podwójny sączek karbowany, a metanol odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskano 1,55g D-izoGln(Ot-Bu) (**55**) w postaci oleju, (wyd. 95%). Otrzymany związek przechowywano do dnia następnego w temperaturze 0°C, kiedy to był wykorzystany w reakcji z chronionym aminokwasem (**53a-e**).

5.1.3.2. Synteza Z-D-Ala-D-izoGln(Ot-Bu) (56a)

Z-D-Ala-D-izoGln(Ot-Bu) (**56a**) otrzymałam wykorzystując metodę mieszanych bezwodników według procedury opisanej przez Lefranciera [204].

Do roztworu 2,74 g (12,26 mmola) Z-D-Ala (**53a**) w 13 ml bezwodnego DMF ochłodzonego do temperatury -15°C dodano 1,35 ml NMM i 1,59 ml chloromrówczanu izobutyli (**54**). Po 3 min. do mieszaniny reakcyjnej dodano ochłodzony roztwór 1,55 g (7,66 mmol) D-izoGln(Ot-Bu) (**55**) w 13 ml bezwodnego DMF. Reakcję kontynuowano mieszając 4 godziny w temperaturze -15°C . Po tym czasie temperaturę podniesiono do 0°C i dodano 8 ml 2,5 M KHCO_3 . Po 30 min. produkt wytrącono przez dodanie 200 ml nasyconego roztworu NaCl. Osad odsączono i przemyto wodą destylowaną. Związek oczyszczano przez krystalizację z octanu etylu. Otrzymano 1,87 g (4,59 mmola) Z-D-Ala-D-izoGln(Ot-Bu) (**56a**) (wyd. 60% w przeliczeniu na D-izoGln(Ot-Bu) (**55**), temp. top. $130\text{-}132^{\circ}\text{C}$, $R_f = 0,75$ (układ A), $[\alpha]_D = +25,7^{\circ}$ ($c = 1$, MeOH).

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 1,20 (d, $J = 7,32$ Hz, 3 H, $\beta\text{CH}_3\text{-Ala}$), 1,39 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,69-1,96 (m, 2 H, $\beta\text{CH}_2\text{-izoGln}$), 2,2 (m, 2 H, $\gamma\text{CH}_2\text{-izoGln}$), 4,05 (m, 1 H, $\alpha\text{CH-Ala}$), 4,2 (m, 1 H, $\alpha\text{CH-izoGln}$), 5,03 (q, 2 H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 7,09; 7,3 (2s, 2 H, CONH_2), 7,31-7,4 (m, 5 H, C_6H_5), 7,51 (d, $J = 7,33$ Hz, 1 H, NH-Ala), 7,85 (d, $J = 7,82$ Hz, 1 H, NH-izoGln).

5.1.3.3. Synteza Z-D-2-ABA-D-izoGln(Ot-Bu) (56b)

Z 0,87 g (3,67 mmola) Z-D-2-ABA (**53b**), 0,4 ml NMM, 0,48 ml chloromrówczanu izobutyli i 0,46 g (2,27 mmola) D-izoGln(OtBu) (**55**) w DMF, metodą mieszanych bezwodników według procedury podanej w punkcie 5.1.3.2. Otrzymano 0,62 g (1,47 mmola) Z-D-2-ABA-D-izoGln(Ot-Bu) (**56b**), wyd. 65%, temp. top. $113\text{-}115^{\circ}\text{C}$, $R_f = 0,77$ (układ A), $[\alpha]_D = +3,8^{\circ}$ ($c = 1$, MeOH).

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 1,39 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,60-1,65 (m, 3 H, $\gamma\text{CH}_3\text{-2-ABA}$), 1,65-1,93 (m, 2 H, $\beta\text{CH}_2\text{-izoGln}$), 2,12-2,23 (dt, 4 H, $\beta\text{CH}_2\text{-2-ABA}$, $\gamma\text{CH}_2\text{-izoGln}$), 3,0 (m, 1 H, $\alpha\text{-2-ABA}$), 4,18 (m, 1 H, $\alpha\text{CH-izoGln}$), 5,01 (s, 2 H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 7,03; 7,28 (s, m, 2 H, CONH_2), 7,25-7,4 (m, 6 H, C_6H_5 , NH-2-ABA), 7,88 (d, $J = 8,3$ Hz, 1 H, NH-izoGln).

5.1.3.4. Synteza Z-D-Pro-D-izoGln(Ot-Bu) (56c)

Z 0,91 g (3,66 mmola) Z-D-Pro (53c), 0,4 ml NMM, 0,48 ml chloromrówczanu izobutyli i 0,46g (2,27 mmola) D-izoGln(Ot-Bu) (55) w DMF, metodą mieszanych bezwodników według procedury podanej w punkcie 5.1.3.2. Otrzymano 0,818 g (1,88 mmola) Z-D-Pro-D-izoGln(Ot-Bu) (56c), wyd. 83%, temp. top. 160-162°C, $R_f = 0,77$ (układ A), $[\alpha]_D = +57,4^\circ$ (c = 1, MeOH).

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO): δ 1,4 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1,62-2,3 (m, 8 H, CH₂CH₂-Pro, β CH₂-izoGln, γ CH₂-izoGln), 3,35-3,52 (m, 2 H, CH₂CH₂N), 4,15-4,25 (m, 2 H, α CH-Pro, α CH-izoGln), 5,05 (s, 2 H, CH₂C₆H₅), 7,09; 7,2 (2s, 2 H, CONH₂), 7,26-7,4 (m, 5 H, C₆H₅), 8,08 d, $J = 7,81$ Hz, 1 H, NH-izoGln).

5.1.3.5. Synteza Z-D-Ser-D-izoGln(Ot-Bu) (56d)

Z 0,88 g (3,66 mmola) Z-D-Ser (53d), 0,4 ml NMM, 0,48 ml chloromrówczanu izobutyli i 0,46 g (2,27 mmola) D-izoGln(Ot-Bu) (55) w DMF, metodą mieszanych bezwodników według procedury podanej w punkcie 5.1.3.2. Otrzymano 0,597g (1,41 mmola) Z-D-Ser-D-izoGln(Ot-Bu) (56d), wyd. 62%, temp. top. 125-127°C, $R_f = 0,65$ (układ A), $[\alpha]_D = +12^\circ$ (c = 0,5, MeOH).

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO): δ 1,39 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1,68-2,0 (m, 2 H, β CH₂-izoGln), 2,22 (t, 2 H, γ CH₂-izoGln), 3,58 (m, 2 H, β CH₂-Ser), 4,1 (m, 1 H, α CH-Ser), 4,2 (m, 1 H, α CH-izoGln), 5,0-5,1 (m, 3 H, OH, CH₂C₆H₅), 7,15; 7,20 (s, m, 2 H, CONH₂), 7,20-7,4 (m, 7 H, C₆H₅, NH-Ser), 8,02 (d, $J = 8,3$ Hz, 1 H, NH-izoGln).

5.1.3.6. Synteza Z-D-Val-D-izoGln(Ot-Bu) (56e)

Z 0,92 g (3,66 mmola) Z-D-Val (53e), 0,4 ml NMM, 0,48 ml chloromrówczanu izobutyli i 0,46 g (2,27 mmola) D-izoGln(Ot-Bu) (55) w DMF, metodą mieszanych bezwodników według procedury podanej w punkcie 5.1.3.2. Otrzymano 0,89 g (2,04) Z-D-Val-D-izoGln(Ot-Bu) (56e), wyd. 90%, temp. top. 193-195°C, $R_f = 0,81$ (układ A), $[\alpha]_D = +8^\circ$ (c = 0,5, DMF).

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO): δ 0,85 (m, 6 H, γ CH₃-Val), 1,39 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1,7-1,95 (m, 2 H, β CH₂-izoGln), 1,95-2,04 (m, 1 H, β CH-Val), 2,2 (m, 2 H, γ CH₂-izoGln), 3,88 (t, 1 H, α CH-Val), 4,22 (m, 1 H, α CH-izoGln), 5,05(s, 2 H,

$CH_2C_6H_5$), 7,08; 7,3 (2s, 2 H, CONH₂), 7,31-7,42 (m, 6 H, C₆H₅, NH-Val), 7,88 (d, $J = 7,81$ Hz, 1 H, NH-izoGln).

5.1.4. Synteza dipeptydów ze zdjętą osłoną Z (57a-e)

Oslonę benzyloksykarbonylową z chronionych dipeptydów **56a-e** zdjęto bezpośrednio przed łączeniem z podstawionym Mur (**45**) lub nor-Mur (**46**), według procedury opisanej w punkcie 5.1.3.1.

5.1.4.1. Synteza D-Ala-D-izoGln(O t -Bu) (57a)

Z 907 mg (2,22 mmola) Z-D-Ala-D-izoGln(O t -Bu) (**56a**) uzyskano 576 mg (2,10 mmola) D-Ala-D-izoGln(O t -Bu) (**57a**) (wyd. 95%).

5.1.4.2. Synteza D-2-ABA-D-izoGln(O t -Bu) (57b)

Z 934 mg (2,21 mmola) Z-D-2-ABA-D-izoGln(O t -Bu) (**56b**) uzyskano 611 mg (2,12 mmola) D-2-ABA-D-izoGln(O t -Bu) (**57b**) (wyd. 96%).

5.1.4.3. Synteza D-Pro-D-izoGln(O t -Bu) (57c)

Z 1005 mg (2,31 mmola) Z-D-Pro-D-izoGln(O t -Bu) (**56c**) uzyskano 666 mg (2,22 mmola) D-Pro-D-izoGln(O t -Bu) (**57c**) (wyd. 96%).

5.1.4.4. Synteza D-Ser-D-izoGln(O t -Bu) (57d)

Z 400 mg (0,94 mmola) Z-D-Ser-D-izoGln(O t -Bu) (**56d**) uzyskano 270 mg (0,93 mmola) D-Ser-D-izoGln(O t -Bu) (**57d**) (wyd. 98%).

5.1.4.5. Synteza D-Val-D-izoGln(O t -Bu) (58e)

Z 1095 mg (2,51 mmola) Z-D-Val-D-izoGln(O t -Bu) (**56e**) uzyskano 755 mg (2,50 mmola) D-Val-D-izoGln(O t -Bu) (**57e**) (wyd. 99%).

5.1.5. Synteza podstawionych muramyldipeptydów

Podstawione MDP otrzymałam wykorzystując metodę mieszanych bezwodników zgodnie z procedurą podaną przez Lefranciera, opisaną w punkcie 5.1.3.2. [204].

5.1.5.1. Synteza MurNAc(α -Bn-4,6-*O*-Bzi)-D-Ala-D-izoGln(*O**t*-Bu) (58a)

Z 1,009 g (2,14 mmola) związku **45**, 0,707 g (2,58 mmola) D-Ala-D-izoGln(*O**t*-Bu) (**57a**) otrzymano 1,17 g (1,60 mmola) MurNAc(α -Bn-4,6-*O*-Bzi)-D-Ala-D-izoGln(*O**t*-Bu) (**58a**). Związek oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie F, wyd. 75%, temp. top. 234-236°C.

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 1,25 (m, 6 H, CH₃-Mur, β CH₃-Ala), 1,38 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1,69-1,98 (m, 2 H, β CH₂-izoGln), 1,86 (s, 3 H, CH₃CO), 2,38-2,22 (m, 2 H, γ CH₂-izoGln), 3,62-4,19 (m, 6 H, H-C4,5,6,3,2-Mur), 4,19-4,4 (m, 3 H, α CH-Ala, α CH-izoGln, O-CH(CH₃)CO), 4,51; 4,71 (dd, $J = 12,7$ Hz, 2 H, CH₂C₆H₅), 4,94 (d, $J = 3,41$ Hz, 1 H, H-1-Mur), 5,72 (s, 1 H, CHC₆H₅), 7,1; 7,3 (2s, 2 H, CONH₂), 7,3-7,47 (m, 10 H, C₆H₅), 7,71 (d, $J = 7,32$ Hz, 1 H, NH-Ala), 8,09 (d, $J = 8,3$ Hz, 1 H, NHAc), 8,38 (d, $J = 7,33$ Hz, 1 H, NH-izoGln).

5.1.5.2. Synteza MurNAc(α -Bn-4,6-*O*-Bzi)-D-2-ABA-D-izoGln(*O**t*-Bu) (58b)

Z 1,009 g (2,14 mmola) związku **45**, 0,743 g (2,58 mmola) D-2-ABA-D-izoGln(*O**t*-Bu) (**57b**) otrzymano 1,347 g (1,82 mmola) MurNAc(α -Bn-4,6-*O*-Bzi)-D-2-ABA-D-izoGln(*O**t*-Bu) (**58b**). Związek oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie C, a następnie doczyszczano za pomocą chromatografii preparatywnej TLC, wyd. 85%, temp. top. 232-233°C.

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 1,25 (m, 3 H, CH₃-Mur), 1,38 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1,4-1,75 (m, 5 H, γ CH₃-2-ABA, β CH₂-izoGln), 1,86 (s, 3 H, CH₃CO), 2,12 (t, $J = 7,32$ Hz, 2 H, β CH-2-ABA), 2,2 (t, $J = 7,82$ Hz, 2 H, γ CH₂-izoGln), 3,03 (m, 1 H, α CH-2-ABA), 3,61-4,25 (m, 8 H, H-C4,5,6,2,3-Mur, α CH-izoGln, O-CH(CH₃)CO), 4,52; 4,71 (dd, 2 H, CH₂C₆H₅), 4,95 (d, $J = 3,91$ Hz, 1 H, H-1-Mur), 5,70 (s, 1 H, CHC₆H₅), 7,1; 7,32 (s, m, 2 H, CONH₂), 7,3-7,55 (m, 11 H, C₆H₅, NH-2-ABA), 7,91 (d, $J = 7,81$ Hz, 1 H, NHAc), 8,36 (d, $J = 7,33$ Hz, 1 H, NH-izoGln).

5.1.5.3. Synteza MurNAc(α -Bn-4,6-*O*-Bzi)-D-Pro-D-izoGln(*O**t*-Bu) (58c)

Z 1,009 g (2,14 mmola) związku **45**, 0,774 g (2,58 mmola) D-Pro-D-izoGln(*O**t*-Bu) (**57c**) otrzymano 1,450 g (1,96 mmola)

MurNAc(α -Bn-4,6-*O*-Bzi)-D-Pro-D-izoGln(*O**t*-Bu) (**58c**). Związek oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie D, wyd. 90%, temp. top. 164-166°C.

¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ 1,25 (d, $J = 6,35$ Hz, 3 H, CH₃-Mur), 1,38 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1,65-2,31 (m, 8 H, CH₂CH₂-Pro, β CH₂-izoGln, γ CH₂-izoGln), 1,86 (s, 3 H, CH₃CO), 3,38-3,81 (m, 8 H, H-C4,5,6,2,3-Mur, CH₂CH₂N), 4,31-4,2 (m, 2 H, α CH-Pro, α CH-izoGln), 4,41 (q, 1 H, O-CH(CH₃)CO), 4,5; 4,69 (dd, 2 H, CH₂C₆H₅), 5,14 (d, $J = 3,42$ Hz, 1 H, H-1-Mur), 5,72 (s, 1 H, CHC₆H₅), 7,06; 7,22 (2s, 2 H, CONH₂), 7,3-7,46 (m, 10 H, C₆H₅), 7,96 (d, $J = 7,81$ Hz, 1 H, NHAc), 8,34 (d, $J = 5,37$ Hz, 1 H, NH-izoGln).

5.1.5.4. Synteza MurNAc(α -Bn-4,6-*O*-Bzi)-D-Ser-D-izoGln(*O**t*-Bu) (**58d**)

Z 1,009 g (2,14 mmola) związku **45**, 0,749 g (2,58 mmola) D-Ser-D-izoGln(*O**t*-Bu) (**57d**) otrzymano 1,270 g (1,71 mmola) MurNAc(α -Bn-4,6-*O*-Bzi)-D-Ser-D-izoGln(*O**t*-Bu) (**58d**). Związek oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie F, a następnie doczyszczano za pomocą chromatografii preparatywnej TLC, wyd. 80%, temp. top. 228-230°C.

¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ 1,25 (d, $J = 6,83$ Hz, 3 H, CH₃-Mur), 1,39 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1,7-2,2 (m, 2 H, β CH₂-izoGln), 1,82 (s, 3 H, CH₃CO), 2,22 (m, 2 H, γ CH₂-izoGln), 3,51-4,21 (m, 8 H, β CH₂-Ser, H-C4,5,6,2,3-Mur), 4,21-4,49 (m, 3 H, α CH-Ser, α CH-izoGln, O-CH(CH₃)CO), 4,51; 4,71 (dd, 2 H, CH₂C₆H₅), 4,88 (d, $J = 3,42$ Hz, 1 H, H-1-Mur), 5,29 (t, 1 H, OH), 5,73 (s, 1 H, CHC₆H₅), 7,2; 7,27 (2s, 2 H, CONH₂), 7,3-7,46 (m, 10 H, C₆H₅), 7,65 (d, $J = 7,81$ Hz, 1 H, NH-Ser), 8,29 (d, $J = 7,81$ Hz, 1 H, NHAc), 8,36 (d, $J = 7,81$ Hz, 1 H, NH-izoGln).

5.1.5.5. Synteza MurNAc(α -Bn-4,6-*O*-Bzi)-D-Val-D-izoGln(*O**t*-Bu) (**58e**)

Z 1,009 g (2,14 mmola) związku **45**, 0,779 g (2,58 mmola) D-Val-D-izoGln(*O**t*-Bu) (**57e**) otrzymano 1,42 g (1,88 mmola) MurNAc(α -Bn-4,6-*O*-Bzi)-D-Val-D-izoGln(*O**t*-Bu) (**58e**). Związek oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie E, wyd. 88%, temp. top. 245-246°C.

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 0,82 (dd, $J = 5,86$ Hz, 6 H, $\gamma\text{CH}_3\text{-Val}$), 1,25 (d, $J = 5,86$ Hz, 3 H, $\text{CH}_3\text{-Mur}$), 1,38 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,7-2,1 (m, 2 H, $\beta\text{CH}_2\text{-izoGln}$), 1,87 (s, 3 H, CH_3CO), 2,0 (m, 1 H, $\beta\text{CH-Val}$), 2,2 (m, 2 H, $\gamma\text{CH}_2\text{-izoGln}$), 3,62-4,3 (m, 6 H, H-C4,5,6,2,3-Mur), 4,2-4,45 (m, 3 H, $\alpha\text{CH-Val}$, $\alpha\text{CH-izoGln}$, O- $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CO}$), 4,49; 4,71 (dd, 2 H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 4,94 (s, 1 H, H-1-Mur), 5,73 (s, 1 H, CHC_6H_5), 7,1; 7,3 (2s, 2 H, CONH_2), 7,3-7,48 (m, 10 H, C_6H_5), 7,62 (d, $J = 8,79$ Hz, 1 H, NH-Val), 8,2 (d, $J = 7,81$ Hz, 1 H, NHAc), 8,32 (d, $J = 6,84$ Hz, 1 H, NH-izoGln).

5.1.6. Synteza podstawionych nor-muramylodipeptydów

Podstawione nor-MDP otrzymałam wykorzystując metodę mieszanych bezwodników zgodnie z procedurą podaną przez Lefranciera, opisaną w punkcie 5.1.3.2. [204].

5.1.6.1. Synteza nor-MurNAc(α -Bn-4,6-O-Bzi)-D-Ala-D-izoGln(Ot-Bu) (58f)

Z 0,979 g (2,14 mmola) związku **46**, 0,707 g (2,58 mmola) D-Ala-D-izoGln(Ot-Bu) (**57a**) otrzymano 1,19 g (1,67 mmola) nor-MurNAc(α -Bn-4,6-O-Bzi)-D-Ala-D-izoGln(Ot-Bu) (**58f**). Związek oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie C, a następnie doczyszczano za pomocą chromatografii preparatywnej TLC, wyd. 78%, temp. top. 212-215°C.

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 1,05 (d, $J = 7,32$ Hz, 3 H, $\beta\text{CH}_3\text{-Ala}$), 1,39 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,69-1,94 (m, 2 H, $\beta\text{CH}_2\text{-izoGln}$), 1,88 (s, 3 H, CH_3CO), 1,91 (m, 2 H, $\gamma\text{CH}_2\text{-izoGln}$), 3,7-4,10 (m, 6 H, H-C4,5,6,3,2-Mur), 4,1-4,32 (m, 4 H, $\alpha\text{CH-Ala}$, $\alpha\text{CH-izoGln}$, O- CH_2CO), 4,52; 4,73 (dd, $J = 12,21$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 4,93 (d, $J = 3,41$ Hz, 1 H, H-1-Mur), 5,7 (s, 1 H, CHC_6H_5), 7,08; 7,26 (2s, 2 H, CONH_2), 7,3-7,46 (m, 10 H, C_6H_5), 7,59 (d, $J = 7,33$ Hz, 1 H, NH-Ala), 8,02 (d, $J = 8,3$ Hz, 1 H, NHAc), 8,30 (d, $J = 7,81$ Hz, 1 H, NH-izoGln).

5.1.6.2. Synteza nor-MurNAc(α -Bn-4,6-O-Bzi)-D-2-ABA-D-izoGln(Ot-Bu) (58g)

Z 0,979 g (2,14 mmola) związku **46**, 0,743 g (2,58 mmola) D-2-ABA-D-izoGln(Ot-Bu) (**57b**) otrzymano 1,260 g (1,73 mmola) nor-MurNAc(α -Bn-4,6-O-Bzi)-D-2-ABA-D-izoGln(Ot-Bu) (**58g**). Związek oczyszczano

za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie E, wyd. 81%, temp. top. 217-219°C).

¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ 1,39 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1,4-1,85 (m, 5 H, γCH₃-2-ABA, βCH₂-izoGln), 1,88 (s, 3 H, CH₃CO), 2,0 (t, 2 H, βCH-2-ABA), 2,2 (t, 2 H, γCH₂-izoGln), 3,03 (m, 1 H, αCH-2-ABA), 3,68-4,25 (m, 9 H, H-C4,5,6,2,3-Mur, αCH-izoGln, O-CH₂CO), 4,52; 4,71 (dd, 2 H, CH₂C₆H₅), 4,90 (d, *J* = 3,42 Hz, 1 H, H-1-Mur), 5,71 (s, 1 H, CHC₆H₅), 7,02; 7,33 (s, m, 2 H, CONH₂), 7,3-7,55 (m, 11 H, C₆H₅, NH-2-ABA), 7,85 (d, *J* = 7,82 Hz, 1 H, NHAc), 8,29 (d, *J* = 7,81 Hz, 1 H, NH-izoGln).

5.1.6.3. Synteza nor-MurNAc(α-Bn-4,6-O-Bzi)-D-Pro-D-izoGln(Ot-Bu) (58h)

Z 0,979 g (2,14 mmola) związku **46**, 0,774 g (2,58 mmola) D-Pro-D-izoGln(Ot-Bu) (**57c**) otrzymano 1,343 g (1,82 mmola) nor-MurNAc(α-Bn-4,6-O-Bzi)-D-Pro-D-izoGln(Ot-Bu) (**58h**). Związek oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie F, wyd. 85%, temp. top. 223-225°C.

¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ 1,38 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1,60-2,30 (m, 8 H, CH₂CH₂-Pro, βCH₂-izoGln, γCH₂-izoGln), 1,86 (s, 3 H, CH₃CO), 3,4-3,85 (m, 8 H, H-C4,5,6,2,3-Mur, CH₂CH₂N), 4,1-4,2 (m, 2 H, αCH-Pro, αCH-izoGln), 4,3-4,46 (m, 2 H, O-CH₂-CO), 4,5; 4,69 (dd, 2 H, CH₂C₆H₅), 5,07 (s, 1 H, H-1-Mur), 5,71 (s, 1 H, CHC₆H₅), 7,09; 7,16 (2s, 2 H, CONH₂), 7,25-7,48 (m, 10 H, C₆H₅), 8,02 (d, *J* = 8,3 Hz, 1 H, NHAc), 8,7 (m, 1 H, NH-izoGln).

5.1.6.4. Synteza nor-MurNAc(α-Bn-4,6-O-Bzi)-D-Ser-D-izoGln(Ot-Bu) (58i)

Z 0,979 g (2,14 mmola) związku **46**, 0,749 g (2,58 mmola) D-Ser-D-izoGln(Ot-Bu) (**57d**) otrzymano 1,091 g (1,50 mmola) nor-MurNAc(α-Bn,4,6-O-Bzi)-D-Ser-D-izoGln(Ot-Bu) (**58i**). Związek oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie E, wyd. 70%, temp. top. 210-212°C.

¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ 1,39 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1,7-2,2 (m, 2 H, βCH₂-izoGln), 1,87 (s, 3 H, CH₃CO), 2,21 (t, 2 H, γCH₂-izoGln), 3,44-4,05 (m, 8 H, βCH₂-Ser, H-C4,5,6,2,3-Mur), 4,05-4,40 (m, 3 H, αCH-Ser, αCH-izoGln, O-CH₂-CO), 4,52; 4,72

(dd, 2 H, $CH_2C_6H_5$), 4,94 (d, $J = 3,41$ Hz, 1 H, H-1-Mur), 5,21 (t, 1 H, OH), 5,70 (s, 1 H, CHC_6H_5), 7,18; 7,24 (2s, 2 H, $CONH_2$), 7,3-7,48 (m, 10 H, C_6H_5), 7,59 (d, $J = 7,33$ Hz, 1 H, NH-Ser), 8,17 (d, $J = 8,3$ Hz, 1 H, NHAc), 8,32 (d, $J = 7,82$ Hz, 1 H, NH-izoGln).

5.1.6.5. Synteza nor-MurNAc(α -Bn-4,6-O-Bzi)-D-Val-D-izoGln(Ot-Bu) (58j)

Z 1,009 g (2,14 mmola) związku **46**, 0,779 g (2,58 mmola) D-Val-D-izoGln(Ot-Bu) (**57e**) otrzymano 1,268 g (1,71 mmola) nor-MurNAc(α -Bn-4,6-O-Bzi)-D-Val-D-izoGln(Ot-Bu) (**58j**). Związek oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie E, wyd. 80%, temp. top. 225-226°C.

1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 0,75 (dd, $J = 6,84$ Hz, 7 H, $CH(CH_3)_2$), 1,38 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$), 1,7-1,95 (m, 3 H, βCH_2 -izoGln, βCH -Val), 1,89 (s, 3 H, CH_3CO), 2,19 (m, 2 H, γCH_2 -izoGln), 3,7-4,15 (m, 6 H, H-C4,5,6,2,3-Mur), 4,1-4,25 (m, 4 H, αCH -Val, αCH -izoGln, O- CH_2CO), 4,52; 4,73 (dd, 2 H, $CH_2C_6H_5$), 4,93 (d, $J = 2,93$ Hz, 1 H, H-1-Mur), 5,71 (s, 1 H, CHC_6H_5), 7,0; 7,24 (2s, 2 H, $CONH_2$), 7,3-7,5 (m, 11 H, C_6H_5 , NH-Val), 8,18 (d, $J = 7,81$ Hz, 1 H, NHAc), 8,38 (d, $J = 7,81$ Hz, 1 H, NH-izoGln).

5.1.7. Synteza podstawionych muramylodipeptydów i nor-muramylodipeptydów bez osłon *tert*-butylowej i benzyliденowej

Podstawiony MDP lub nor-MDP umieszczono w kolbce i zalano 90% kwasem trifluoroctowym (TFA) (Schemat 5). Roztwory związków w TFA wstawiono do lodówki (temp. 5°C) na okres ok. 30 min. Zakończenie reakcji sprawdzono metodą TLC w układzie G. TFA odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem a pozostałość zalano 3-krotnie eterem dietylowym. Eter dietylowy każdorazowo dekantowano, a na koniec zalano jeszcze raz tym rozpuszczalnikiem i wstawiono do lodówki na całą noc. Następnego dnia odsączono produkt w postaci osadu. Do celów analitycznych produkty oczyszczano za pomocą chromatografii preparatywnej na płytkach TLC w układzie G.

5.1.7.1. Synteza MurNAc(α -Bn)-D-Ala-D-izoGln (59a) [225]

Z 1,435 g (1,97 mmola) MurNAc(α -Bn-4,6-O-Bzi)-D-Ala-D-izoGln(Ot-Bu) (**58a**) w 3,94 ml 90% TFA otrzymano 1,08 g (1,90 mmola) związku **59a**, wyd. 94%.

5.1.7.2. Synteza MurNAc(α -Bn)-D-2-ABA-D-izoGln (59b)

Z 0,350 g (0,47 mmola) MurNAc(α -Bn-4,6-*O*-Bzi)-D-2-ABA-D-izoGln(*Ot*-Bu) (**58b**) w 0,95 ml 90% TFA otrzymano 0,270 g (0,46 mmola) związku **59b**, wyd. 96%.

5.1.7.3. Synteza MurNAc(α -Bn)-D-Pro-D-izoGln (59c)

Z 373 mg (0,49 mmola) MurNAc(α -Bn-4,6-*O*-Bzi)-D-Pro-D-izoGln(*Ot*-Bu) (**58c**) w 1 ml 90% TFA otrzymano 0,256 g (0,43 mmola) związku **59c**, wyd. 88%.

5.1.7.4. Synteza MurNAc(α -Bn)-D-Ser-D-izoGln (59d)

Z 0,200 g (0,26 mmola) MurNAc(α -Bn-4,6-*O*-Bzi)-D-Ser-D-izoGln(*Ot*-Bu) (**58d**) w 0,27 ml 90% TFA otrzymano 0,129 g (0,216 mmola) związku **59d**, wyd. 83%.

5.1.7.5. Synteza MurNAc(α -Bn)-D-Val-D-izoGln (59e)

Z 0,841 g (1,11 mmola) MurNAc(α -Bn-4,6-*O*-Bzi)-D-Val-D-izoGln(*Ot*-Bu) (**58e**) w 2,2 ml 90% TFA otrzymano 0,634 g (1,04 mmola) związku **59e**, wyd. 93%.

5.1.7.6. Synteza nor-MurNAc(α -Bn)-D-Ala-D-izoGln (59f)

Z 2,702 g (3,79 mmola) nor-MurNAc(α -Bn-4,6-*O*-Bzi)-D-Ala-D-izoGln(*Ot*-Bu) (**58f**) w 7,6 ml 90% TFA otrzymano 2,035 g (3,58 mmola) związku **59f**, wyd. 94%.

5.1.7.7. Synteza nor-MurNAc(α -Bn)-D-2-ABA-D-izoGln (59g)

Z 0,518 g (0,71 mmola) nor-MurNAc(α -Bn-4,6-*O*-Bzi)-D-2-ABA-D-izoGln(*Ot*-Bu) (**58g**) w 1,4 ml 90% TFA otrzymano 0,355 g (0,61 mmola) związku **59g**, wyd. 86%.

5.1.7.8. Synteza nor-MurNAc(α -Bn)-D-Pro-D-izoGln (59h)

Z 0,350 g (0,47 mmola) nor-MurNAc(α -Bn-4,6-*O*-Bzi)-D-Pro-D-izoGln(*Ot*-Bu) (**58h**) w 0,95 ml 90% TFA otrzymano 0,255 g (0,42 mmola) związku **59h**, wyd. 91%.

5.1.7.9. Synteza nor-MurNAc(α -Bn)-D-Ser-D-izoGln (**59i**)

Z 0,240 g (0,33 mmola) nor-MurNAc(α -Bn-4,6-*O*-Bzi)-D-Ser-D-izoGln(*O*-Bu) (**58i**) w 0,66 ml 90% TFA otrzymano 0,177 g (0,30 mmola) związku **59i**, wyd. 92%.

5.1.7.10. Synteza nor-MurNAc(α -Bn)-D-Val-D-izoGln (**59j**)

Z 1,718 g (2,32 mmola) nor-MurNAc(α -Bn-4,6-*O*-Bzi)-D-Val-D-izoGln(*O*-Bu) (**58j**) w 4,65 ml 90% TFA otrzymano 1,204 g (2,02 mmola) związku **59j**, wyd. 87%.

5.2. Synteza koniugatów podstawionych MDP i nor-MDP z adenozyną

5.2.1. Synteza N^6 -(2-aminoetylo)adenozyny (**61**)

Sporządzono roztwór 150 mg (0,52 mmola) rybozydu 6-chloropuryny w 4 ml wody. Kolbkę ze związkiem umieszczono w łaźni lodowej, na mieszadle magnetycznym. Następnie dodano 0,546 ml (8,18 mmola) 1,2-diaminoetanu i mieszano 3 godz. w temp. pok.. Po tym czasie przesączono wytrącony osad, który przemyto wodą oraz etanolem. Otrzymano 150 mg N^6 -(2-aminoetylo)adenozyny (**61**) w postaci białego proszku, wyd. 93%, MALDI-TOF-MS $[M+H]^+$ obliczona: 311,1; znaleziona: 311,1.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ 3,06 (d, $J = 5,37$ Hz, 2 H, CH_2NH_2), 3,54; 3,66 (dd, $J = 3,9; 8,3$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{-}5'\text{-Ado}$), 3,72 (br s, 2 H, NHCH_2), 3,95 (q, $J = 3,4$ Hz, 1 H, H-4'-Ado), 4,13 (q, 1 H, H-3'-Ado), 4,58 (t, $J = 5,86; 5,37$ Hz, 1 H, H-2'-Ado), 5,18 (br s, 3 H, C2'-OH-Ado, C3'-OH-Ado, C5'-OH-Ado), 5,89 (d, $J = 5,86$ Hz, 1 H, H-1'-Ado), 7,88 (s, 2 H, NH_2), 8,02 (t, $J = 5,86; 5,37$ Hz, 1 H, NH-Ado), 8,26 (s, 1 H, H-8-Ado), 8,42 (s, 1 H, H-2-Ado). MALDI-TOF-MS $[M+H]^+$ obliczona: 875,4; znaleziona: 875,3.

5.2.2. Synteza koniugatów podstawionych MDP i nor-MDP z adenozyną poprzez łącznik aminoetylowy (**62a-k**)

Do roztworu pochodnej MDP lub nor-MDP (**74a-j**) (0,26 mmol) w 2 ml bezwodnego DMF ochłodzonego do temperatury 0°C dodano EDCI (55 mg, 0.286 mmol) i HOBt (39 mg, 0.286 mmol). Po 30 min. do mieszaniny reakcyjnej dodano roztwór związku **75** (80 mg, 0.26 mmol) w 1 ml bezwodnego DMF. Reakcję

kontynuowano mieszając 2 godz. w temperaturze 0°C, a następnie w temperaturze pokojowej przez 48 godz. Po tym czasie odparowano rozpuszczalniki i produkt oczyszczano stosując ekstrakcję do fazy stałej (SPE) w układzie faz normalnych. Doczyszczano metodą chromatografii preparatywnej na płytkach TLC w układzie CHCl₃/MeOH/H₂O (6:3:0.7, v/v).

5.2.2.1. Synteza *N*⁶-[*N*²-(MurNAc(α -Bn)-D-Ala-D-izoGln)aminoetylo]adenozyny (62a)

Wydajność: 32%; temp. top. 86-88°C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ 1,26 (m, 6 H, CH₃-Mur, β CH₃-Ala), 1,70-1,80 (m, 1 H, β CH₂-izoGln), 1,81 (s, 3 H, CH₃CO), 1,84-1,98 (m, 1 H, β CH₂-izoGln), 2,05-2,13 (m, 2 H, γ CH₂-izoGln), 3,18-3,40 (m, 4 H, NHCH₂, H-4-Mur, CH₂-5'-Ado), 3,42-3,57 (m, 6 H, CH₂NH, H-3,5-Mur, CH₂-6-Mur, CH₂-5'-Ado), 3,59-3,70 (m, 2 H, CH₂-6-Mur, H-4'-Ado), 3,95 (d, *J* = 3,4 Hz, 1 H, H-3'-Ado), 4,10-4,20 (m, 2 H, α CH-izoGln, O-CH(CH₃)CO), 4,33 (t, *J* = 6,8, 1 H, α CH-Ala), 4,40 (d, *J* = 12,7 Hz, 1 H, CH₂C₆H₅), 4,45 (m, 1 H, H-2-Mur), 4,59 (m, 1 H, H-2'-Ado), 4,64 (d, *J* = 12,7 Hz, 1 H, CH₂C₆H₅), 4,67 (s, 1 H, C6-OH), 4,82 (d, *J* = 3,4 Hz, 1 H, H-1-Mur), 5,26; 5,42; 5,52 (3 br s, 4 H, C3'-OH-Ado, C5'-OH-Ado, C4-OH, C2'-OH-Ado), 5,87 (d, *J* = 6,3 Hz, 1 H, H-1'-Ado), 7,08; 7,27 (s, s, 2 H, CONH₂), 7,27-7,40 (m, 5 H, C₆H₅), 7,80 (d, *J* = 7,3 Hz, 1 H, NH-Ala), 7,89 (m, 1 H, NH-izoGln), 7,95 (m, 1 H, NHCH₂), 8,11 (d, *J* = 7,8 Hz, 1 H, NH-Ado), 8,20 (s, 1 H, H-2-Ado), 8,32 (d, *J* = 7,3 Hz, 1 H, NHAc), 8,34 (s, 1 H, H-8-Ado). MALDI-TOF-MS [M+H]⁺ obliczona: 875,4; znaleziona: 875,3.

5.2.2.2. Synteza *N*⁶-[*N*²-(MurNAc(α -Bn)-D-2-ABA-D-izoGln)aminoetylo]adenozyny (62b)

Wydajność: 30%; temp. top. 65-68°C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ 1,24 (m, 3 H, CH₃-Mur), 1,58-1,75 (m, 4 H, γ CH₃-2-ABA, β CH₂-izoGln), 1,80-1,92 (m, 4 H, β CH₂-izoGln, CH₃CO), 2,05-2,16 (m, 4 H, β CH₂-2-ABA, γ CH₂-izoGln), 3,00-3,12 (m, 1 H, α CH-2-ABA), 3,13-3,72 (m, 11 H, NHCH₂, CH₂NH, CH₂-5'-Ado, H-3,4,5-Mur, CH₂-6-Mur, H-4'-Ado), 3,94 (d, *J* = 3,4 Hz, 1 H, H-3'-Ado), 4,10-4,18 (m, 2 H, α CH-izoGln, O-CH(CH₃)CO), 4,32 (qr, *J* = 6,3 Hz, 1 H, H-2-Mur), 4,40 (d, *J* = 12,2 Hz, 1 H, CH₂C₆H₅), 4,54-4,60 (m, 2 H, H-2'-Ado, C6-OH), 4,64 (d, *J* = 12,7 Hz, 1 H, CH₂C₆H₅), 4,83 (d, *J* = 3,4 Hz, 1 H, H-1-Mur), 5,86 (d, *J* = 5,8 Hz, 1 H, H-1'-Ado), 6,98; 7,27 (s, m, 2 H, CONH₂), 7,26-7,39 (m, 5 H, C₆H₅), 7,64-7,69 (m, 1 H,

NH-2-ABA), 7,9 (s, 1 H, NH-izoGln), 7,98-8,07 (m, 2 H, *NHCH*₂, NH-Ado), 8,21 (s, 1 H, H-2-Ado), 8,35 (d, *J* = 7,3 Hz, 2 H, NHAc, H-8-Ado). MALDI-TOF-MS [M+H]⁺ obliczona: 889,4; znaleziona: 889,3.

5.2.2.3. Synteza *N*⁶-[*N*²-(MurNAc(α -Bn)-D-Pro-D-izoGln)aminoetylo]adenozyny (62c)

Wydajność: 27%; temp. top. 63-65°C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ 1,26 (m, 6 H, CH₃-Mur), 1,70-1,94; 2,02-2,15 (m, m, 8 H, β CH₂-izoGln, γ CH₂-Pro, β CH₂-Pro, γ CH₂-izoGln), 1,81 (s, 3 H, CH₃CO), 1,84-1,98 (m, 1 H, β CH₂-izoGln), 2,05-2,13 (m, 2 H, γ CH₂-izoGln), 3,15-3,70 (m, 14 H, *NHCH*₂, γ CH₂-Pro, H-3,4,5-Mur, CH₂-5'-Ado, CH₂NH, CH₂-6-Mur, H-4'-Ado), 3,95 (d, *J* = 2,9 Hz, 1 H, H-3'-Ado), 4,08-4,16 (m, 3 H, α CH-izoGln, O-CH(CH₃)CO, α CH-Pro), 4,33 (t, *J* = 6,8, 1 H, α CH-Ala), 4,40 (d, *J* = 12,2 Hz, 2 H, CH₂C₆H₅, H-2-Mur), 4,58-4,68 (m, 2 H, H-2'-Ado, C6-OH), 4,62 (d, *J* = 12,7 Hz, 1 H, CH₂C₆H₅), 5,05 (d, *J* = 2,9 Hz, 1 H, H-1-Mur), 5,26-5,62 (m, 4 H, C3'-OH-Ado, C5'-OH-Ado, C4-OH, C2'-OH-Ado), 5,87 (d, *J* = 5,8 Hz, 1 H, H-1'-Ado), 7,08; 7,21 (s, s, 2 H, CONH₂), 7,24-7,40 (m, 5 H, C₆H₅), 7,86-7,95 (m, 2 H, NH-izoGln, *NHCH*₂), 8,08 (d, *J* = 8,3 Hz, 1 H, NH-Ado), 8,21 (s, 1 H, H-2-Ado), 8,35 (s, 1 H, H-8-Ado), 8,39 (d, *J* = 3,9 Hz, 1 H, NHAc). MALDI-TOF-MS [M+H]⁺ obliczona: 901,4; znaleziona: 901,5.

5.2.2.4. Synteza *N*⁶-[*N*²-(MurNAc(α -Bn)-D-Ser-D-izoGln)aminoetylo]adenozyny (62d)

Wydajność: 28%; temp. top. 88-90°C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ 1,20-1,30 (m, 3 H, CH₃-Mur), 1,70-1,88 (m, 1 H, β CH₂-izoGln), 1,78 (s, 3 H, CH₃CO), 1,90-2,04 (m, 1 H, β CH₂-izoGln), 2,05-2,17 (m, 2 H, γ CH₂-izoGln), 3,14-3,40 (m, 4 H, *NHCH*₂, H-4-Mur, CH₂-5'-Ado), 3,42-3,70 (m, 8 H, CH₂NH, H-3,5-Mur, CH₂-6-Mur, CH₂-5'-Ado, H-4'-Ado), 3,70-3,78 (m, 2 H, β CH₂-Ser), 3,95 (s, 1 H, H-3'-Ado), 4,10-4,20 (m, 2 H, α CH-izoGln, O-CH(CH₃)CO), 4,40 (d, *J* = 12,2 Hz, 1 H, CH₂C₆H₅), 4,40-4,45 (m, 1 H, α CH-Ser), 4,51 (qr, *J* = 6,8 Hz, 1 H, H-2-Mur), 4,56-4,62 (m, 1 H, H-2'-Ado), 4,64 (d, *J* = 11,2 Hz, 1 H, CH₂C₆H₅), 4,62-4,70 (m, 1 H, C6-OH), 4,76 (d, *J* = 1,9 Hz, 1 H, H-1-Mur), 5,21-5,53 (s, s, s, m, s, 5 H, C3'-OH-Ado, C5'-OH-Ado, C4-OH, C2'-OH-Ado, OH-Ser), 5,87 (d, *J* = 5,8 Hz, 1 H, H-1'-Ado), 7,08-7,43 (m, 7 H, CONH₂, C₆H₅), 7,72 (d, *J* = 7,8 Hz, 1 H, NH-Ser), 7,86-7,95 (m, 1 H, NH-izoGln), 7,96-8,00 (m, 1 H, *NHCH*₂), 8,08-8,14 (m, 1 H, NH-Ado), 8,21 (s, 1 H, H-2-Ado), 8,29

(d, $J = 7,8$ Hz, 1 H, NHAc), 8,35 (s, 1 H, H-8-Ado); ^{13}C NMR (500 MHz, DMSO): δ 19,98; 20,13; 23,21; 23,38; 28,09; 32,52; 53,14; 53,41; 55,02; 61,04; 62,34; 62,80; 68,61; 71,32; 73,91; 74,18; 76,63; 78,21; 86,58; 88,62; 96,41; 128,14; 128,48; 128,93; 138,43; 140,52; 170,01; 170,82; 171,12; 172,46; 173,89; 174,27. MALDI-TOF-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ obliczona: 891,4; znaleziona: 891,3.

5.2.2.5. Synteza N^6 -[N^2 -(MurNAc(α -Bn)-D-Val-D-izoGln)aminoetylo]adenozyny (62e)

Wydajność: 29%; temp. top. 152-154°C; ^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 0,81 (dd, $J = 6,8$ Hz, 6 H, $\gamma(\text{CH}_3)_2$ -Val), 1,24 (d, $J = 6,8$ Hz, 3 H, CH_3 -Mur), 1,73-1,92 (m, 2 H, βCH_2 -izoGln), 1,81 (s, 3 H, CH_3CO), 1,98 (q, $J = 6,8$ Hz, 1 H, βCH -Val), 2,05-2,13 (m, 2 H, γCH_2 -izoGln), 3,15-3,40 (m, 4 H, NHCH_2 , H-4-Mur, CH_2 -5'-Ado), 3,41-3,57 (m, 6 H, CH_2NH , H-3,5-Mur, CH_2 -6-Mur, CH_2 -5'-Ado), 3,59-3,70 (m, 2 H, CH_2 -6-Mur, H-4'-Ado), 3,95 (dd, $J = 3,4$ Hz, 1 H, H-3'-Ado), 4,10-4,14 (m, 3 H, αCH -izoGln, O- $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CO}$), 4,15-4,21 (m, 1 H, αCH -Val), 4,29 (dt, $J = 2,4$; $J = 7,6$ Hz, 1 H, H-2-Mur), 4,38 (d, $J = 12,7$ Hz, 1 H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 4,55-4,61 (m, 2 H, H-2'-Ado, C6-OH), 4,64 (d, $J = 12,7$ Hz, 1 H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 4,82 (d, $J = 2,9$ Hz, 1 H, H-1-Mur), 5,42 (br s, 4 H, C3'-OH-Ado, C5'-OH-Ado, C2'-OH-Ado, C4-OH), 5,87 (d, $J = 5,8$ Hz, 1 H, H-1'-Ado), 7,05; 7,26 (s, m, 2 H, CONH_2), 7,24-7,39 (m, 5 H, C_6H_5), 7,68 (m, 1 H, NH-Val), 7,88 (br s, 1 H, NH-izoGln), 7,95 (t, $J = 5,8$ Hz, 1 H, NHCH_2), 8,16 (d, $J = 7,3$ Hz, 1 H, NH-Ado), 8,21 (s, 1 H, H-2-Ado), 8,19 (d, $J = 7,8$ Hz, 1 H, NHAc), 8,34 (s, 1 H, H-8-Ado). MALDI-TOF-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ obliczona: 903,4; znaleziona: 903,2.

5.2.2.6. Synteza N^6 -[N^2 -(nor-MurNAc(α -Bn)-D-Ala-D-izoGln)aminoetylo]adenozyny (62f)

Wydajność: 35%; temp. top. 148-151°C; ^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 1,22 (d, $J = 5,4$ Hz, 3 H, βCH_3 -Ala), 1,70-1,78 (m, 1 H, βCH_2 -izoGln), 1,84 (s, 3 H, CH_3CO), 1,83-1,92 (m, 1 H, βCH_2 -izoGln), 2,02-2,10 (m, 2 H, γCH_2 -izoGln), 3,20-3,41 (m, 4 H, NHCH_2 , H-4-Mur, CH_2 -5'-Ado), 3,45-3,57 (m, 6 H, CH_2NH , H-3,5-Mur, CH_2 -6-Mur, CH_2 -5'-Ado), 3,62-3,69 (m, 2 H, CH_2 -6-Mur, H-4'-Ado), 3,82 (dt, $J = 3,4$; $J = 7,8$ Hz, 1 H, H-2-Mur), 3,94 (d, $J = 2,4$ Hz, 1 H, H-3'-Ado), 4,10 (m, 1 H, αCH -izoGln), 4,10; 4,20 (d, d, $J = 16,1$; $J = 16,1$ Hz, O- CH_2CO), 4,28 (quin, $J = 6,8$ Hz, 1 H, αCH -Ala), 4,42 (d, $J = 12,2$ Hz, 1 H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 4,58 (t, $J = 5,4$ Hz, 1 H, H-2'-Ado), 4,65 (d, $J = 12,7$ Hz, 1 H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 4,64-4,72 (m, 1 H, C6-OH), 4,71 (d, $J = 2,9$ Hz, 1 H,

H-1-Mur), 5,30; 5,40; 5,55 (br s, br s, br s, 4 H, C3'-OH-Ado, C5'-OH-Ado, C4-OH, C2'-OH-Ado), 5,86 (d, $J = 6,3$ Hz, 1 H, H-1'-Ado), 7,04; 7,28 (s, m, 2 H, CONH₂), 7,25-7,39 (m, 5 H, C₆H₅), 7,88 (br s, 1 H, NH-Ado), 7,92 (t, $J = 5,4$ Hz, 1 H, NHCH₂), 8,09 (d, $J = 7,8$ Hz, 1 H, NH-izoGln), 8,16 (d, $J = 7,8$ Hz, 1 H, NHAc), 8,20 (s, 1 H, H-2-Ado), 8,34 (s, 1 H, H-8-Ado). MALDI-TOF-MS [M+H]⁺ obliczona: 861,4; znaleziona: 861,3.

5.2.2.7. Synteza N⁶-[N²-(nor-MurNAc(α -Bn)-D-2-ABA-D-izoGln)aminoetylo]- adenozyny (62g)

Wydajność: 33%; temp. top. 152-153°C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ 1,58-1,73 (m, 4 H, γ CH₃-2-ABA, β CH₂-izoGln), 1,80-1,90 (m, 4 H, β CH₂-izoGln, CH₃CO), 2,05-2,10 (m, 2 H, β CH₂-2-ABA) 2,11-2,26 (m, 2 H, γ CH₂-izoGln), 3,00-3,12 (m, 1 H, α CH-2-ABA), 3,20-3,40 (m, 4 H, NHCH₂, H-4-Mur, CH₂-5'-Ado), 3,42-3,57 (m, 6 H, CH₂NH, H-3,5-Mur, CH₂-6-Mur, CH₂-5'-Ado), 3,60-3,70 (m, 2 H, CH₂-6-Mur, H-4'-Ado), 3,83 (dt, $J = 3,4$; $J = 2,9$ Hz, 1 H, H-2-Mur), 3,94 (d, $J = 2,9$ Hz, 1 H, H-3'-Ado), 4,05-4,18 (m, 2 H, α CH-izoGln, O-CH₂CO), 4,42 (d, $J = 12,2$ Hz, 1 H, CH₂C₆H₅), 4,58 (br s, 1 H, H-2'-Ado), 4,66 (d, $J = 12,2$ Hz, 1 H, CH₂C₆H₅), 4,69 (d, $J = 3,9$ Hz, 1 H, H-1-Mur), 5,28; 5,40; 5,54 (s, m, s, 3 H, C3'-OH-Ado, C5'-OH-Ado, C2'-OH-Ado), 5,87 (d, $J = 6,3$ Hz, 1 H, C4-OH), 5,97 (d, $J = 5,3$ Hz, 1 H, H-1'-Ado), 6,99; 7,28 (s, m, 2 H, CONH₂), 7,28-7,39 (m, 5 H, C₆H₅), 7,88 (br s, 1 H, H-2-Ado), 7,92-8,00 (m, 3 H, NHCH₂, NH-2-ABA, NH-izoGln), 8,15 (d, $J = 6,8$ Hz, 1 H, NHAc), 8,20 (s, 1 H, H-2-Ado), 8,34 (s, 1 H, H-8-Ado). MALDI-TOF-MS [M+H]⁺ obliczona: 875,4; znaleziona: 875,1.

5.2.2.8. Synteza N⁶-[N²-(nor-MurNAc(α -Bn)-D-Pro-D-izoGln)aminoetylo]- adenozyny (62h)

Wydajność: 46%; temp.top. 93-96°C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ 1,70-1,80 (m, 1 H, β CH₂-izoGln), 1,82 (s, 3 H, CH₃CO), 1,80-1,95 (m, 2 H, γ CH₂-Pro), 1,95-2,04 (m, 1 H, β CH₂-izoGln), 2,04-2,18 (m, 2 H, γ CH₂-izoGln), 3,20-3,40 (m, 6 H, NHCH₂, H-4-Mur, CH₂-5'-Ado, δ CH₂-Pro), 3,40-3,57 (m, 6 H, CH₂NH, H-3,5-Mur, CH₂-6-Mur, CH₂-5'-Ado), 3,58-3,70 (m, 3 H, CH₂-6-Mur, H-4'-Ado, H-2-Mur), 3,94 (d, $J = 3,4$ Hz, 1 H, H-3'-Ado), 4,08-4,15 (m, 3 H, α CH-izoGln, O-CH₂CO), 4,32-4,38 (m, 1 H, α CH-Pro), 4,41 (d, $J = 12,2$ Hz, 1 H, CH₂C₆H₅), 4,49 (s, 1 H, C6-OH), 4,58 (m, 1 H, H-2'-Ado), 4,64 (d, $J = 12,2$ Hz, 1 H, CH₂C₆H₅), 4,64-4,72 (m, 1 H, C6-OH), 4,81 (d, J

= 3,4 Hz, 1 H, H-1-Mur), 5,40; 5,64 (m, s, 4 H, C3'-OH-Ado, C5'-OH-Ado, C4-OH, C2'-OH-Ado), 5,87 (d, $J = 5,8$ Hz, 1 H, H-1'-Ado), 7,02; 7,19 (s, s, 2 H, CONH₂), 7,25-7,44 (m, 5 H, C₆H₅), 7,85-7,92 (m, 2 H, NH-Ado, NHCH₂), 8,18 (d, $J = 8,3$ Hz, 1 H, NH-izoGln), 8,21 (s, 1 H, H-2-Ado), 8,36 (s, 1 H, H-8-Ado), 8,44 (d, $J = 6,8$ Hz, 1 H, NHAc). MALDI-TOF-MS [M+H]⁺ obliczona: 887,4; znaleziona: 887.

5.2.2.9. Synteza *N*⁶-[*N*²-(nor-MurNAc(α -Bn)-D-Ser-D-izoGln)aminoetylo]- adenozyny (62i)

Wydajność: 30%; temp. top. 67-70°C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ 1,68-1,80 (m, 1 H, β CH₂-izoGln), 1,84 (s, 3 H, CH₃CO), 1,90-2,02 (m, 1 H, β CH₂-izoGln), 2,05-2,18 (m, 2 H, γ CH₂-izoGln), 3,20-3,41 (m, 4 H, NHCH₂, H-4-Mur, CH₂-5'-Ado), 3,45-3,60 (m, 7 H, CH₂NH, H-3,5-Mur, CH₂-6-Mur, CH₂-5'-Ado, β CH₂-Ser), 3,60-3,70 (m, 3 H, CH₂-6-Mur, H-4'-Ado, β CH₂-Ser), 3,78-3,84 (m, 1 H, H-2-Mur), 3,95 (s, 1 H, H-3'-Ado), 4,10-4,25 (m, 3 H, α CH-izoGln, O-CH₂CO), 4,32-4,40 (m, 1 H, α CH-Ser), 4,42 (d, $J = 12,2$ Hz, 1 H, CH₂C₆H₅), 4,58-4,61 (m, 2 H, H-2'-Ado, C6-OH), 4,65 (d, $J = 13,2$ Hz, 1 H, CH₂C₆H₅), 4,72 (s, 1 H, H-1-Mur), 5,18-5,28; 5,38; 5,50 (m, s, s, 4 H, C3'-OH-Ado, C5'-OH-Ado, C2'-OH-Ado, OH-Ser), 5,72 (s, 1 H, C4-OH), 5,88 (d, $J = 5,8$ Hz, 1 H, H-1'-Ado), 7,14; 7,26 (s, m, 2 H, CONH₂), 7,25-7,39 (m, 5 H, C₆H₅), 7,87-7,96 (m, 2 H, NH-Ado, NHCH₂), 7,98 (d, $J = 7,3$ Hz, 1 H, NH-Ser), 8,18 (d, $J = 8,3$ Hz, 1 H, NH-izoGln), 8,22 (d, $J = 8,8$ Hz, 1 H, NHAc), 8,25 (s, 1 H, H-2-Ado), 8,35 (s, 1 H, H-8-Ado); ¹³C NMR (500 MHz, DMSO): δ 22,84; 27,68; 32,17; 52,57; 53,06; 54,68; 60,69; 61,93; 62,05; 68,27; 70,08; 70,83; 70,90; 73,46; 73,76; 80,78; 86,16; 88,20; 96,26; 127,82; 127,96; 128,51; 137,95; 140,09; 152,55; 169,93; 170,16; 170,81; 172,07; 173,54. MALDI-TOF-MS [M+H]⁺ obliczona: 877,4; znaleziona: 877,3.

5.2.2.10. Synteza *N*⁶-[*N*²-(nor-MurNAc(α -Bn)-D-Val-D-izoGln)aminoetylo]- adenozyny (62j)

Wydajność: 48%; temp. top. 146-148°C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ 0,83 (dd, $J = 6,8$ Hz, 6 H, γ (CH₃)₂-Val), 1,70-1,80 (m, 1 H, β CH₂-izoGln), 1,85 (s, 3 H, CH₃CO), 1,81-1,92 (m, 1 H, β CH₂-izoGln), 1,98 (qr, $J = 6,8$ Hz, 1 H, β CH-Val), 2,08 (t, $J = 7,8$ Hz, 2 H, γ CH₂-izoGln), 3,20-3,41 (m, 4 H, NHCH₂, H-4-Mur, CH₂-5'-Ado), 3,46-3,57 (m, 6 H, CH₂NH, H-3,5-Mur, CH₂-6-Mur, CH₂-5'-Ado), 3,62-3,69 (m, 2 H, CH₂-6-Mur, H-4'-Ado), 3,83 (dt, $J = 3,4$ Hz, 1 H, H-2-Mur), 3,96 (dd, $J = 3,4$; $J = 6,3$ Hz, 1 H, H-3'-Ado), 4,08-4,18 (m, 3 H, α CH-izoGln, O-CH₂CO), 4,20-4,37 (m, 1 H,

α CH-Val), 4,42 (d, $J = 12,2$ Hz, 1 H, $CH_2C_6H_5$), 4,58-4,65 (m, 2 H, H-2'-Ado, C6-OH), 4,66 (d, $J = 12,2$ Hz, 1 H, $CH_2C_6H_5$), 4,71 (d, $J = 3,4$ Hz, 1 H, H-1-Mur), 5,19 (d, $J = 3,9$ Hz, 1 H, C3'-OH-Ado), 5,40 (t, $J = 6,8$ Hz, 1 H, C5'-OH-Ado), 5,45 (d, $J = 5,8$ Hz, 1 H, C2'-OH-Ado), 5,83 (d, $J = 5,4$ Hz, 1 H, C4-OH), 5,87 (d, $J = 6,3$ Hz, 1 H, H-1'-Ado), 7,00; 7,26 (s, s, 2 H, $CONH_2$), 7,25-7,39 (m, 5 H, C_6H_5), 7,88 (br s, 1 H, NH-Ado), 7,92 (t, $J = 5,9$ Hz, 1 H, $NHCH_2$), 7,96 (d, $J = 8,3$ Hz, 1 H, NH-Val), 8,11 (d, $J = 7,8$ Hz, 1 H, NH-izoGln), 8,18 (d, $J = 8,8$ Hz, 1 H, NHAc), 8,21 (s, 1 H, H-2-Ado), 8,34 (s, 1 H, H-8-Ado). ES-MS $[M+H]^+$ obliczona: 889,4; znaleziona: 889,7 (Załącznik 3).

5.2.2.11. Synteza N^6 -[N^2 -(MurNAc(α -Bn)-L-Val-D-izoGln)aminoetylo]adenozyny (62k)

Wydajność: 45%; temp. top. 142-145°C; 1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 0,81 (dd, $J = 6,8$ Hz, 6 H, $\gamma(CH_3)_2$ -Val), 1,25 (d, $J = 6,3$ Hz, 3 H, CH_3 -Mur), 1,72-1,90 (m, 2 H, βCH_2 -isoGln), 1,80 (s, 3 H, CH_3CO), 1,98-2,14 (m, 3 H, βCH -Val, γCH_2 -isoGln), 3,15-3,40 (m, 4H, $NHCH_2$, H-4-Mur, CH_2 -5'-Ado), 3,41-3,57 (m, 6 H, CH_2NH , H-3,5-Mur, CH_2 -6-Mur, CH_2 -5'-Ado), 3,59-3,70 (m, 2 H, CH_2 -6-Mur, H-4'-Ado), 3,94 (s, 1 H, H-3'-Ado), 4,14 (br s, 4H, αCH -isoGln, O- $CH(CH_3)CO$, αCH -Val), 4,25 (m, 1 H, H-2-Mur), 4,38 (d, $J = 12,2$ Hz, 1 H, $CH_2C_6H_5$), 4,46 (d, $J = 6,3$ Hz, H-2'-Ado), 4,55 (s, 1 H, C6-OH), 4,65 (d, $J = 12,7$ Hz, 1 H, $CH_2C_6H_5$), 4,81 (s, 1 H, H-1-Mur), 5,87 (d, $J = 4,9$ Hz, 1 H, H-1'-Ado), 7,05; 7,26 (s, m, 2 H, $CONH_2$), 7,24-7,40 (m, 5 H, C_6H_5), 7,78 (d, $J = 6,8$ Hz, 1 H, NH-Val), 7,92 (br s, 1 H, NH-izoGln), 8,02 (s, 1 H, $NHCH_2$), 8,21 (s, 1 H, H-2-Ado), 8,28 (d, $J = 6,3$ Hz, 1 H, NH-Ado), 8,36 (s, 1 H, H-8-Ado), 8,45 (s, 1 H, NHAc), MALDI-TOF-MS $[M+H]^+$ obliczona: 903,4; znaleziona: 903,2.

5.2.3. Synteza kwasu N -benzyloksykarbonylo-6-aminoheksanowego (64)

Kwas N -benzyloksykarbonylo-6-aminoheksanowy (64) został zsyntetyzowany według metody dla otrzymywania Z -D-Glu (49) podanej w punkcie 5.1.2.1.1.

Z 6,69 g (50 mmoli) kwasu 6-aminoheksanowego (47) otrzymano 7,950 g (30 mmoli) kwasu N -benzyloksykarbonylo-6-aminoheksanowego (64) (wyd. 60%), temp. top. 53-55°C.

1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 1,24 (m, 2 H, CH_2 -4-Aha), 1,38 (quin, $J = 6,8$; $J = 7,3$ Hz, 2 H, CH_2 -5-Aha), 1,47 (quin, $J = 7,3$ Hz, 2 H, CH_2 -3-Aha), 2,17 (t, $J = 7,3$ Hz, 2 H,

CH₂-2-Aha), 2,96 (q, $J = 6,3$; $J = 6,8$ Hz, 2 H, CH₂-6-Aha), 4,99 (s, 1 H, CH₂C₆H₅), 7,20-7,39 (m, 5 H, C₆H₅), 11,99 (s, 1 H, NH).

Lit.: 53-55°C [226].

5.2.4. Synteza bezwodnika kwasu *N*-benzyloksykarbonylo-6-aminoheksanowego (65)

200 mg (0,74 mmola) Z-6-Aha (64) rozpuszczono w 3 ml bezwodnego dichlorometanu. Tak przygotowany roztwór wstawiono do łaźni lodowej i mieszano na mieszadle magnetycznym w atmosferze azotu. Następnie dodawano kroplami wcześniej przygotowany roztwór 100 mg (0,48 mmola) DCC w 4,5 ml bezwodnym dichlorometanie, ochłodzonym w łaźni lodowej. Po ok. 5 min. z roztworu zaczął wytrącać się dicykloheksylomocznik. Kiedy skończono dodawać DCC pozostawiono mieszaninę reakcyjną do powolnego ogrzania się do temp. pok., mieszano całą noc. Powstały osad przesączono, przemyto 10 ml heksanu. Filtrat zagęszczono odparowując rozpuszczalniki na wyparce obrotowej, uzyskując bezwodnik kwasu *N*-benzyloksykarbonylo-6-aminoheksanowego (65) w postaci białego osadu z wydajnością 99% (187 mg, 0,365 mmola) [212].

5.2.5. Synteza *N*⁶-[*N*-(benzyloksykarbonylo)-6-aminoheksanoilo]adenozyny (67)

106 mg (0,4 mmola) adenozyne (1) osuszono przez trzykrotne odparowanie z bezwodnej pirydyny na wyparce obrotowej. Za trzecim razem odparowywano przez 1 godz. Następnie rozpuszczono adenozyne w 3 ml bezwodnej pirydyny, ochłodzono w łaźni lodowej i do mieszanego roztworu dodawano powoli TMSCl (0,45 ml, 3,5 mmola). Po zakończeniu dodawania mieszano dalej 1 godz. w temp. pok. Po tym czasie roztwór ochłodzono ponownie do 0°C, dodano 512,6 mg (1 mmol) bezwodnika kwasu *N*-benzyloksykarbonylo-6-aminoheksanowego (65) i mieszano w tej temperaturze przez 17 godz. Uwolnienie grup hydroksylowych przeprowadzono przez dodanie 0,4 ml wody i stężonego amoniaku do osiągnięcia pH = 8. Formuje się biały osad, który eliminuje się przez sączenie. Rozpuszczalniki odparowano na wyparce obrotowej. Do powstałego osadu dodano acetonitrylu i ponownie odsączono powstały osad. Przesącz odparowano i związek krystalizowano z chloroformu z dodatkiem metanolu. Do celów analitycznych doczyszczono część produktu za pomocą chromatografii preparatywnej na płytkach TLC w układzie A. Otrzymano biały osad 164 mg (0,32 mmola)

N^6 -(*N*-benzyloksykarbonylo)(6-aminoheksanoilo)adenozyny (**67**), temp. top. 144-146°C, wyd. 80% [210].

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 1,23 (m, 2 H, CH_2 -4-Aha), 1,27-1,32 (m, 2 H, CH_2 -5-Aha), 1,38-1,44 (quin, $J = 7,3$ Hz, 2 H, CH_2 -3-Aha), 1,55-1,59 (t, $J = 7,3$ Hz, 2 H, CH_2 -2-Aha), 1,56 (q, $J = 6,8$ Hz, 2 H, CH_2 -6-Aha), 3,56; 3,65 (ddd, $J = 3,9$; $J = 12,0$; $J = 12,2$ Hz, 2 H, CH_2 -5'-Ado), 3,95 (m, 1 H, H-4'-Ado), 4,15 (m, 1 H, H-3'-Ado), 4,59 (m, 1 H, H-2'-Ado), 4,98 (s, 1 H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 5,10-5,80 (br s, 3 H, C3'-OH-Ado, C5'-OH-Ado, C2'-OH-Ado), 5,95 (d, $J = 4,9$ Hz, 1 H, H-1'-Ado), 7,20-7,39 (m, 5 H, C_6H_5), 8,20 (s, 1 H, H-2-Ado), 8,34 (s, 1 H, H-8-Ado), 8,48-8,64 (br s, 2 H, NH). MALDI-TOF-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ obliczona; 515,2 znaleziona 515,2.

5.2.6. Synteza N^6 -(6-aminoheksanoilo)adenozyny (**68**)

314 mg (0,61 mmola) N^6 -[*N*-(benzyloksykarbonylo)-6-aminoheksanoilo]-adenozyny (**67**) rozpuszczono w 50 ml bezwodnego metanolu i poddano wodorowaniu stosując jako katalizator 10% pallad na węglu. Koniec procesu sprawdzano chromatograficznie na płytkach TLC w układzie A. Następnie zawiesinę przesączono przez podwójny sącdek karbowany, a metanol odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskano 197 mg (0,52 mmola) N^6 -(6-aminoheksylokarbonylo)adenozyny (**68**), (wyd. 85%).

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 1,37 (m, 2 H, CH_2 -4-Aha), 1,27-1,32 (quin, $J = 7,3$, $J = 7,8$, $J = 8,8$ Hz, 4 H, CH_2 -5-Aha, CH_2 -3-Aha), 2,57 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H, CH_2 -2-Aha), 2,74 (t, $J = 7,3$, $J = 7,8$ Hz, 2H, CH_2 -6-Aha), 3,55; 3,66 (dd, $J = 11,7$ Hz, 2 H, CH_2 -5'-Ado), 3,96 (m, 1 H, H-4'-Ado), 4,17 (s, 1 H, H-3'-Ado), 4,60 (s, 1 H, H-2'-Ado), 5,19 (s, 1 H, C3'-OH-Ado), 5,29 (s, 1 H, C5'-OH-Ado), 5,58 (s, 1 H, C2'-OH-Ado), 5,99 (d, $J = 5,8$ Hz, 1 H, H-1'-Ado), 7,25-7,80 (br s, 3 H, NHCO, NH_2), 8,64 (s, 1H, H-2-Ado), 8,70 (s, 1H, H-8-Ado). MALDI-TOF-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ obliczona; 381,2, znaleziona 381,3.

5.2.7. Synteza koniugatów podstawionych MDP i nor-MDP z adenozyną poprzez łącznik 6-aminoheksanoilowy (69a-b)

5.2.7.1. Synteza N^6 -[N^6 -(nor-MurNAc(α -Bn)-D-Ala-D-izoGln)heksanoilo]-adenozyny (69a)

Do roztworu 42 mg (0,074 mmola) nor-MurNAc(α -Bn)-D-Ala-D-izoGln (**59f**) i 31 mg (0,081 mmola) N^6 -(6-aminoheksylokarbonylo)adenozyny (**68**) w 3 ml bezwodnego DMF dodano 0,016 ml (0,074 mmola) DPPA, a następnie 0,021 ml (0,148 mmola) TEA. Roztwór mieszano na mieszadle magnetycznym w temp. 0°C przez 2 godz., a następnie 48 godz. w temp. pok. Po tym czasie odparowano rozpuszczalnik na pompie próżniowej. Uzyskany olej zawieszono w wodzie i oczyszczano stosując ekstrakcję do fazy stałej (SPE) w układzie faz odwróconych, stosując jako eluent wodę z dodatkiem 0,1% TFA, do którego następnie dodawałam stopniowo ACN. Otrzymany produkt doczyszczalam na płytkach TLC w układzie J. Uzyskano 40 mg (0,043 mmola) N^6 -[N^6 -(nor-MurNAc(α -Bn)-D-Ala-D-izoGln)heksanoilo]adenozyny (**69a**), temp. top. 139-140°C, wyd. 58%.

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 1,21 (d, $J = 6,8$ Hz, 3 H, $\beta\text{CH}_3\text{-Ala}$), 1,29 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{-4-Aha}$), 1,38 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{-5-Aha}$), 1,58 (quin, $J = 6,8$; $J = 7,8$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{-3-Aha}$), 1,68-1,78 (m, 1 H, $\beta\text{CH}_2\text{-izoGln}$), 1,84 (s, 3 H, CH_3CO), 1,80-1,92 (m, 1 H, $\beta\text{CH}_2\text{-izoGln}$), 2,06 (m, 2 H, $\gamma\text{CH}_2\text{-izoGln}$), 2,35 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-2-Aha}$), 2,62 (s, 2 H, $\text{CH}_2\text{-6-Aha}$), 3,22-3,60 (m, 5 H, H-4-Mur, H-3-Mur, H-5-Mur, $\text{CH}_2\text{-6-Mur}$), 3,50-3,70 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{-5'-Ado}$), 3,82 (m, 1 H, H-2-Mur), 3,96 (m, 1 H, H-4'-Ado), 4,11 (m, 1 H, $\alpha\text{CH-izoGln}$), 4,08; 4,20 (d, d, $J = 16,1$; $J = 16,1$ Hz, O- CH_2CO), 4,17 (m, 1 H, H-3'-Ado), 4,28 (m, 1 H, $\alpha\text{CH-Ala}$), 4,42 (d, $J = 12,7$ Hz, 1 H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 4,65 (d, $J = 12,2$ Hz, 1 H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 4,60 (t, $J = 5,4$ Hz, 1 H, H-2'-Ado), 4,71 (d, $J = 3,4$ Hz, 1 H, H-1-Mur), 5,15; 5,25; 5,55; 5,80 (4 br s, 4 H, C3'-OH-Ado, C5'-OH-Ado, C4-OH, C2'-OH-Ado), 5,99 (d, $J = 5,9$ Hz, 1 H, H-1'-Ado), 7,04; 7,25 (s, m, 2 H, CONH_2), 7,10-7,39 (m, 5 H, C_6H_5), 7,78 (t, 1 H, NH-Aha), 8,04 (d, $J = 8,3$ Hz, 1 H, NH-izoGln), 8,11 (d, $J = 6,8$ Hz, 1 H, NH-Ala), 8,16 (d, $J = 8,3$ Hz, 1 H, NHAc), 10,7 (br s, 1 H, NH-Ado). MALDI-TOF-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ obliczona; 931,4, znaleziona 931,6.

5.2.7.1. Synteza N^6 -[N^6 -(MurNAc(α -Bn)-D-Ala-D-izoGln)heksanoilo]adenozyny (69b)

Postępowano wg procedury opisanej w punkcie 5.2.7.1.

Z 104 mg (0,178 mmola) MurNAc(α -Bn)-D-Ala-D-izoGln (**59a**) oraz 75 mg (0,195 mmola) N^6 -(6-aminoheksylokarbonylo)adenozyny (**68**) uzyskano 93 mg (0,098 mmola) N^6 -[N^6 -(MurNAc(α -Bn)-D-Ala-D-izoGln)heksylokarbonylo]adenozyny (**69b**), temp. top. 136-138°C, wyd. 55%.

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 1,25 (m, 6 H, CH_3 -Mur, βCH_3 -Ala), 1,28 (m, 2 H, CH_2 -4-Aha), 1,39 (m, 2 H, CH_2 -5-Aha), 1,58 (quin, $J = 6,8$; $J = 7,8$ Hz, 2 H, CH_2 -3-Aha), 1,67-1,77 (m, 1 H, βCH_2 -izoGln), 1,81 (s, 3 H, CH_3CO), 1,81-1,92 (m, 1 H, βCH_2 -izoGln), 2,05 (m, 2 H, γCH_2 -izoGln), 2,34 (s, 2H, CH_2 -2-Aha), 2,61 (s, 2 H, CH_2 -6-Aha), 3,25-3,60 (m, 5 H, H-4-Mur, H-3-Mur, H-5-Mur, CH_2 -6-Mur), 3,50-3,68 (m, 2 H, CH_2 -5'-Ado), 3,96 (m, 1 H, H-4'-Ado), 4,11 (m, 2 H, αCH -izoGln, $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CO}$), 4,18 (m, 1 H, H-3'-Ado), 4,30 (m, 1 H, αCH -Ala), 4,40 (d, $J = 12,7$ Hz, 1 H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 4,43 (m, 1 H, H-2-Mur), 4,65 (d, $J = 12,7$ Hz, 1 H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 4,60 (t, $J = 5,4$ Hz, 1 H, H-2'-Ado), 4,80 (d, $J = 3,4$ Hz, 1 H, H-1-Mur), 5,15; 5,25; 5,55; 5,80 (4 br s, 4 H, C3'-OH-Ado, C5'-OH-Ado, C4-OH, C2'-OH-Ado), 6,00 (d, $J = 5,9$ Hz, 1 H, H-1'-Ado), 7,08; 7,27 (s, m, 2 H, CONH_2), 7,10-7,39 (m, 5 H, C_6H_5), 7,80 (t, 1 H, NH-Aha), 8,07 (d, $J = 6,8$ Hz, 1 H, NH-Ala), 8,12 (d, $J = 8,3$ Hz, 1 H, NH-izoGln), 8,16 (d, $J = 8,3$ Hz, 1 H, NHAc), 11,0 (br s, 1 H, NH-Ado).

MALDI-TOF-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ obliczona; 945,4, znaleziona 945,5.

5.3. Materiały stosowane podczas badań laboratoryjnych

5.3.1. Linie komórkowe

Tabela 4. Charakterystyka stosowanych linii komórkowych

linia	Jurkat, linia pierwotna E6.1	L1210 ¹
organizm	<i>Homo sapiens</i> , człowiek	<i>Mus musculus</i> , mysz
tkanka	krew obwodowa	skóra
typ komórek	T limfocyty	-
morfologia	limfoblastyczna	limfoblastyczna
rodzaj kultury	zawiesinowa	zawiesinowa
	ostra białaczka	
schorzenie	limfoblastyczna z limfocytów T	białaczka limfocytowa

¹linia komórkowa podarowana przez prof. A.Składanowskiego, Katedra Technologii Leków i Biochemii PG

5.3.2. Podłoża hodowlane

Do hodowli komórek stosowano RPMI 1640 z 10% FBS, 100 IU/ml penicyliny oraz 100 µg/ml streptomycyny.

5.4. Metody stosowane w pracy

5.4.1. Uzyskiwanie mononuklearnych komórek krwi obwodowej (PBMC)

PBMC uzyskiwano z kożuszka leukocyтарно-пłytkowego, pochodzącego z RCKiK. Materiał do badań był anonimowy, a dawcy byli zdrowi wg kryteriów RCKiK. Kożuszek leukocyтарно-пłytkowy stanowi składnik krwi powstały z odwirowania krwi pełnej, który zawiera dużą część leukocytów i płytek krwi. PBMC otrzymywano drogą wirowania kożuszka. Krew rozcieńczano buforem PBS w stosunku 1:1 i wirowano przez 15 min przy prędkości 2500 obr./min. Częściowo oddzielony kożuszek leukocyтарny zbierano delikatnie pipetą Pasteura, nawarstwiano na mieszaninę Ficollu i Uropoliny (1:1) i wirowano (10 min., 2500 obr./min.). Po kolejnym zebraniu kożuszka leukocyтарnego przepłukano go dwukrotnie buforem PBS i odwirowywano, a następnie zawieszono w podłożu hodowlanym.

5.4.2. Hodowla linii komórkowych Jurkat i L1210

5.4.2.1. Pasażowanie linii komórkowych

Komórki zawieszane były w podłożu hodowlanym, umieszczane w plastikowych butelkach przeznaczonych do hodowli zawieszinowych i hodowane w cieplarni w 37°C w atmosferze zawierającej 5% CO₂. W celu odmłodzenia hodowli, co dwa dni odwirowywano pożywkę a komórki zawieszano w nowej pożywce. Następnie komórki rozpipetowywano do nowych butelek i uzupełniano pożywką do objętości 10 ml.

5.4.2.2. Rozmrażanie i mrożenie linii komórkowych

Rozmrażanie komórek polegało na ogrzaniu krioampulek z komórkami w temp. 37°C i natychmiastowym odwirowaniu pożywki z DMSO w czasie 4 min. przy 1200 obr./min. Nadsącz zlewano, komórki zawieszano w nowej pożywce i przenoszono do butelki hodowlanej.

W celu zamrożenia komórek odwirowywano je z pożywki (4 min., 1200 obr./min.) i usuwano nadsącz. Komórki zawieszano w pożywce z dodatkiem FBS (10% końcowej objętości) oraz DMSO (10% końcowej objętości), następnie przenoszono do krioampulek. Zamrażano w temp. -80°C, część krioampulek umieszczano w banku komórek w ciekłym azocie.

5.4.3. Test kolorymetryczny MTT

Test kolorymetryczny MTT służył do oceny żywotności komórek.

5.4.3.1. Linie komórkowe

Komórki umieszczano na płytkach 96-dołkowych o płaskim dnie w ilości 1×10^5 /dołek w 100 μ l pożywki. Badane związki rozpuszczano w DMSO aby otrzymać roztwór wyjściowy o stężeniu 10 mg/ml, z wyjątkiem **59j**: 4,3 mg/ml oraz **59e**: 5 mg/ml. Następnie roztwory rozcieńczano seryjnie w pożywce, otrzymując stężenia docelowe (na płytce): 0,000005; 0,00005; 0,0005; 0,005; 0,05; 0,5 mg/ml, dla **59j**: 0,0000021; 0,000021; 0,00021; 0,0021; 0,021; 0,21 mg/ml, dla **59e**: 0,0000025; 0,000025; 0,00025; 0,0025; 0,025; 0,25 mg/ml. Roztwory związków dodawano w ilości 100 μ l/dołek. Zastosowano również stężenie kontrolne zawierające 100 μ l pożywki bez

dotatku związków. W analogiczny sposób przygotowano i dodano na płytkę seryjne rozcieńczenia DMSO (kontrola rozpuszczalnika). Stosowano trzykrotne powtórzenie dla każdego z badanych stężeń. Na każdej płytce przygotowano także dołki z 200 μ l samej pożywki. Komórki inkubowano 48 godz. w temp. 37°C w atmosferze zawierającej 5% CO₂. Następnie do każdego dołka dodano 20 μ l MTT o stężeniu 5 mg/ml. Po 4-godzinnej inkubacji dodano 100 μ l/dołek izopropanolu z 0,4N HCl i wytrząsano płytki przez 15 min., aż do rozpuszczenia kryształków formazanu. Spektrofotometryczny odczyt absorbancji wykonywano przy długości fali 570 nm, przy użyciu czytnika mikroplatek (Perkin Elmer, Victor X4).

5.4.3.2. PBMC

Komórki izolowano wg procedury opisanej w punkcie 5.4.1. i umieszczano na płytkach 96-dołkowych o płaskim dnie w ilości $1,5 \times 10^5$ /dołek w 100 μ l pożywki. Następnie dodawano rozcieńczenia związków, wg schematu opisanego w punkcie 5.4.3.1. dla linii komórkowych. Limfocyty stymulowano za pomocą kulek magnetycznych opłaszczonych przeciwciałami skierowanymi przeciw CD3 oraz CD28 (Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28). Komórki inkubowano 48 godz. w temp. 37°C w atmosferze zawierającej 5% CO₂. Następnie do każdego dołka dodano 20 μ l MTT o stężeniu 5 mg/ml. Po 4-godzinnej inkubacji dodano 100 μ l/dołek izopropanolu z 0,4N HCl i wytrząsano płytki przez 15 min., aż do rozpuszczenia kryształków formazanu. Spektrofotometryczny odczyt absorbancji wykonywano przy długości fali 570 nm, przy użyciu czytnika mikroplatek (Perkin Elmer, Victor X4).

5.4.4. Test inkorporacji tymidyny znakowanej trytem

Stopień proliferacji określano poprzez dodawanie do hodowli komórek [³H]TdR. Do badań wykorzystano płytki 96-dołkowe U-kształtne.

Płytki 96-dołkowe przygotowano analogicznie jak dla testu MTT. Dla linii L1210 wykonano dodatkowe płytki z następującymi rozcieńczeniami związków: 0,05; 0,025; 0,5 mg/ml, dla **59j**: 0,021; 0,105; 0,215 mg/ml, dla **59e**: 0,025; 0,125; 0,25 mg/ml. Płytki inkubowano 72 godz. w temp. 37°C w atmosferze zawierającej 5% CO₂. Na ostatnie 18 godz. dodano sterylny wodny roztwór [³H]TdR w pożywce w ilości 0,5 μ Ci/dołek. Po tym czasie zbierano komórki na bibułę filtracyjną przy użyciu zbieracza komórek (Skatron). Bibułę suszono i poszczególne krążki umieszczano w naczynkach z

płynem scyntylacyjnym. Pomiar aktywności inkorporowanej do komórek tymidyny znakowanej trytem przeprowadzono za pomocą czytnika scyntylacyjnego fazy płynnej (LSC-Beckman), w czasie 5 min./próbkę.

5.5. Obliczanie wartości IC₅₀ oraz EC₅₀

IC₅₀ użyto do określenia żywotności komórek. Wartość ta została obliczona na podstawie wyników testu MTT. IC₅₀ oznacza stężenie związku powodujące śmierć 50% komórek, wyznaczane z liniowego fragmentu zależności absorbancji (OD) od stężenia związku. Do jej obliczenia zastosowano następujące równanie:

$$\% \text{ żywych komórek} = \frac{(OD_z - OD_p)}{(OD_k - OD_p)} \times 100$$

OD_z – średnia absorbancja komórek traktowanych związkiem

OD_k – średnia absorbancja komórek kontrolnych

OD_p – średnia absorbancja pożywki

EC₅₀ to stężenie związku, przy którym proliferacja komórek w hodowli *in vitro* zostaje zahamowana w 50% w stosunku do komórek kontrolnych. Wartość tę wyznaczono na podstawie wyników testu inkorporacji tymidyny znakowanej trytem z liniowego fragmentu zależności radioaktywności (w jednostkach CPM) od stężenia związku. Do jego obliczenia zastosowano następujące równanie:

$$\% \text{ proliferacji komórek} = \frac{(CPM_z - CPM_p)}{(CPM_k - CPM_p)} \times 100$$

CPM_z – średnia radioaktywność komórek traktowanych związkiem

CPM_k – średnia radioaktywność komórek kontrolnych

CPM_p – średnia radioaktywność pożywki

5.6. Analiza statystyczna

W celu określenia znamienności statystycznej różnic w otrzymanych wynikach stosowano test *t*-Studenta, dla $P < 0,05$ (GraphPad Prism, Wersja 6.02). Wartości

średnie i odchylenia standardowe liczone z trzykrotnych powtórzeń dla poszczególnych stężeń.

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI KOŃCOWE

Tematem mojej pracy doktorskiej była synteza oraz badania *in vitro* nowych koniugatów adenozyiny z pochodnymi MDP oraz nor-MDP zawierającymi w części peptydowej D-aminokwasy (D-Ala, D-Val, D-Ser, D-Pro, D-2-ABA) jako potencjalnych związków immunosupresyjnych. MDP jest związkiem aktywującym komórki układu immunologicznego poprzez wiązanie się z białkiem NOD2/CARD15. Białko to znajduje się w komórkach układu immunologicznego, takich jak makrofagi, monocyty, komórki dendrytyczne oraz w komórkach nabłonkowych jelit. W wyniku jego aktywacji dochodzi do ekspresji prozapalnych cytokin, chemokin oraz cząstek adhezyjnych [158, 159, 161]. NOD2 rozpoznaje ligand w sposób stereoselektywny, którego elementem niezbędnym jest fragment cukrowy – MurNAc [227]. Opisywana w literaturze pochodna MDP zawierająca w łańcuchu peptydowym D-alaninę zamiast L-alaniny wykazuje aktywność immunosupresyjną [165]. Nie jest znany mechanizm działania tego związku, ale wiadomo, że nie jest on ligandem białka NOD2/CARD15 [165, 166]. Ponadto badania dowodzą, że MDP(D,D) hamuje wzrost komórek limfoidalnej linii komórkowej ABPL2 w obecności makrofagów [11]. Adenozyina w warunkach stresu metabolicznego hamuje aktywację i proliferację limfocytów poprzez receptory AR [10]. Jej działanie jest krótkotrwałe ze względu na szybki metabolizm. Projektując koniugaty adenozyiny z pochodnymi MDP(D,D) i nor-MDP(D,D) założyłam, że połączenie adenozyiny przez grupę aminową pozwoli przedłużyć jej czas półtrwania we krwi a otrzymane związki wykażą synergistyczne immunosupresyjne działanie.

Na podstawie doniesień literaturowych zaprojektowałam i zsyntetyzowałam po 5 pochodnych MDP(D,D) i nor-MDP(D,D), a następnie 12 koniugatów pochodnych MDP(D,D) i nor-MDP(D,D) z adenozyiną oraz 1 koniugat pochodnej MDP(L,D) z adenozyiną.

W ramach wykonanej pracy uzyskałam następujące rezultaty pracy syntetycznej:

1. W celu otrzymania zaprojektowanych koniugatów, przeprowadziłam kilkuetapową syntezę pochodnych MDP(D,D) i nor MDP(D,D):

- otrzymałam odpowiednio chronione aminokwasy (Z-D-2-ABA, Z-D-Ala, Z-D-Ser, Z-D-Val, Z-D-Pro oraz Z-D-izoGln(*O*-*t*-Bu)) – substraty w syntezie dipeptydów;
 - zsyntetyzowałam odpowiednie dipeptydy metodą mieszanych bezwodników:
 - Z-D-Ala-D-izoGln(*O*-*t*-Bu)
 - Z-D-Val-D-izoGln(*O*-*t*-Bu)
 - Z-D-Pro-D-izoGln(*O*-*t*-Bu)
 - Z-D-Ser-D-izoGln(*O*-*t*-Bu)
 - Z-D-2-ABA-D-izoGln(*O*-*t*-Bu);
 - otrzymałam kwas muraminowy i nor-muraminowy – wykorzystałam metodę zaproponowaną w literaturze. Substratem wyjściowym był chlorowodorek glukozaminy, z którego w wyniku działania alkoholu sodu uwolniłam glukozaminę. Następnie bez wyodrębniania wolnej aminy w reakcji z bezwodnikiem octowym otrzymałam *N*-acetylo-glukozaminę. Z niej z kolei poprzez ogrzewanie w temperaturze 95°C z alkoholem benzylovym zawierającym 2% chlorowodoru otrzymałam glikozyd α -benzylovym, który bez oczyszczania zastosowano do otrzymania 4,6-*O*-benzylideno-1-*O*-benzylo-2-acetamido- α -D-glukopiranozydu.
Kondensację tej pochodnej z kwasem D,L- α -chloropropionowym lub chlorooctowym (w celu otrzymania kwasu nor-muraminowego) przeprowadziłam w obecności NaH.
 - zsyntetyzowałam odpowiednie muramylopeptydy - chronione pochodne kwasu muraminowego lub nor-muraminowego z wolną grupą karboksylową łączyłam z estrami dipeptydów metodą mieszanych bezwodników, stosując chloromrówczan izobutyli i NMM.
2. Opracowałam metodę przyłączenia adenozyiny do otrzymanych muramylopeptydów:
- Próby bezpośredniego połączenia adenozyiny z pochodną MDP(D,D) wiązaniem amidowym nie powiodły się. Przeprowadziłam reakcje z

wykorzystaniem różnych odczynników kondensujących, m.in. EEDQ, DCC, DPPA, HBTU, BOP, EDCI ale żadna z metod nie pozwoliła na uzyskanie oczekiwanego produktu.

- W związku z tym otrzymane pochodne MDP(D,D) i nor-MDP(D,D) łączyłam z adenozyną poprzez łącznik aminoetylowy oraz 6-aminoheksanoilowy. 1,2-diaminoetan przyłączyłam do rybozydu 6-chloropuryny, wykorzystując mechanizm podstawienia nukleofilowego. Adenozyne z łącznikiem 6-aminoheksanoilowym uzyskałam dzięki reakcji bezwodnika chronionego kwasu 6-aminoheksanowego z chronionym *in situ* nukleozydem.
- Uzyskany produkt *N*⁶-(2-aminoetylo)adenozyne połączyłam z pochodnymi MDP(D,D) i nor-MDP(D,D) wiązaniem amidowym (Schemat 7, str. 54). Zastosowany odczynnik kondensujący EDCI pozwolił na uzyskanie koniugatów z wydajnością 27-48%.
- Otrzymałam również 2 koniugaty połączone łącznikiem 6-aminoheksanoilowym z wydajnością 55-58% (Schemat 9, str. 56).

Kolejnym etapem moich badań było określenie w warunkach *in vitro* właściwości cytotoksycznych oraz antyproliferacyjnych otrzymanych związków. Badania przeprowadziłam wobec dwóch limfoidalnych linii komórkowych: Jurkat (pochodzenia ludzkiego) oraz L1210 (pochodzenia mysiego), a także wobec komórek PBMC. Linie komórkowe wywodzące się z limfocytów stanowią odpowiedni model do wstępnych badań nowych związków immunosupresyjnych. Konieczne było także przeprowadzenie badań na komórkach docelowych, jakimi są PBMC.

W ramach wykonanej pracy uzyskałam następujące rezultaty badań

biologicznych:

1. Linia komórkowa Jurkat okazała się oporna na działanie koniugatów. Związki nie wykazały aktywności cytotoksycznej w teście MTT ani właściwości antyproliferacyjnych w teście inkorporacji [³H]TdR.
2. Koniugaty **62a-g**, **62j**, pochodne MDP **59e**, **59f**, **59i**, **59j** oraz adenozyna wykazały aktywność cytotoksyczną wobec linii komórkowej L1210. Najbardziej aktywny był koniugat **62e**, o IC₅₀ = 0,145 ± 0,018 mg/ml (0,161 mM) oraz pochodna nor-MDP **59j** (IC₅₀ = 0,101 ± 0,020 mg/ml (0,170 mM)). Proliferację

komórek linii L1210 hamowały wszystkie koniugaty zawierające łącznik aminoetylowy w stężeniu 0,05 mg/ml, aktywne były również pochodne MDP(D,D) i nor-MDP(D,D). Koniugaty **62a-j** charakteryzowały się słabszą aktywnością antyproliferacyjną niż pochodne MDP(D,D) i nor-MDP(D,D) wobec linii L1220.

3. Ze względu na różnice osobnicze, badania na komórkach docelowych PBMC przeprowadzono pobierając materiał od kilku pacjentów, oznaczając go jako PBMC A, B, C, D, E. Badania potwierdziły, że odpowiedź na terapię pochodnymi MPD wykazuje zróżnicowanie wśród pacjentów. Wobec PBMC A koniugaty nie były cytotoksyczne w stężeniu 0,05 mg/ml, w wyższym stężeniu DMSO wpływał na żywotność komórek. Z kolei wobec PBMC B, można było stwierdzić aktywność cytotoksyczną, z wartościami IC_{50} mieszczącymi się w zakresie 0,212-0,420 mg/ml (dla koniugatów **62a-i**). Aktywność antyproliferacyjną koniugatów można było stwierdzić w 2 z 3 badanych kożuchów PBMC. Koniugaty **62a-j** miały wyższą selektywność wobec PBMC niż pochodne MDP(D,D) i nor-MDP(D,D).
4. Porównując aktywności cytotoksyczne i antyproliferacyjne koniugatów **62a-j** z koniugatami **69a-b** można stwierdzić, że znaczący jest rodzaj łącznika pomiędzy adenozyzną a pochodnymi MDP(D,D) i nor-MDP(D,D). Związki zawierające łącznik 6-aminoheksanoilowy nie wykazały aktywności wobec linii L1210 oraz komórek PBMC.
5. Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze doniesienia, że MDP zawierający w części peptydowej D-aminokwas (D-Ala) zamiast L-alaniny wykazuje aktywność immunosupresyjną. Zbadany koniugat **62k** zawierający L-walinę, nie wykazał aktywności cytotoksycznej i antyproliferacyjnej, bądź aktywność ta była dużo słabsza od koniugatów z D-aminokwasami.
6. Badania wykazały, że koniugaty MDP(D,D) z adenozyzną działają selektywnie wobec różnych linii komórkowych oraz PBMC. Wcześniejsze badania właściwości immunomodulujących koniugatów MDP(L,D) z batracyliną wykazały podobną zależność. Związki te były aktywne wobec linii WEHI 164 a zwiększały żywotność komórek linii K562 oraz Ab [191]. Koniugaty MDP(D,D) z adenozyzną mogą znaleźć zastosowanie jako potencjalne związki immunosupresyjne w zindywidualizowanej terapii, po określeniu wrażliwości danego pacjenta na lek.

7. Do dalszych badań *in vitro* w celu określenia wpływu na produkcję cytokin oraz badań *in vivo* wyselekcjonowano związki **59e**, **59j**, **62b**, **62f**. Kryterium wyboru stanowiły najwyższa selektywność (SI^C) wobec komórek PBMC oraz linii L1210.

7. SUMMARY

Muramyl dipeptide is the smallest part of peptidoglycan with immunomodulative activity. Therefore, many derivatives of MDP have been synthesized in order to gain less toxic agents with better pharmacological properties. Some of them, i.e. Mifamurtide, have been registered as drugs. Besides stimulation of the immune system injection of MDP is pyrogenic and can induce uveitis, arthritis or meningitis. Therefore, many derivatives of MDP have been synthesized in order to gain less toxic agents with better pharmacological properties. However, it was observed that a change of the L-Ala to the D-Ala in a peptide part of MDP entirely alternates its properties. The data showed depression of the humoral response and loss of pyrogenic activity.

There is a choice of immunosuppressive drugs on the market. However, because of their side effects there is a need to look for new compounds.

The objective of this dissertation was to synthesize and evaluate biological activity of the new conjugates of MDP derivatives with adenosine. Adenosine is an antiarrhythmic drug with negative chronotropic and dromotropic action. Adenosine has a short half-life due to rapid metabolization. However, it acts immunosuppressive through A_{2A} receptors that are present on activated effector and regulatory T cells.

The chemical part of the work involved multistep synthesis of muramyl dipeptide derivatives, modified in a peptide part through change of the L-ala to D-amino acid. Firstly, protected dipeptides were obtained using mixed anhydride method. Muramic and nor-muramic acid were synthesized according to literature procedure. Next, 5 MDP(D,D) and 5 nor-MDP(D,D) derivatives were obtained. Adenosine was attached to the free carboxyl group of MDP through aminoethyl or 6-aminohexanoil linker, what resulted in 10 and 2 conjugates, respectively.

Synthesized conjugates were subjected to biological tests. The MTT viability test was used to estimate cytotoxicity of the compounds and the [³H]-thymidine incorporation to evaluate antiproliferative activity. Tests were conducted on two leukemic cell lines: Jurkat (human origin) and L1210 (mouse origin), that are experimental model to study immunosuppressive properties of new drugs. Activity of compound was also tested on PBMC (target cells). Jurkat cell line was resistant to all compounds. Conjugates **69a-b** linked through 6-aminohexanoil linker were inactive toward PBMC and L1210 cell line. Conjugates **62a-j** inhibited viability and proliferation of L1210 cells, but were less

active than unbound MDP(D,D) and nor-MDP(D,D) derivatives. Conjugates **62a-j** were more selective towards PBMC than muramyl dipeptide derivatives.

8. DOROBEK NAUKOWY

Publikacje monograficzne:

- Samsel M, Dzierzbicka K, Trzonkowski P., *Adenozyna, jej analogi i koniugaty*, Postępy Hig. Med. Dośw., przyjęty do druku
- Samsel M, Dzierzbicka K, *Synteza analogów adenozyny*, Wiad. Chem., 2012; 66(3-4):321-340.
- Samsel M, Dzierzbicka K, *Therapeutic potential of adenosine analogues and conjugates*, Pharm. Rep., 2011; 63(3):601-617.

Udział w sympozjach i konferencjach naukowych:

- Samsel M, Iwaszkiewicz-Grześ D, Dzierzbicka K, Trzonkowski P, *Immunomodulatory properties of new conjugates muramyl dipeptides derivatives with adenosine*, 15th International Congress of Immunology, , Mediolan, Włochy, 22-27.08.2013 (s. 1023).
- Samsel M, Dzierzbicka K, Trzonkowski P, *Synthesis of conjugates of muramyl dipeptide and nor-muramyl dipeptide derivatives with adenosine as potential immunosuppressants*, Peptides 2012: Proceedings of the Thirty-Second European Peptide Symposium, September 2-7.09.2012, Athens, Greece / ed. by George Kokotos, Violetta Constantinou-Kokotou, John Matsoukas. Athens : European Peptide Society, 2012 (s. 125).
- Kukowska M, Dzierzbicka K., Samsel M, *Synthesis and lipophilic properties of tri- and tetrapeptides covalently modified with fatty acids*, 21st Polish Peptide Symposium, Supraśl, 4-8.10.2011 (s. 103).
- Samsel M, Dzierzbicka K, *Synthesis of conjugates of muramyl dipeptide and nor-muramyl dipeptide derivatives with adenosine*, 21st Polish Peptide Symposium, Supraśl, 4-8.10.2011 (s. 127).
- Małachowska-Ugarte M, Samsel M, Dzierzbicka K, *MDP and nor-MDP derivatives as potential immunosuppressive agents*, YoungChem 2010, International Congress of Young Chemists, Reda, 06-10.10. 2010 (s. 76).
- Samsel M, Dzierzbicka K, *Synteza pochodnych muramylodipeptydów zawierających D-aminokwasy*, XXI Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, 12-15.10.2010, Gdańsk

Praca powstała w ramach grantu promotorskiego N N405 046440

9. LITERATURA

- [1] Sarma NJ, Tiriveedhi V, Angaswamy N, Mohanakumar T. *Role of antibodies to self-antigens in chronic allograft rejection: potential mechanism and therapeutic implications*. Hum. Immunol., 2012; 73: 1275-81.
- [2] Moia LJ, Matsui H, de Barros GA, Tomizawa K, Miyamoto K, Kuwata Y, Tokuda M, Itano T, Hatase O. *Immunosuppressants and calcineurin inhibitors, cyclosporin A and FK506, reversibly inhibit epileptogenesis in amygdaloid kindled rat*. Brain. Res., 1994; 648: 337-41.
- [3] Suthanthiran M, Morris RE, Strom TB. *Immunosuppressants: cellular and molecular mechanisms of action*. Am. J Kidney. Dis., 1996; 28: 159-72.
- [4] Stucker F, Ackermann D. *Immunosuppressive drugs - how they work, their side effects and interactions*. Ther. Umsch., 2011; 68: 679-86.
- [5] De Santo LS, Della Corte A, Romano G, Amarelli C, Onorati F, Torella M, De Feo M, Marra C, Maiello C, Giannolo B, Casillo R, Ragone E, Grimaldi M, Utili R, Cotrufo M. *Midterm results of a prospective randomized comparison of two different rabbit-antithymocyte globulin induction therapies after heart transplantation*. Transplant Proc., 2004; 36: 631-7.
- [6] Aktas S, Colak T, Baskin E, Sevmis S, Ozdemir H, Moray G, Karakayali H, Haberal M. *Comparison of basiliximab and daclizumab with triple immunosuppression in renal transplantation*. Transplant. Proc., 2011; 43: 453-7.
- [7] Sageshima J, Ciancio G, Guerra G, Gaynor JJ, Cova D, Zarak A, Chen L, Mattiazzi A, Kupin W, Roth D, Hanson L, Livingstone AS, Ruiz P, Burke GW. *Prolonged lymphocyte depletion by single-dose rabbit anti-thymocyte globulin and alemtuzumab in kidney transplantation*. Transpl. Immunol., 2011; 25: 104-11.
- [8] Ochi H, Abraham M, Ishikawa H, Frenkel D, Yang K, Basso A, Wu H, Chen ML, Gandhi R, Miller A, Maron R, Weiner HL. *New immunosuppressive approaches: oral administration of CD3-specific antibody to treat autoimmunity*. J Neurol. Sci., 2008; 274: 9-12.
- [9] Sereno J, Parada B, Rodrigues-Santos P, Lopes PC, Carvalho E, Vala H, Teixeira-Lemos E, Alves R, Figueiredo A, Mota A, Teixeira F, Reis F. *Serum and renal tissue markers of nephropathy in rats under immunosuppressive therapy: cyclosporine versus sirolimus*. Transplant. Proc., 2013; 45: 1149-56.
- [10] Zavialov AV, Gracia E, Glaichenhaus N, Franco R, Zavialov AV, Lauvau G. *Human adenosine deaminase 2 induces differentiation of monocytes into macrophages and stimulates proliferation of T helper cells and macrophages*. J Leu. Biol., 2010; 88: 279-290.
- [11] Moras ML, Phillips NC, Bahr GM, Chedid L. *In vitro inhibition of murine B-cell tumor growth by MDP, MDP(D-D) and Vaccin is mediated by macrophages*. Int. J Immunopharmacol., 1985; 7: 515-24.

- [12] Wei CJ, Li W, Chen J-F. *Normal and abnormal functions of adenosine receptors in the central nervous system revealed by genetic knockout studies*. BBA - Biomembranes, 2011; 1808: 1358-1379.
- [13] Cunha RA. *Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors*. Neurochem. Int., 2001; 38: 107-25.
- [14] Gessi S, Varani K, Merighi S, Fogli E, Sacchetto V, Benini A, Leung E, MacLennan S, Borea PA. *Adenosine and lymphocyte regulation*. Purinergic. Signal., 2007; 3: 109-16.
- [15] Kumar V, Sharma A. *Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential*. Eur. J Pharmacol., 2009; 616: 7-15.
- [16] Drury AN, Szent-Gyorgyi A. *The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart*. J Physiol., 1929; 68: 213-37.
- [17] Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. *International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors*. Pharmacol. Rev., 2001; 53: 527-52.
- [18] Dhalla AK, Shryock JC, Shreeniwas R, Belardinelli L. *Pharmacology and therapeutic applications of A1 adenosine receptor*. Curr. Top. Med. Chem., 2003; 369-385.
- [19] Mantell SJ, Stephenson PT, Monaghan SM, Maw GN, Trevethick, M. A, Yeadon M, Walker D, Selby M, Batchelor D, Rozze S, Chavarroche H, Lemaitre A, Wright K, Whitlock L, Stuart E. *SAR of a series of inhaled A2A agonists and comparison of inhaled pharmacokinetics in a preclinical model with clinical pharmacokinetic data*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2009; 4471-4475.
- [20] Hasko G, Cronstein BN. *Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity*. Trends Immunol., 2004; 25: 33-39.
- [21] Porkka-Heiskanen T, Kalinchuk AV. *Adenosine, energy metabolism and sleep homeostasis*. Sleep Med. Rev., 2011; 15: 123-135.
- [22] Hunsucker SA, Spychala J, Mitchell BS. *Human cytosolic 5'-nucleotidase I - Characterization and role in nucleoside analog resistance*. J Biol. Chem., 2001; 276: 10498-10504.
- [23] Borowiec A, Lechward K, Tkacz-Stachowska K, Skladanowski AC. *Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases*. Acta Biochim. Pol., 2006; 53: 269-278.
- [24] Grolach A. *Control of adenosine transport by hypoxia*. Circulation Res., 2005; 97: 1-3.
- [25] Souza V, Schlemmer KB, Noal CB, Jaques J, Zimmermann CEP, Leal CAM, Fleck J, Casali EA, Morsch VM, Schetinger MRC, Leal DBR. *E-ntpdase and E-ADA activities are altered in lymphocytes of patients with indeterminate form of Chagas' disease*. Parasitol. Int., 2012; 61: 690-6.

- [26] Rucker B, Almeida ME, Libermann TA, Zerbini LF, Wink MR, Sarkis JF. *E-ntpdases and ecto-5'-nucleotidase expression profile in rat heart left ventricle and the extracellular nucleotide hydrolysis by their nerve terminal endings*. Life Sciences, 2008; 82: 477-486.
- [27] Maj M, Singh B, Gupta RS. *The influence of inorganic phosphate on the activity of adenosine kinase*. BBA - Protein Structure and Molecular Enzymology, 2000; 1476: 33-42.
- [28] Sahin B, Kansy JW, Nairn AC, Spychala J, Ealick SE, Fienberg AA, Greene RW, Bibb JA. *Molecular characterization of recombinant mouse adenosine kinase and evaluation as a target for protein phosphorylation*. Eur. J Biochem., 2004; 271: 3547-3555.
- [29] Kroll K, Deussen A, Sweet IR. *Comprehensive model of transport and metabolism of adenosine and s-adenosylhomocysteine in the guinea-pig heart*. Circ. Res., 1992; 71: 590-604.
- [30] Ponnoth DS, Mustafa SJ. *Adenosine receptors and vascular inflammation*. BBA-Biomembranes, 2011; 1808: 1429-1434.
- [31] Meghji P, *Adenosine production and metabolism*. Academic Press: San Diego 1991.
- [32] Gakis C. *Adenosine deaminase (ADA) isoenzymes ADA1 and ADA2: Diagnostic and biological role*. Eur. Resp. J, 1996; 9: 632-633.
- [33] Saura CK, Mallol J, Canela EI, Lluís C, Franco R. *Adenosine deaminase and A(1) adenosine receptors internalize together following agonist-induced receptor desensitization*. J Biol. Chem., 1998; 273: 17610-17617.
- [34] Herrera C, Casado V, Ciruela F, Schofield P, Mallol J, Lluís C, Franco R. *Adenosine A(2B) receptors behave as an alternative anchoring protein for cell surface adenosine deaminase in lymphocytes and cultured cells*. Mol. Pharmacol., 2001; 59: 127-134.
- [35] Kaminsky Y, Kosenko E. *AMP deaminase and adenosine deaminase activities in liver and brain regions in acute ammonia intoxication and subacute toxic hepatitis*. Brain Res., 2010; 1311: 175-181.
- [36] Linden J. *Molecular approach to adenosine receptors: Receptor-mediated mechanisms of tissue protection*. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 2001; 41: 775-787.
- [37] Fleischmannova J, Kucerova L, Sandova K, Steinbauerova V, Broz V, Simek P, Zurovec M. *Differential response of Drosophila cell lines to extracellular adenosine*. Insect Biochem. Mol. Biol., 2012; 42: 321-331.
- [38] Podgorska M, Kocbuch K, Pawelczyk T. *Recent advances in studies on biochemical and structural properties of equilibrative and concentrative nucleoside transporters*. Acta Biochim. Pol., 2005; 52: 749-758.
- [39] Leung GPH, Ward JL, Wong PYD, Tse CM. *Characterization of nucleoside transport systems in cultured rat epididymal epithelium*. Am. J Physiol.-Cell Physiology, 2001; 280: C1076-C1082.

- [40] Baldwin SA, Yao SYM, Hyde RJ, Ng AML, Foppolo S, Barnes K, Ritzel MWL, Cass CE, Young JD. *Functional characterization of novel human and mouse equilibrative nucleoside transporters (hent3 and ment3) located in intracellular membranes.* J Biol. Chem., 2005; 280: 15880-15887.
- [41] Young JD, Yao SYM, Sun L, Cass CE, Baldwin SA. *Human equilibrative nucleoside transporter (ENT) family of nucleoside and nucleobase transporter proteins.* Xenobiotica, 2008; 38: 995-1021.
- [42] Li RWS, Tse C-M, Man RYK, Vanhoutte PM, Leung GPH. *Inhibition of human equilibrative nucleoside transporters by dihydropyridine-type calcium channel antagonists.* Eur. J Pharmacol., 2007; 568: 75-82.
- [43] Kang N, Jun AH, Bhutia YD, Kannan N, Unadkat JD, Govindarajan R. *Human Equilibrative nucleoside transporter-3 (hent3) spectrum disorder mutations impair nucleoside transport, protein localization, and stability.* J Biol. Chem., 2010; 285: 28343-28352.
- [44] Wang C, Pimple S, Buolamwini JK. *Interaction of benzopyranone derivatives and related compounds with human concentrative nucleoside transporters 1, 2 and 3 heterologously expressed in porcine PK15 nucleoside transporter deficient cells. Structure-activity relationships and determinants of transporter affinity and selectivity.* Biochem. Pharmacol., 2010; 79: 307-320.
- [45] Nagai K, Nagasawa K, Fujimoto S. *Transport mechanisms for adenosine and uridine in primary-cultured rat cortical neurons and astrocytes.* Biochem. Biophys. Res. Comm., 2005; 334: 1343-1350.
- [46] Hiratochi M, Tatani K, Shimizu K, Kuramochi Y, Kikuchi N, Kamada N, Itoh F, Isaji M. *Hypouricemic effects of novel concentrative nucleoside transporter 2 inhibitors through suppressing intestinal absorption of purine nucleosides.* Eur. J Pharmacol., 2012; 690: 183-191.
- [47] Govindarajan R, Bakken AH, Hudkins KL, Lai Y, Casado FJ, Pastor-Anglada M, Tse C-M, Hayashi J, Unadkat JD. *In situ hybridization and immunolocalization of concentrative and equilibrative nucleoside transporters in the human intestine, liver, kidneys, and placenta.* Am. J Physiol.-Regulatory Integrative and Comparative Physiology, 2007; 293: R1809-R1822.
- [48] Griffith DA, Jarvis SM. *Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells.* BBA-Reviews on Biomembranes, 1996; 1286: 153-181.
- [49] Fredholm BB, Arslan G, Halldner L, Kull B, Schulte G, Wasserman W. *Structure and function of adenosine receptors and their genes.* N-S Arch. Pharmacol., 2000; 362: 364-374.
- [50] Piirainen H, Ashok Y, Nanekar RT, Jaakola VP. *Structural features of adenosine receptors: From crystal to function.* BBA-Biomembranes, 2011; 1808: 1233-1244.
- [51] Fredholm BB. *Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair.* Cell Death Differ., 2007; 14: 1315-1323.
- [52] Gomez G, Sitkovsky MV. *Differential requirement for A2a and A3 adenosine receptors for the protective effect of inosine in vivo.* Blood, 2003; 102: 4472-4478.

- [53] Daly JW, Bruns RF, Snyder SH. *Adenosine receptors in the central nervous-system - relationship to the central actions of methylxanthines*. Life Sciences, 1981; 28: 2083-2097.
- [54] Robin E, Sabourin J, Benoit R, Pedretti S, Raddatz E. *Adenosine A1 receptor activation is arrhythmogenic in the developing heart through NADPH oxidase/ERK- and PLC/PKC-dependent mechanisms*. J Mol. Cell. Cardiol., 2011; 51: 945-954.
- [55] Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. *International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors*. Pharmacol. Rev., 2001; 53: 527-52.
- [56] Cunha RA. *Different cellular sources and different roles of adenosine: A(1) receptor-mediated inhibition through astrocytic-driven volume transmission and synapse-restricted A(2A) receptor-mediated facilitation of plasticity*. Neurochem. Int., 2008; 52: 65-72.
- [57] Angeles RM, Agustin LD, Luis AJ, Martin M. *Desensitization of adenosine A(1) receptors in rat immature cortical neurons*. Eur. J Pharmacol., 2011; 670: 365-371.
- [58] Brown RD, Thoren P, Steege A, Mrowka R, Sallstrom J, Skott O, Fredholm BB, Persson AEG. *Influence of the adenosine A(1) receptor on blood pressure regulation and renin release*. Am. J Physiol.-Regulatory Integrative and Comparative Physiology, 2006; 290: R1324-R1329.
- [59] Bastia E, Varani K, Monopoli A, Bertorelli R. *Effects of A(1) and A(2A) adenosine receptor ligands in mouse acute models of pain*. Neurosci. Lett., 2002; 328: 241-244.
- [60] Dhalla AK, Chisholm JW, Reaven GM, Belardinelli L. *A1 adenosine receptor: role in diabetes and obesity*. Handbook of experimental pharmacology, 2009: 271-95.
- [61] Headrick JP, Gauthier NS, Morrison RR, Matherne GP. *Chronotropic and vasodilatory responses to adenosine and isoproterenol in mouse heart: Effects of adenosine A(1) receptor overexpression*. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 2000; 27: 185-190.
- [62] Park HM, Lee JH, Yaoyao J, Jun HJ, Lee SJ. *Limonene, a natural cyclic terpene, is an agonistic ligand for adenosine A(2A) receptors*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2011; 404: 345-348.
- [63] Schwindinger WF, Mihalcik LJM, Giger KE, Betz KS, Stauffer AM, Linden J, Herve D, Robishaw JD. *Adenosine A(2A) Receptor Signaling and G(olf) Assembly Show a Specific Requirement for the gamma(7) Subtype in the Striatum*. J Biol. Chem., 2010; 285: 29787-29796.
- [64] Jacquin L, Franceschi F, By Y, Durand-Gorde J-M, Condo J, Deharo J-C, Michelet P, Fenouillet E, Guieu R, Ruf J. *Search for adenosine A2A spare receptors on peripheral human lymphocytes*. FEBS Open Bio, 2013; 3: 1-5.
- [65] Sitkovsky MV. *T regulatory cells: hypoxia-adenosinergic suppression and re-direction of the immune response*. Trends Immunol., 2009; 30: 102-108.

- [66] Voloshyna I, Carsons S, Littlefield MJ, Rieger JM, Figler R, Reiss AB. *Adenosine A(2A) receptor activation supports an atheroprotective cholesterol balance in human macrophages and endothelial cells*. BBA, 2013; 1831: 407-16.
- [67] Hasko G, Csoka B, Nemeth ZH, Vizi ES, Pacher P. *A(2B) adenosine receptors in immunity and inflammation*. Trends Immunol., 2009; 30: 263-270.
- [68] Feoktistov I, Biaggioni I. *Adenosine A(2B) receptors*. Pharmacol. Rev., 1997; 49: 381-402.
- [69] Ryzhov S, Zaynagetdinov R, Goldstein AE, Novitskiy SV, Dikov MM, Blackburn MR, Biaggioni I, Feoktistov I. *Effect of A(2B) adenosine receptor gene ablation on proinflammatory adenosine signaling in mast cells*. J Immunol., 2008; 180: 7212-7220.
- [70] Mirabet M, Herrera C, Cordero OJ, Mallol J, Lluís C, Franco R. *Expression of A(2B) adenosine receptors in human lymphocytes: their role in T cell activation*. J Cell Sci., 1999; 112: 491-502.
- [71] Novitskiy SV, Ryzhov S, Zaynagetdinov R, Goldstein AE, Huang Y, Tikhomirov OY, Blackburn MR, Biaggioni I, Carbone DP, Feoktistov I, Dikov MM. *Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function*. Blood, 2008; 112: 1822-1831.
- [72] Eckle T, Faigle M, Grenz A, Laucher S, Thompson LF, Eltzschig HK. *A2B adenosine receptor dampens hypoxia-induced vascular leak*. Blood, 2008; 111: 2024-2035.
- [73] Gessi S, Varani K, Merighi S, Cattabriga E, Pancaldi C, Szabadkai Y, Rizzuto R, Klotz KN, Leung E, Mac Lennan S, Baraldi PG, Borea PA. *Expression, pharmacological profile, and functional coupling of A(2B) receptors in a recombinant system and in peripheral blood cells using a novel selective antagonist radioligand, H-3 MRE 2029-F20*. Mol. Pharmacol., 2005; 67: 2137-2147.
- [74] Talukder MAH, Morrison RR, Ledent C, Mustafa SJ. *Endogenous adenosine increases coronary flow by activation of both A(2A) and A(2B) receptors in mice*. J Cardiovasc. Pharmacol., 2003; 41: 562-570.
- [75] Gessi S, Merighi S, Varani K, Leung E, Mac Lennan S, Borea PA. *The A3 adenosine receptor: An enigmatic player in cell biology*. Pharmacol. Ther., 2008; 117: 123-140.
- [76] Palmer TM, Benovic JL, Stiles GL. *Agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the rat A(3) adenosine receptor - evidence for a g-protein-coupled receptor kinase-mediated mechanism*. J Biol. Chem., 1995; 270: 29607-29613.
- [77] Mozzicato S, Joshi BV, Jacobson KA, Liang BT. *Role of direct rhoa-phospholipase D1 interaction in mediating adenosine-induced protection from cardiac ischemia*. FASEB., 2004; 18: 406-8.
- [78] Baraldi PG, Preti D, Borea PA, Varani K. *Medicinal chemistry of A(3) adenosine receptor modulators: pharmacological activities and therapeutic implications*. J Med. Chem., 2012; 55: 5676-5703.

- [79] Fishman P, Bar-Yehuda S. *Pharmacology and therapeutic applications of A(3) receptor subtype*. Curr. Top. Med. Chem., 2003; 3: 463-469.
- [80] Varani K, Gessi S, Merighi S, Iannotta V, Cattabriga E, Pancaldi C, Cadossi R, Borea PA. *Alteration of A(3) adenosine receptors in human neutrophils and low frequency electromagnetic fields*. Biochem. Pharmacol., 2003; 66: 1897-1906.
- [81] Wang Z, Do CW, Avila MY, Peterson-Yantorno K, Stone RA, Gao Z-G, Joshi B, Besada P, Jeong LS, Jacobson KA, Civan MM. *Nucleoside-derived antagonists to A(3) adenosine receptors lower mouse intraocular pressure and act across species*. Exp. Eye Res., 2010; 90: 146-154.
- [82] Cheong SL, Federico S, Venkatesan G, Mandel AL, Shao Y-M, Moro S, Spalluto G, Pastorin G. *The A3 adenosine receptor as multifaceted therapeutic target: pharmacology, medicinal chemistry, and in silico approaches*. Med. Res. Rev., 2013; 33: 235-335.
- [83] Hasko G, Kuhel DG, Chen JF, Schwarzschild MA, Deitch EA, Mabley JG, Marton A, Szabo C. *Adenosine inhibits IL-12 and TNF-alpha production via adenosine A(2a) receptor-dependent and independent mechanisms*. FASEB., 2000; 14: 2065-2074.
- [84] Sitkovsky M, Lukashev D. *Regulation of immune cells by local. Tissue oxygen tension: Hif1 alpha and adenosine receptors*. Nature Rev. Immunol., 2005; 5: 712-721.
- [85] Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Hessling S, Palmetshofer A, Serfling E, Heib V, Becker M, Kubach J, Schmitt S, Stoll S, Schild H, Staeger MS, Stassen M, Jonuleit H, Schmitt E. *Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression*. J Exp. Med., 2007; 204: 1303-10.
- [86] Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. *CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells*. Nat. Immunol., 2007; 8: 1353-62.
- [87] Koglin J, Staeblein A, Scheidt Wv. *Supersensitivity mismatch of adenosine in the transplanted human heart: chrono- and dromotropy versus inotropy*. Transpl. Int., 1996; 9-14.
- [88] Mueller CE, Jacobson KA. *Recent developments in adenosine receptor ligands and their potential as novel drugs*. BBA-Biomembranes, 2011; 1808: 1290-1308.
- [89] Cappellacci L, Franchetti P, Vita P, Petrelli R, Lavecchia A, Costa B, Spinetti F, Martini C, Klotzd K, Grifantinia M. *5'-Carbamoyl derivatives of 2'-C-methyl-purine nucleosides as selective A1 adenosine receptor agonists: Affinity, efficacy, and selectivity for A1 receptor from different species*. Bioorg. Med. Chem., 2008; 336-353.
- [90] Ellenbogen KA, O'Neill G, Prystowsky EN, Camm JA, Meng L, Lieu HD, Jerling M, Shreeniwas R, Belardinelli L, Wolff AA. *Trial to evaluate the management of paroxysmal supraventricular tachycardia during an electrophysiology study with tecadenoson*. Circulation, 2005; 111: 3202-8.
- [91] Savelieva I, Camm J. *Anti-arrhythmic drug therapy for atrial fibrillation: current anti-arrhythmic drugs, investigational agents, and innovative approaches*. Europace, 2008; 10: 647-665.

- [92] Hart ML, Jacobi B, Schittenhelm J, Henn M, Eltzhig HK. Cutting Edge: *A2B Adenosine receptor signaling provides potent protection during intestinal ischemia/reperfusion injury*. J Immunol, 2009; 182: 3965-8.
- [93] Devine S, Scammells P. *An efficient convergent synthesis of adenosine-5'-N-alkyluronamides*. Tetrahedron, 2008; 1772-1777.
- [94] Aurora J, Gill Ms, Ong K. *Pharmaceutical formulation for controlled release of selodenoson*. In: aderis pharmaceuticals., 2005.
- [95] Dhalla AK, Santikul M, Smith M, Wong MY, Shryock JC, Belardinelli L. *Antilipolytic activity of a novel partial A1 adenosine receptor agonist devoid of cardiovascular effects: comparison with nicotinic acid*. J Pharmacol. Exp. Ther., 2007; 321: 327-33.
- [96] Liang H, Belardinelli L, Ozeck M, Shryock J. *Tonic activity of the rat adipocyte A1-adenosine receptor*. Br J Pharmacol, 2002; 1457-1466.
- [97] Staehr PM, Dhalla AK, Zack J, Wang X, Ho YL, Bingham J, Belardinelli L. *Reduction of free fatty acids, safety, and pharmacokinetics of oral gs-9667, an A1 adenosine receptor partial agonist*. J Clin. Pharmacol., 2013; 53: 385-92.
- [98] Dhalla AK, Santikul M, Smith M, Wong MY, Shryock JC, Belardinelli L. *Antilipolytic activity of a novel partial A1 adenosine receptor agonist devoid of cardiovascular effects: comparison with nicotinic acid*. J Pharmacol. Exp. Ther., 2007; 321: 327-33.
- [99] Chaves VE, Frasson D, Kawashita NH. *Several agents and pathways regulate lipolysis in adipocytes*. Biochimie, 2011; 93: 1631-1640.
- [100] Ohta A, Sitkovsky M. *Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage*. Nature, 2001; 414: 916-20.
- [101] Moore CC, Martin EN, Lee GH, Obrig T, Linden J, Scheld WM. *An A2A adenosine receptor agonist, ATL313, reduces inflammation and improves survival in murine sepsis models*. BMC Infect. Dis., 2008; 8: 141.
- [102] Sullivan GW. *Adenosine A2A receptor agonists as anti-inflammatory agents*. Curr. Opin. Investig. Drugs., 2003; 4: 1313-9.
- [103] Luijk B, van den Berge M, Kerstjens HA, Postma DS, Cass L, Sabin A, Lammers JW. *Effect of an inhaled adenosine A2A agonist on the allergen-induced late asthmatic response*. Allergy, 2008; 63: 75-80.
- [104] Rimmer J, Peake HL, Santos CM, Lean M, Bardin P, Robson R, Haumann B, Loehrer F, Handel ML. *Targeting adenosine receptors in the treatment of allergic rhinitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study*. Clin. Exp. Allergy, 2007; 37: 8-14.
- [105] El-Tayeb A, Iqbal J, Behrenswerth A, Romio M, Schneider M, Zimmermann H, Schrader J, Müller CE. *Nucleoside-5'-monophosphates as prodrugs of adenosine A2A receptor agonists activated by ecto-5'-nucleotidase*. J Med. Chem., 2009; 52: 7669-77.

- [106] Iskandrian AE. *A new generation of coronary vasodilators in stress perfusion imaging*. Am. J Cardiol., 2007; 99: 1619-20.
- [107] Al Jaroudi W, Iskandrian AE. *Regadenoson: a new myocardial stress agent*. J Am. Coll. Cardiol., 2009; 54: 1123-30.
- [108] Udelson JE, Iteld BJ, Weiland FL, Foster JB, Bonow RO, Ficaro EP, Gibbons R, Heller GV, Wackers FJT, Barrett RJ, Pixton GC. *15.27: Double-blinded comparison of the side effects associated with pharmacologic stress induced with binodenoson and adenosine*. J. Nucl. Cardiol.; 15: S17-S18.
- [109] Zoghbi GJ, Iskandrian AE. *Selective adenosine agonists and myocardial perfusion imaging*. J. Nucl. Cardiol, 2012; 19: 126-141.
- [110] Eckle T, Grenz A, Laucher S, Eltzhig HKCP. *A2B adenosine receptor signaling attenuates acute lung injury by enhancing alveolar fluid clearance in mice*. J Clin. Invest., 2008; 118: 3301-15.
- [111] Aherne CM, Kewley EM, Eltzhig HKCP. *The resurgence of A2B adenosine receptor signaling*. Biochim. Biophys. Acta, 2011; 1808: 1329-39.
- [112] Eltzhig HK, Bonney SK, Eckle T. *Attenuating myocardial ischemia by targeting A2B adenosine receptors*. Trends Mol. Med, 2013; 19(6):345-54.
- [113] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium*. Circulation, 1986; 74: 1124-36.
- [114] Aherne CM, Kewley EM, Eltzhig HK. *The resurgence of A2B adenosine receptor signaling*. Biochim. Biophys. Acta, 2011; 1808: 1329-39.
- [115] Baraldi PG, Tabrizi MA, Fruttarolo F, Romagnoli R, Preti D. *Recent improvements in the development of A(2B) adenosine receptor agonists*. Purinergic Signal., 2009; 5: 3-19.
- [116] Sun CX, Zhong H, Mohsenin A, Morschl E, Chunn JL, Molina JG, Belardinelli L, Zeng D, Blackburn MR. *Role of A2B adenosine receptor signaling in adenosine-dependent pulmonary inflammation and injury*. J Clin. Invest., 2006; 116: 2173-2182.
- [117] Zhou Y, Schneider DJ, Blackburn MR. *Adenosine signaling and the regulation of chronic lung disease*. Pharmacol. Ther., 2009; 123: 105-16.
- [118] Frick JS, macmanus CF, Scully M, Glover LE, Eltzhig HK, Colgan SP. *Contribution of adenosine A2B receptors to inflammatory parameters of experimental colitis*. J Immunol., 2009; 182: 4957-64.
- [119] Chandrasekharan BP, Kolachala VL, Dalmasso G, Merlin D, Ravid K, Sitaraman SV, Srinivasan S. *Adenosine 2B receptors (A(2B)AR) on enteric neurons regulate murine distal colonic motility*. FASEB, 2009; 23: 2727-34.
- [120] Dubey RK, Gillespie DG, Mi Z, Jackson EK. *Adenosine inhibits PDGF-induced growth of human glomerular mesangial cells via A(2B) receptors*. Hypertension, 2005; 46: 628-34.

- [121] Tostes RC, Giachini FR, Carneiro FS, Leite R, Inscho EW, Webb RC. *Determination of adenosine effects and adenosine receptors in murine corpus cavernosum*. J Pharmacol. Exp. Ther., 2007; 322: 678-85.
- [122] Iino M, Ehama R, Nakazawa Y, Iwabuchi T, Ogo M, Tajima M, Arase S. *Adenosine stimulates fibroblast growth factor-7 gene expression via adenosine A2b receptor signaling in dermal papilla cells*. J Invest. Dermatol., 2007; 127: 1318-25.
- [123] El-Gowell HM, El-Gowilly SM, Elsalakawy LK, El-Mas MM. *Nitric oxide synthase/K⁺ channel cascade triggers the adenosine A2B receptor-sensitive renal vasodilation in female rats*. Eur. J Pharmacol., 2013; 702: 116-125.
- [124] Adachi H, Palaniappan KK, Ivanov AA, Bergman N, Gao ZG, Jacobson KA. *Structure-activity relationships of 2,N(6),5'-substituted adenosine derivatives with potent activity at the A2B adenosine receptor*. J Med. Chem., 2007; 50: 1810-27.
- [125] Liu Y, Yang X, Yang X-M, Walker S, Foerster K, Cohen MV, Krieg T, Downey JM. *AMP579 is revealed to be a potent A(2b)-adenosine receptor agonist in human 293 cells and rabbit hearts*. Basic Res. Cardiol., 2010; 105: 129-137.
- [126] Ochaion A, Bar-Yehuda S, Cohen S, Barer F, Patoka R, Amital H, Reitblat T, Reitblat A, Ophir J, Konfino I, Chowers Y, Ben-Horin S, Fishman P. *The anti-inflammatory target A(3) adenosine receptor is over-expressed in rheumatoid arthritis, psoriasis and Crohn's disease*. Cell. Immunol., 2009; 258: 115-22.
- [127] David M, Akerman L, Ziv M, Kadurina M, Gospodinov D, Pavlotsky F, Yankova R, Kouzeva V, Ramon M, Silverman MH, Fishman P. *Treatment of plaque-type psoriasis with oral CF101: data from an exploratory randomized phase 2 clinical trial*. J Eur. Acad. Dermatol. Venereol., 2012; 26: 361-367.
- [128] Silverman MH, Strand V, Markovits D, Nahir M, Reitblat T, Molad Y, Rosner I, Rozenbaum M, Mader R, Adawi M, Caspi D, Tishler M, Langevitz P, Rubinow A, Friedman J, Green L, Tanay A, Ochaion A, Cohen S, Kerns WD, Cohn I, Fishman-Furman S, Farbstein M, Yehuda SB, Fishman P. *Clinical evidence for utilization of the A3 adenosine receptor as a target to treat rheumatoid arthritis: data from a phase II clinical trial*. J Rheumatol., 2008; 35: 41-8.
- [129] Avni I, Garzosi HJ, Barequet IS, Segev F, Varssano D, Sartani G, Chetrit N, Bakshi E, Zadok D, Tomkins O, Litvin G, Jacobson KA, Fishman S, Harpaz Z, Farbstein M, Bar Yehuda S, Silverman MH, Kerns WD, Bristol DR, Cohn I, Fishman P. *Treatment of dry eye syndrome with orally administered CF101 data from a phase 2 clinical trial*. Ophthalmology, 2010; 117: 1287-1293.
- [130] Jacobson KA, Klutz AM, Tosh DK, Ivanov AA, Preti D, Baraldi PG. *Medicinal chemistry of the A3 adenosine receptor: agonists, antagonists, and receptor engineering*. Handb. Exp. Pharmacol., 2009: 123-59.
- [131] Stemmer SM, Benjaminov O, Medalia G, Ciuraru NB, Silverman MH, Bar-Yehuda S, Fishman S, Harpaz Z, Farbstein M, Cohen S, Patoka R, Singer B, Kerns WD, Fishman P. *CF102 for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma: A Phase I/II, Open-Label, Dose-Escalation Study*. Oncologist, 2013; 18: 25-26.

- [132] Bar-Yehuda S, Stemmer SM, Madi L, Castel D, Ochaion A, Cohen S, Barer F, Zabutti A, Perez-Liz G, Del Valle L, Fishman P. *The A3 adenosine receptor agonist CF102 induces apoptosis of hepatocellular carcinoma via de-regulation of the Wnt and NF-kappaB signal transduction pathways*. Int. J Oncol., 2008; 33: 287-95.
- [133] Biopharma C-F. *Can-Fites drug CF102 significantly decreased viral load of HCV in a Patient With Liver Cancer*. , 2010.
- [134] Wagner R, Ngamsri KC, Stark S, Vollmer I, Reutershan J. *Adenosine receptor A3 is a critical mediator in LPS-induced pulmonary inflammation*. Am. J Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol., 2010; 299: L502-12.
- [135] Tracey W, Magee W, Oleynek J, Hil R, Smith A, Flynn D. *Novel N6-substituted adenosine 5'-N-methyluronamides with high selectivity for human adenosine A3 receptors reduce ischemic myocardial injury*. Am. J Physiol., 2003; H2780–H2787.
- [136] Wan TC, Ge ZD, Tampo A, Mio Y, Bienengraeber MW, Tracey WR, Gross GJ, Kwok WM, Auchampach JA. *The A3 adenosine receptor agonist CP-532,903 [N6-(2,5-dichlorobenzyl)-3'-aminoadenosine-5'-N-methylcarboxamide] protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via the sarcolemmal ATP-sensitive potassium channel*. J Pharmacol. Exp. Ther., 2008; 324: 234-43.
- [137] Jacobson KA, Gao ZG, Tchilibon S, Duong HT, Joshi BV, Sonin D, Liang BT. *Semi-rational design of (north)-methanocarba nucleosides as dual acting A(1) and A(3) adenosine receptor agonists: novel prototypes for cardioprotection*. J Med. Chem., 2005; 48: 8103-7.
- [138] Zhu R, Frazier CR, Linden J, Macdonald TL. *N6-ethyl-2-alkynyl neas, selective human A3 adenosine receptor agonists*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2006; 16: 2416-8.
- [139] Zhu BT. *Mechanistic explanation for the unique pharmacologic properties of receptor partial agonists*. Biomed. Pharmacother., 2005; 59: 76-89.
- [140] Matot I, Weiniger CF, Zeira E, Galun E, Joshi BV, Jacobson KA. *A3 adenosine receptors and mitogen-activated protein kinases in lung injury following in vivo reperfusion*. Crit Care, 2006; 10: R65.
- [141] Leopoldo M, Lacivita E, Colabufo NA, Niso M, Berardi F, Perrone R. *Bivalent ligand approach on 4-[2-(3-methoxyphenyl)ethyl]-1-(2-methoxyphenyl)piperazine: synthesis and binding affinities for 5-HT(7) and 5-HT(1A) receptors*. Bioorg. Med. Chem., 2007; 15: 5316-21.
- [142] Leboulluec KL, Mattson RJ, Mahle CD, McGovern RT, Nowak HP, Gentile AJ. *Bivalent indoles exhibiting serotonergic binding affinity*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 1995; 5: 123-126.
- [143] Jacobson KA, Xie R, Young L, Chang L, Liang BT. *A novel pharmacological approach to treating cardiac ischemia. Binary conjugates of A1 and A3 adenosine receptor agonists*. J Biol Chem., 2000; 275(39):30272-9.
- [144] Räägel H, Lust M, Uri A, Pooga M. *Adenosine-oligoarginine conjugate, a novel bisubstrate inhibitor, effectively dissociates the actin cytoskeleton*. FEBS J, 2008; 275: 3608-24.

- [145] Mathew SC, Ghosh N, By Y, Berthault A, Virolleaud MA, Carrega L, Chouraqui G, Commeiras L, Condo J, Attolini M, Gaudel-Siri A, Ruf J, Parrain JL, Rodriguez J, Guieu R. *Design, synthesis and biological evaluation of a bivalent micro opiate and adenosine A1 receptor antagonist*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009; 19: 6736-9.
- [146] Bednarska K, Olejniczak AB, Piskala A, Klink M, Sulowska Z, Lesnikowski ZJ. *Effect of adenosine modified with a boron cluster pharmacophore on reactive oxygen species production by human neutrophils*. *Bioorg. Med. Chem.*, 2012; 20: 6621-9.
- [147] Hwu JR, Lin SY, Tsay SC, De Clercq E, Leyssen P, Neyts J. *Coumarin-purine ribofuranoside conjugates as new agents against hepatitis C virus*. *J Med. Chem.*, 2011; 54: 2114-26.
- [148] Ellouz F, Adam A, Ciorbaru R, Lederer E. *Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1974; 59: 1317-25.
- [149] Kikelj D, Pecar S, Kotnik V, Stalc A, Wraber-Herzog B, Simcic S, Ihan A, Klamfer L, Povsic L, Grahek R, Suhadolc E, Hocevar M, Honig H, Rogi-Kohlenprath R. *N-{trans-2- 2'-(acetylamino)cyclohexyl oxy acetyl}-L-alanyl-D-glutamic acid: A novel immunologically active carbocyclic muramyl dipeptide analogue*. *J Med. Chem.*, 1998; 41: 530-539.
- [150] Pabst MJ, Beranova-Giorgianni S, Krueger JM. *Effects of muramyl peptides on macrophages, monokines, and sleep*. *Neuroimmunomodulation*, 1999; 6: 261-83.
- [151] Chen DQ, Duggan C, Reden TB, Kooragayala LM, Texada DE, Langford MP. *Calreticulin is a binding protein for muramyl dipeptide and peptidoglycan in RK13 cells*. *Biochemistry*, 2004; 43: 11796-11801.
- [152] Waters RV, Terrell TG, Jones GHCP. *Uveitis induction in the rabbit by muramyl dipeptides*. *Infect. Immun.*, 1986; 51: 816-25.
- [153] Zidek Z, Masek K, Jiricka Z. *Arthritogenic activity of a synthetic immunoadjuvant, muramyl dipeptide*. *Infect. Immun.*, 1982; 35: 674-679.
- [154] Krueger JM, Walter J, Karnovsky ML, Chedid L, Choay JP, Lefrancier P, Lederer E. *Muramyl peptides - variation of somnogenic activity with structure*. *J Exp. Med.*, 1984; 159: 68-76.
- [155] Merhi G, Coleman AW, Devissaguet JP, Barratt GM. *Synthesis and immunostimulating properties of lipophilic ester and ether muramyl peptide derivatives*. *J Med. Chem.*, 1996; 39: 4483-4488.
- [156] Quan WDY, Dean GE, Spears L, Spears CP, Groshen S, Merritt JA, Mitchell MS. *Active specific immunotherapy of metastatic melanoma with an antiidiotype vaccine: A phase I/II trial of I-Mel-2 plus SAF-m*. *J Clin. Oncol.*, 1997; 15: 2103-2110.
- [157] Amiel C, De La Tribonniere X, Vidal V, Darcissac E, Mouton Y, Bahr GM. *Clinical tolerance and immunologic effects after single or repeated administrations of the synthetic immunomodulator murabutide in HIV-1-infected patients*. *J Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 2002; 30: 294-305.

- [158] Shaw MH, Reimer T, Kim YG, Nunez G. *NOD-like receptors (nlrs): bona fide intracellular microbial sensors*. Curr. Opin. Immunol., 2008; 20: 377-382.
- [159] Borzutzky A, Fried A, Chou J, Bonilla FA, Kim S, Dedeoglu F. *NOD2-associated diseases: Bridging innate immunity and autoinflammation*. Clin. Immunol., 2010; 134: 251-261.
- [160] Yamamoto-Furusho JK, Barnich N, Hisamatsu T, Podolsky DK. *MDP-NOD2 Stimulation Induces HNP-1 Secretion, Which Contributes to NOD2 Antibacterial Function*. Inflamm. Bowel Dis., 2010; 16: 736-742.
- [161] Lecat A, Piette J, Legrand-Poels S. *The protein Nod2: An innate receptor more complex than previously assumed*. Biochem. Pharmacol., 2010; 80: 2021-2031.
- [162] Marina-Garcia N, Franchi L, Kim YG, Miller D, mcdonald C, Boons GJ, Nunez G. *Pannexin-1-mediated intracellular delivery of muramyl dipeptide induces caspase-1 activation via cryopyrin/NLRP3 independently of Nod2*. J Immunol., 2008; 180: 4050-4057.
- [163] Dzierzbicka K, Wardowska A, Trzonkowski P. *Recent developments in the synthesis and biological activity of muramylpeptides*. Curr. Med. Chem., 2011; 18: 2438-2451.
- [164] Kotani S, Tsujimoto M, Koga T, Nagao S, Tanaka A, Kawata S. *Chemical-structure and biological-activity relationship of bacterial-cell walls and muramyl peptides*. Federation Proceedings, 1986; 45: 2534-2540.
- [165] Chedid L, Audibert F, Lefrancier P, Choay J, Lederer E. *Modulation of immune-response by a synthetic adjuvant and analogs*. Proc Nat Acad Sci USA , 1976; 73: 2472-2475.
- [166] Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Hashimoto M, Foster SJ, Moran AP, Fernandez-Luna JL, Nuñez G. *Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease*. J Biol. Chem., 2003; 278: 5509-12.
- [167] Inage M, Imoto M, Kambayashi Y, Kusumoto S, Shiba T. *Synthesis of 4-O-(N-acetyl-beta-D-glucosaminyl)-6-O-acyl-N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine*. Tetrahedron Lett., 1980; 21: 3767-3770.
- [168] Hasegawa A, Hioki Y, Seki E, Kiso M, Azuma I. *Studies on immunoadjuvant active compounds. Synthesis of N-2-O-(2-acetamido-1,5-anhydro-2,3-dideoxy-D-glucitol-3-yl)-D-lactoyl-L-alanyl-D-isoglutamine (L-deoxy-mdp) and some of its lipophilic analogs, and their immunoadjuvant activities*. Agric. Biol. Chem., 1986; 50: 1873-1878.
- [169] Hasegawa A, Seki E, Kiso M, Azuma I. *Synthesis and biological-activities of lipophilic derivatives of 1-deoxy-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-isoglutamine*. Agric. Biol. Chem., 1986; 50: 2137-2139.
- [170] Zemliakov AE, Tsikalov VV, Kaliuzhin OV, Kur'ianov VO, Chirva VI. *N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine glycosides. Effect of glycoside center configuration and aglycone nature on biological activity*. Bioorg. Khim., 2003; 29: 316-22.

- [171] Zemliakov AE, Tsikalova VN, Tsikalov VV, Chirva VI, Mulik EL, Kuzovlev FN, Kaliuzhin OV, Kiselevskii MV. *Dialkylmethyl beta-glycosides of N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine: synthesis and infection protective and cytotoxic activities*. Bioorg. Khim., 2008; 34: 114-20.
- [172] Hasegawa A, Tanahashi E, Goh Y, Kiso M. *Studies on immunoadjuvant active compounds. Chemical modification of the carbohydrate moiety in N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-isoglutamine, and the immunoadjuvant activity*. Carbohydr. Res., 1981; 92: 75-84.
- [173] Shiba T, Okada S, Kusumoto S, Azuma I, Yamamura Y. *Synthesis of 6-o-mycoloyl-n-acetylmuramyl-l-alanyl-d-isoglutamine with anti-tumor activity*. Bull. Chem. Soc. Jap. 1978; 51: 3307-3311.
- [174] Ogawa C, Liu YJ, Kobayashi KS. *Muramyl dipeptide and its derivatives: peptide adjuvant in immunological disorders and cancer therapy*. Curr. Bioact. Compd., 2011; 7: 180-197.
- [175] Hasegawa A, Okumura H, Nishibori K, Kaneda Y, Kiso M, Azuma I. *Studies on immunoadjuvant active compounds. The chemical modification of the C-2 substituent in the sugar moiety of N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-isoglutamine, and the immunoadjuvant activities*. Carbohydr. Res., 1981; 97: 337-345.
- [176] Adam A, Devys M, Souvannavong V, Lefrancier P, Choay J, Lederer E. *Correlation of structure and adjuvant activity of n-acetyl muramyl-l-alanyl-d-isoglutamine (mdp), its derivatives and analogs - anti-adjuvant and competition properties of stereoisomers*. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1976; 72: 339-346.
- [177] Fedorocko P, Mackova NO. *Combined modality radioprotection: Enhancement of survival and hematopoietic recovery in gamma-irradiated mice by the joint use of liposomal muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine (MTP-PE) and indomethacin*. Int. J Immunopharmacol., 1996; 18: 329-337.
- [178] Bielack SS. *Osteosarcoma: Time to move on?* Eur. J Cancer, 2010; 46: 1942-1945.
- [179] Fujimura T, Yamasaki K, Hidaka T, Ito Y, Aiba S. *A synthetic NOD2 agonist, muramyl dipeptide (MDP)-Lys (L18) and IFN-beta synergistically induce dendritic cell maturation with augmented IL-12 production and suppress melanoma growth*. J Dermatol. Sci., 2011; 62: 107-115.
- [180] Krupka M, Masek J, Bartheldyova E, Knoetigova PT, Plockova J, Korvasova Z, Skrabalova M, Koudelka S, Kulich P, Zachova K, Czernekova L, Strouhal O, Horynova M, Sebela M, Miller AD, Ledvina M, Raska M, Turanek J. *Enhancement of immune response towards non-lipidized Borrelia burgdorferi recombinant ospC antigen by binding onto the surface of metallochelating nanoliposomes with entrapped lipophilic derivatives of norabumdp*. J Controll.Rel., 2012; 160: 374-381.
- [181] Yang HZ, Xu S, Liao XY, Zhang SD, Liang ZL, Liu BH, Bai JY, Jiang C, Ding J, Cheng GF, Liu G. *A novel immunostimulator, N-2-(alpha-O-benzyl-N-(acetylmuramyl)-L-alanyl-D-isoglutaminyl)-N-6-trans-(m-nitrocinnamoyl)-L-lysine, and its adjuvancy on the hepatitis B surface antigen*. J Med. Chem., 2005; 48: 5112-5122.

- [182] Petrova EE, Simonova MA, Komaleva RL, Britsina MV, Andronova TM, Nesmeyanov VA, Valyakina TI. *GMDP augments antitumor action of the CP/TNF alpha combination in vivo*. Biomed. Pharmacother., 2010; 64: 240-248.
- [183] Lyons KC, Charman WN, Miller R, Porter CJH. *Factors limiting the oral bioavailability of N-acetylglucosaminyl-N-acetylmuramyl dipeptide (GMDP) and enhancement of absorption in rats by delivery in a water-in-oil microemulsion*. Int. J Pharm., 2000; 199: 17-28.
- [184] Palache AM, Beyer WEP, Hendriksen E, Gerez L, Aston R, Ledger PW, deregt V, Kerstens R, Rothbarth PH, Osterhaus A. *Adjuvancy and reactogenicity of N-acetylglucosaminyl N-acetylmuramyl dipeptide (GMDP) orally administered just prior to trivalent influenza subunit vaccine. A double-blind placebo-controlled study in nursing home residents*. Vaccine, 1996; 14: 1327-1330.
- [185] Kalyuzhin OV, Lobanov DS, Mulik EL, Kimpaeva DS, Zemlyakov AE, Kalina NG, Karaulov AV. *Effect of Cycloalkyl Glycosides of Muramyl Dipeptide on Antibacterial Resistance of Mice and Cytokine Production by Human Mononuclear Cells*. Bull. Exp. Biol. Med., 2009; 148: 623-626.
- [186] Li XQ, Yu JL, Xu S, Wang N, Yang HZ, Yan Z, Cheng GF, Liu G. *Chemical conjugation of muramyl dipeptide and paclitaxel to explore the combination of immunotherapy and chemotherapy for cancer*. Glycoconjugate J, 2008; 25: 415-425.
- [187] Ma Y, Zhao N, Liu G. *Conjugate (MTC-220) of Muramyl Dipeptide Analogue and Paclitaxel Prevents Both Tumor Growth and Metastasis in Mice*. J Med. Chem., 2011; 54: 2767-2777.
- [188] Wardowska A, Dzierzbicka K, Szarynska M, Dabrowska-Szponar M, Wisniewska K, Mysliwski A, Trzonkowski P. *Analogues of muramyl dipeptide (MDP) and tuftsin limit infection and inflammation in murine model of sepsis*. Vaccine, 2009; 27: 369-374.
- [189] Dzierzbicka K, Trzonkowski P, Sewerynek P, Kolodziejczyk AM, Mysliwski A. *Synthesis and biological activity of tuftsin, its analogue and conjugates containing muramyl dipeptides or nor-muramyl dipeptides*. J Pept. Sci., 2005; 11: 123-135.
- [190] Martinez-Vituro CA, Dominguez D. *Synthesis of the antitumoural agent batracylin and related isoindolo 1,2-b quinazolin-12(10H)-ones*. Tetrahedron Lett. 2007; 48: 1023-1026.
- [191] Trzonkowski P, Dzierzbicka K, Bociewicz J, Szmit E, Myśliwski A. *Biological activity of conjugates of muramyl dipeptides with batracylin derivatives*. Int. Immunopharmacol., 2005; 5: 241-51.
- [192] Flowers HM, Jeanloz RW. *Synthesis of 2-acetamido-3-O-(D-L-carboxyethyl)-2-deoxy-alpha-D-glucose (N-acetylmuramic acid) and of benzyl glycoside derivatives of 2-amino-3-O-(D-L-carboxyethyl)-2-deoxy-D-glucose (muramic acid)*. J Org. Chem., 1963; 28: 2983-&.
- [193] Liu G, Zhang S-D, Xia S-Q, Ding Z-K. *Solid-phase synthesis of muramyl dipeptide (mdp) derivatives using a multipin method*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2000; 10: 1361-1363.

- [194] Lefrancier P, Choay J, Derrien M, Lederman I. *Synthesis of n-acetyl-muramyl-l-alanyl-d-isoglutamine, an adjuvant of immune-response, and of some n-acetyl-muramyl-peptide analogs*. Int. J Pept. Protein Res., 1977; 9: 249-257.
- [195] Horton D. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, eds. Whistler, RL, BeMiller JN. (Academic, New York) 1972; 6: 282-285.
- [196] Arendt H, Kołodziejczyk AM, Sokołowska, Roczniki Chemii, 1972: 1707-1712.
- [197] Osawa T, Jeanloz RW. *An improved stereoselective synthesis of 2-amino-3-o-(d-l-carboxyethyl)-2-deoxy-d-glucose (muramic acid)*. J Org. Chem., 1965; 30: 448-&.
- [198] Lefrancier P, Derrien M, Lederman I, Nief F, Choay J, Lederer E. *Synthesis of some new analogs of immunoadjuvant glycopeptide mdp (N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine)*. Int. J Pept. Protein Res., 1978; 11: 289-296.
- [199] Isidro-Llobet A, Alvarez M, Albericio F. *Amino acid-protecting groups*. Chem. Rev., 2009; 109: 2455-504.
- [200] Goodman M, Toniolo C, Moroder L, Felix A. *Methods in Organic Chemistry, Volume E22, - Synthesis of Peptides and Peptidomimetics, Volumes 1-5 (Workbench Edition)*. Thieme Medical Publishers Inc.: Stuttgart and New York 2004.
- [201] Chevallet P, Garrouste P, Malawska B, Martinez J. *Facile synthesis of tert-butyl ester of n-protected amino-acids with tert-butyl bromide*. Tetrahedron Lett., 1993; 34: 7409-7412.
- [202] Goldschmidt S, Jutz C. *Über peptid-synthesen. Eine neue synthese des glutathions*. Chemische Berichte-Recueil, 1953; 86: 1116-1121.
- [203] Straka R, Zaoral M. *Amino-acids and peptides. Synthesis of iso-glutamine, iso-asparagine, and derivatives*. Collect. Czech. Chem. Commun. 1977; 42: 560-563.
- [204] Lefrancier P, Choay J, Derrien M, Lederman I. *Synthesis of n-acetyl-muramyl-l-alanyl-d-isoglutamine, an adjuvant of immune-response, and of some n-acetyl-muramyl-peptide analogs*. Int. J Pept. Protein Res., 1977; 9: 249-257.
- [205] Matsumoto K, Ogawa H, Kusama T, Nagase O, Sawaki N, Inage M, Kusumoto S, Shiba T, Azuma I. *Stimulation of nonspecific resistance to infection induced by 6-O-acyl muramyl dipeptide analogs in mice*. Infect. Immun., 1981; 32: 748-58.
- [206] Karellas P, mcaughton M, Baker SP, Scammells PJ. *Synthesis of bivalent beta2-adrenergic and adenosine A1 receptor ligands*. J Med. Chem., 2008; 51: 6128-37.
- [207] Loog M, Uri A, Raidaru G, Järv J, Ek P. *Adenosine-5'-carboxylic acid peptidyl derivatives as inhibitors of protein kinases*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 1999; 9: 1447-52.
- [208] Dzierzbicka K, Kołodziejczyk AM. *Synthesis and antitumor activity of conjugates of muramyldipeptide or normuramyldipeptide with hydroxyacridine/acridone derivatives*. J Med. Chem., 2003; 46: 183-9.

- [209] Sinha ND, Davis P, Schultze LM, Upadhy K. *A simple method for N-acylation of adenosine and cytidine nucleosides using carboxylic acids activated in-situ with carbonyldiimidazole*. Tetrahedron Lett., 1995; 36: 9277-9280.
- [210] Molko D, Roget A, Schulhof J-C, Teoule R. *N4-(3-phenylpropionyl)-2'-deoxycytidine*. Commissariat a l'Energie Atomique: France, 1988.
- [211] Brodelius P, Larsson PO, Mosbach K. *The synthesis of three AMP-analogues: N6-(6-aminohexyl)-adenosine 5'-monophosphate, N6-(6-aminohexyl)-adenosine 2',5'-biphosphate, and N6-(6-aminohexyl)-adenosine 3',5'-biphosphate and their application as general ligands in biospecific affinity chromatography*. Eur. J Biochem., 1974; 47: 81-9.
- [212] Sakamoto T, Mahara A, Yamagata K, Iwase R, Yamaoka T, Murakami A. *Evaluation of dynamic features of Escherichia coli 16S ribosomal RNA in homogeneous physiological solution*. Biophys. J, 2005; 89: 4122-4128.
- [213] Browne SM, Al-Rubeai M. *Defining viability in mammalian cell cultures*. Biotech. Lett., 2011; 33: 1745-1749.
- [214] Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A. *A practical note on the use of cytotoxicity assays*. Int. J Pharm., 2005; 288: 369-376.
- [215] Dzitko K, Dudzinska D, Grzybowski M, Dlugonska H. *The utility of MTT and XTT colorimetric tests in the studies conducted in vitro with Toxoplasma gondii tachyzoites*. Wiad. Parazytol., 2010; 56: 145-52.
- [216] Duque A, Rakic P. *Different Effects of Bromodeoxyuridine and H-3 Thymidine Incorporation into DNA on Cell Proliferation, Position, and Fate*. J Neuroscience, 2011; 31: 15205-15217.
- [217] Stockert JC, Blazquez-Castro A, Canete M, Horobin RW, Villanueva A. *MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets*. Acta Histochem., 2012; 114: 785-796.
- [218] Berridge MV, Herst PM, Tan AS. *Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction*. Biotechnol. Annu. Rev., 2005; 11: 127-52.
- [219] Hu VW, Black GE, Torres-Duarte A, Abramson FP. *3H-thymidine is a defective tool with which to measure rates of DNA synthesis*. FASEB J, 2002; 16: 1456-7.
- [220] Kuhn R, Baer H, Seeliger A. *Zur methylierung von N-Acetylglucosamin-derivaten*. Liebigs Ann. Chem., 1958; 611: 236-241.
- [221] Gross PH, Rimpler M. *Muramyl peptides. Stereochemically pure derivatives of muramic and isomuramic acids*. Liebigs Ann. Chem., 1986: 37-45.
- [222] Gozdowska M. *Synteza i aktywność biologiczna połączeń analogów MDP i nor-MDP z aminowymi pochodnymi nitroakrydyny i nitroakrydonu.*, Wydział Chemii Organicznej, Katedra Chemii Organicznej. Politechnika Gdańska, 1998.
- [223] Wang Z-F, Xu J-C. *Synthesis of Fluoro-containing muramyl dipeptide analogs*. Tetrahedron, 1998; 54: 12597-12608.

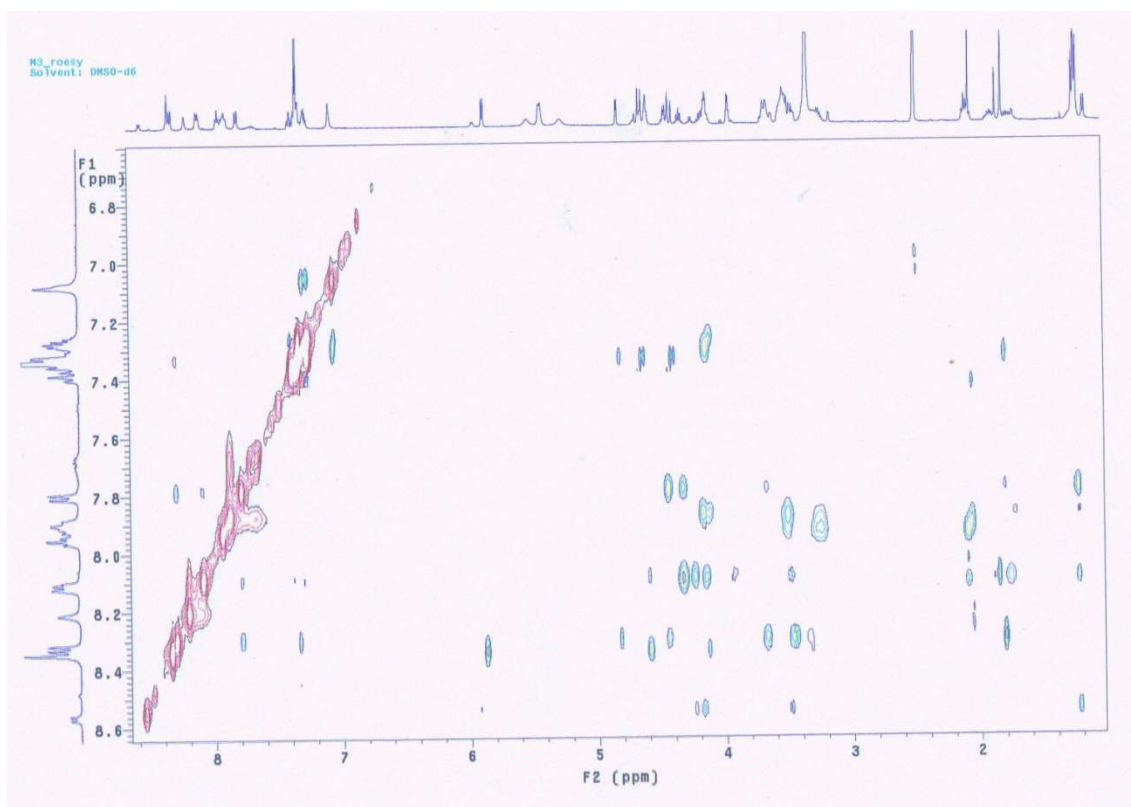
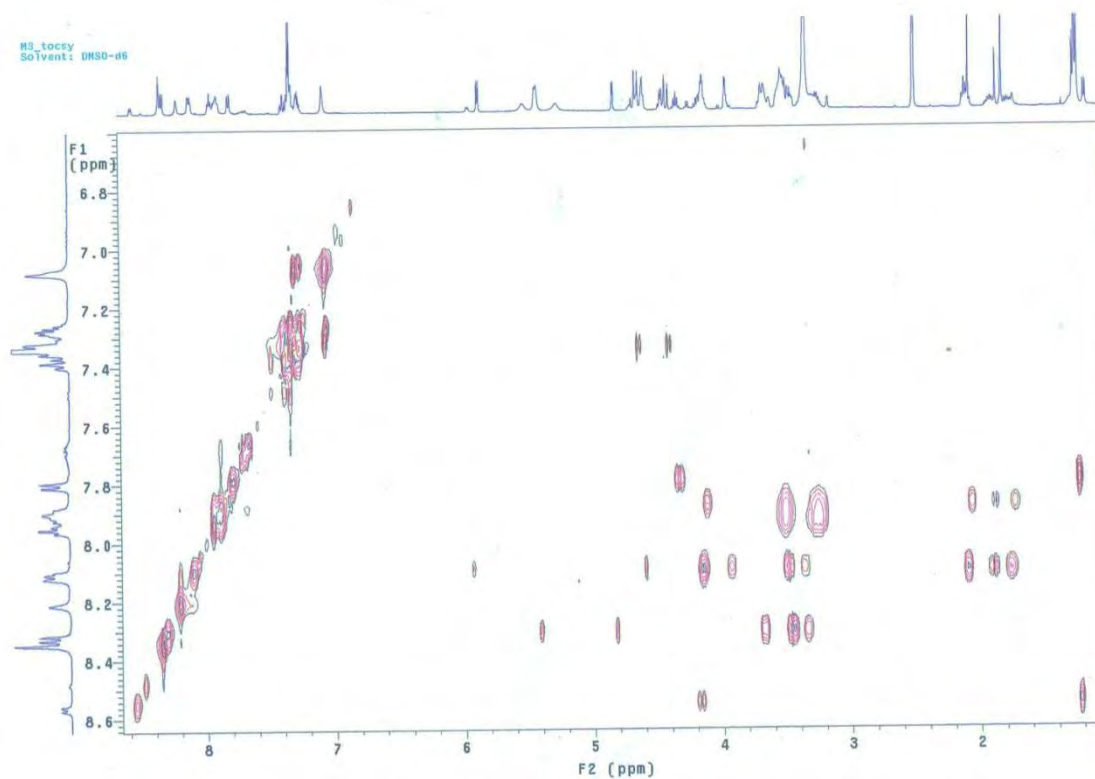
[224] Arendt A, Kołodziejczyk A, T S. *Ćwiczenia laboratoryjne z chemii organicznej*. Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej 1980.

[225] Nizami TA. *Bioassay directed isolation studies on plumeria rubra and solid phase synthesis of muramyl dipeptides via aminomethyl linker resins*. Research Institute of Chemistry. University of Karachi, 1998.

[226] Bishop DF, Desnick RJ. *Affinity purification of alpha-galactosidase a from human spleen, placenta, and plasma with elimination of pyrogen contamination - properties of the purified splenic enzyme compared to other forms*. J Biol. Chem., 1981; 256: 1307-1316.

[227] Dzierzbicka K, Sągol K, Wardowska A, Trzonkowski P. *Desmuramylopeptydy – struktura i aktywność biologiczna*. Wiad. Chem., 2009; 63: 1089-1114.

Załącznik 1. Widmo 2D ^1H NMR TOCSY i ROESY związku 62a



Załącznik 2. Widmo 2D ^1H NMR TOCSY i ROESY związku 62j

