

Politechnika Gdańska  
Wydział Chemiczny  
Katedra Chemii Organicznej

Rozprawa doktorska

**SYNTEZA I BADANIA BIOLOGICZNE NOWYCH  
AMINOKWASOWYCH ANALOGÓW KWASU MYKOFENOLOWEGO**

Mgr inż. Dorota Iwaszkiewicz-Grześ

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

GDAŃSK 2014

*Składam serdeczne podziękowania*

*Moim Promotorom:*

*Prof. Krystynie Dzierzbickiej*

*i Prof. Piotrowi Trzonkowskiemu*

*za opiekę merytoryczną, poświęcony czas,*

*nieustanną mobilizację do pracy*

*oraz pomoc podczas powstawania niniejszej pracy,*

*Pani Mgr Anicie Dobyszek*

*za nieocenioną pomoc laboratoryjną oraz życzliwość,*

*Dr inż. Grzegorzowi Cholewińskiemu*

*za kilkuletnią współpracę, wsparcie*

*oraz wszelką udzieloną pomoc,*

*Koleżankom i Kolegom z Katedry Chemii Organicznej*

*za wspianą atmosferę pracy oraz udzieloną pomoc,*

*Koleżankom i Kolegom*

*z Zakładu Immunologii Klinicznej i Transplantologii*

*za wsparcie naukowe oraz współpracę,*

*Koleżankom i Kolegom z Leuven*

*za wspianą atmosferę,*

*Katarzynie Kosteckiej*

*za wieloletnią przyjaźń, rozmowy*

*oraz mobilizację w wielu sferach mojego życia,*

*Rodzicom*

*za inspirację oraz ogromne wsparcie,*

*W szczególności pragnę podziękować mojemu mężowi*

*za wsparcie, mobilizację oraz przede wszystkim*

*cierpliwość i zrozumienie.*

## Spis treści

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW I SYMBOLI .....	7
STRESZCZENIE .....	11
WSTĘP .....	13
1. CZĘŚĆ LITERATUROWA .....	15
1.1. Immunosupresja i transplantologia .....	15
1.2. Kwas mykofenolowy (MPA) .....	19
1.2.1. Mechanizm działania MPA .....	19
1.2.2. Aktywność biologiczna MPA .....	20
1.2.3. Synteza MPA .....	20
1.2.4. Analogi kwasu mykofenolowego .....	23
1.2.5. Analogi MPA stosowane klinicznie .....	27
1.2.5.1. Mykofenolan mofetylu (MMF) .....	27
1.2.5.2. Mykofenolan sodu (EC-MPS) .....	28
1.3. Dehydrogenaza inozyno-5'-monofosforanu (IMPDH) – cel molekularny MPA .....	29
1.3.1. Struktura i funkcja IMPDH .....	29
1.3.2. Mechanizm działania IMPDH .....	30
1.3.3. Inhibitory ludzkiej IMPDH typu II wykorzystywane klinicznie .....	30
1.3.4. Inhibitory IMPDH oparte na strukturze MPA .....	33
1.3.5. Metabolizm MPA, MMF oraz MPS .....	38
2. CEL I ZAKRES PRACY .....	40
3. OMÓWIENIE WYNIKÓW PRACY .....	42
3.1. Prace syntetyczne .....	42
3.1.1. Synteza aminokwasowych analogów MPA w postaci estrów .....	42
3.1.2. Synteza aminokwasowych analogów MPA z wolną grupą karboksylową .....	44
3.2. Omówienie wyników badań biologicznych .....	46
3.2.1. Analiza przeżywalności komórek metodą MTT .....	48
3.2.1.1. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej metodą MTT aminokwasowych analogów MPA wobec linii komórkowej Jurkat oraz aktywowanych limfocytów .....	48

## Spis treści

3.2.2.	Analiza aktywności proliferacyjnej metodą inkorporacji TdR-3H .....	55
3.2.2.1.	Oznaczanie aktywności antyproliferacyjnej metodą inkorporacji TdR-3H aminokwasowych analogów MPA wobec linii komórkowej Jurkat oraz aktywowanych limfocytów .....	55
3.2.3.	Wybór analogów MPA o najkorzystniejszych parametrach .....	61
3.2.4.	Oznaczanie aktywności antyproliferacyjnej metodą inkorporacji TdR-3H aminokwasowych analogów MPA wobec linii komórkowej Jurkat w obecności GMP .....	62
3.2.5.	Test na obecność endotoksyny (LAL) .....	65
3.2.6.	Oznaczenie wpływu związków wyselekcjonowanych do badań <i>in vivo</i> na ekspansję i dojrzewanie komórek dendrytycznych z prekursorów monocytnych ludzkiej krwi obwodowej .....	66
3.2.7.	Oznaczenie wpływu komórek dendrytycznych na aktywność proliferacyjną metodą inkorporacji TdR-3H wobec limfocytów .....	72
3.2.8.	Oznaczenie szybkości zużywania związków przez komórki Jurkat na przykładzie związku <b>50e</b> z wykorzystaniem chromatografii HPLC .....	74
4.	CZEŚĆ EKSPERYMENTALNA .....	75
4.1.	Materiały stosowane podczas syntezy analogów MPA.....	77
4.2.	Synteza aminokwasowych analogów MPA w postaci estrów .....	78
4.2.1.	Chloromrówczan izobutyli i NMM (metoda mieszanych bezwodników) .....	78
4.2.2.	DPPA/TEA.....	78
4.2.3.	EEDQ/Py.....	79
4.2.4.	HBTU/NMM.....	79
4.2.5.	TBTU/HOBt.....	79
4.2.6.	BOP/HOBt .....	79
4.2.7.	DCC/NMM.....	80
4.2.8.	CCMT/DMAP .....	80
4.2.9.	EDCI/DMAP .....	80
4.2.9.1.	Synteza estru metylowego <i>N</i> -mykofenoilo-D-alaniny <b>49a</b> .....	81
4.2.9.2.	Synteza estru metylowego <i>N</i> -mykofenoilo-L-alaniny <b>49b</b> .....	81
4.2.9.3.	Synteza estru metylowego <i>N</i> -mykofenoiloglicyny <b>49c</b> .....	82
4.2.9.4.	Synteza diestru metylowego kwasu <i>N</i> -mykofenoilo-L-glutaminowego <b>49d</b> .....	83

4.2.9.5. Synteza diestru metylowego kwasu <i>N</i> -mykofenoilo-D-glutaminowego <b>49e</b> .....	83
4.2.9.6. Synteza estru metylowego <i>N</i> -mykofenoilo-L-waliny <b>49f</b> .....	84
4.2.9.7. Synteza estru metylowego <i>N</i> -mykofenoilo-D-waliny <b>49g</b> .....	85
4.2.9.8. Synteza estru metylowego <i>N</i> -mykofenoilo-L-leucyny <b>49h</b> .....	85
4.2.9.9. Synteza estru metylowego <i>N</i> -mykofenoilo-D-leucyny <b>49i</b> .....	86
4.2.9.10. Synteza estru metylowego <i>N</i> -mykofenoilo-L-fenylalaniny <b>49j</b> .....	87
4.2.9.11. Synteza estru metylowego <i>N</i> -mykofenoilo-D-fenylalaniny <b>49k</b> ....	87
4.3. Aminokwasowe analogi MPA z wolną grupą karboksylową.....	89
4.3.1. Synteza <i>N</i> -mykofenoilo-D-alaniny <b>50a</b> .....	89
4.3.2. Synteza <i>N</i> -mykofenoilo-L-alaniny <b>50b</b> .....	90
4.3.3. Synteza <i>N</i> -mykofenoiloglicyny <b>50c</b> .....	90
4.3.4. Synteza kwasu <i>N</i> -mykofenoilo-L-glutaminowego <b>50d</b> .....	91
4.3.5. Synteza kwasu <i>N</i> -mykofenoilo-D-glutaminowego <b>50e</b> .....	92
4.3.6. Synteza <i>N</i> -mykofenoilo-L-waliny <b>50f</b> .....	92
4.3.7. Synteza <i>N</i> -mykofenoilo-D-waliny <b>50g</b> .....	93
4.3.8. Synteza <i>N</i> -mykofenoilo-L-leucyny <b>50h</b> .....	94
4.3.9. Synteza <i>N</i> -mykofenoilo-D-leucyny <b>50i</b> .....	94
4.3.10. Synteza <i>N</i> -mykofenoilo-L-fenylalaniny <b>50j</b> .....	95
4.3.11. Synteza <i>N</i> -mykofenoilo-D-fenylalaniny <b>50k</b> .....	96
4.4. Materiały stosowane w badaniach biologicznych .....	97
4.4.1. Linie komórkowe .....	98
4.4.2. Podłoża hodowlane .....	98
4.5. Metody stosowane w badaniach biologicznych .....	99
4.5.1. Hodowla linii komórkowej Jurkat.....	99
4.5.1.1. Pasażowanie linii komórkowej.....	99
4.5.1.2. Rozmrażanie linii komórkowej .....	99
4.5.1.3. Mrożenie linii komórkowej .....	99
4.5.2. Przygotowanie rozcieńczeń analogów MPA.....	99
4.5.3. Hodowla mononuklearnych komórek krwi obwodowej (PBMC) .....	99
4.5.4. Test kolorymetryczny MTT .....	100
4.5.4.1. Linia komórkowa Jurkat.....	100
4.5.4.2. PBMC .....	100
4.5.5. Test proliferacyjny .....	101

## *Spis treści*

4.5.5.1. Linia komórkowa Jurkat oraz PBMC.....	101
4.6. Test LAL .....	101
4.7. Izolacja monocytów.....	102
4.8. Ekspansja monocytarnych komórek dendrytycznych .....	102
4.9. Badania cytometryczne .....	103
4.10. Test funkcjonalny .....	104
5. PODSUMOWANIE I WNIOSKI .....	105
6. SUMMARY .....	108
7. DOROBEK NAUKOWY .....	110
8. LITERATURA.....	113
9. Widma $^1\text{H}$ NMR, $^{13}\text{C}$ NMR i MS przykładowych związków.....	130

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW I SYMBOLI

AcCoA	-	acetylokoenzym A
AcMPAG	-	mykofenolan glukuronianu acetylu
AIDS	-	zespół nabytego niedoboru odporności (ang. <b>Acquired Immunodeficiency Syndrome</b> lub <b>Acquired Immune Deficiency Syndrome</b> )
AMP	-	adenozyno-5'-monofosforan
APC	-	komórki prezentujące antygen (ang. <b>Antigen-Presenting Cell</b> )
AZA	-	azatiopryna
Bn	-	benzyl
BOP	-	benzotiazol-1-yl-oksytri-(dimetyloamino)fosforan heksafluorofosforanu
BrdU	-	5-bromo-2-deoksyurydina
BT	-	błękit trypanu
CCMT	-	1-cykloheksylo-3-(2-morfolinoetylo)karbodiimidometylo- <i>p</i> -toluenosulfon
CML	-	przewlekła białaczka szpikowa (ang. <b>Chronic Myelogenous Leukemia</b> )
CPM	-	liczba zliczeń na minutę (ang. <b>Counts Per Minute</b> )
DC	-	komórki dendrytyczne
DCC	-	<i>N,N'</i> -dicykloheksylokarbodiimid
DIPEA	-	diizopropylloetyloamina
DMAP	-	dimetyloaminopirydina
DMF	-	<i>N,N</i> -dimetyloformamid
DPPA	-	difenylofosforyloazydek
EC <sub>50</sub>	-	stężenie efektywne (stężenie składnika, przy którym 50% organizmów wykazuje skutek w określonym czasie)
EDCI	-	chlorowodorek 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyllo)karbodiimidu
EEDQ	-	<i>N</i> -etoksykarbonylo-2-etoksy-1,2-dihydroksychinolina
E-IMP-NAD	-	kompleks enzym-IMP-NAD
EMA	-	Europejska Agencja Leków (ang. <b>European Medicines Agency</b> )
F	-	Test Fishera
FBS	-	płodowa surowica wołowa (ang. <b>Fetal Bovine Serum</b> )

Wykaz stosowanych skrótów i symboli

FDA	-	Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (ang. <b>Food and Drug Administration</b> )
fMPA	-	wolny MPA (ang. <b>Free MPA</b> )
GDP	-	guanozyno-5'-difosforan
GM-CSF	-	czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (ang. <b>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</b> )
GMP	-	guanozyno-5'-monofosforan
GMP-DC	-	medium hodowlane komórek dendrytycznych
GTP	-	guanozyno-5'-trifosforan
HDACs	-	deazetylaza histonowa
HBTU	-	<i>O</i> -benzotriazol- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametylouronian tetrafluorofosforanu
<sup>1</sup> H NMR	-	protonowy magnetyczny rezonans jądrowy
HOBt	-	hydroksybenzotriazol
HSV-1/2	-	wirus opryszczki pospolitej 1 / 2 (łac. <i>Herpes Simplex Virus</i> )
IC <sub>50</sub>	-	stężenie hamujące (stężenie powodujące cytotoksyczność 50% komórek w stosunku do kontroli)
IL-2, 3, 4, 5, 6	-	interleukina 2, 3, 4, 5, 6
IMP	-	5'-monofosforan inozyny
IMPDH	-	dehydrogenaza inozyno-5'-monofosforanu
LAL	-	<b>Limulus Amebocyte Lysate</b>
LDH	-	dehydrogenaza mleczanowa
LPS	-	lipopolisacharyd
MABS	-	pochodna mykofenolowy-adenylo(sulfonoamidowa)
MAHA	-	mykofenolan kwasu hydroksamowego
MDR	-	oporność wielolekowa
MHC	-	główny układ zgodności tkankowej (ang. <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
MMF	-	mykofenolan mofetylu
moDCs	-	mieloidalne komórki dendrytyczne
MPA	-	kwas mykofenolowy
MPAG	-	mykofenolan glukuronianu fenylu
MPS	-	mykofenolan sodu
MS	-	spektrometria mas



Wykaz stosowanych skrótów i symboli

mTOR	- inhibitory sygnału proliferacji (ang. <b>Mammalian Target Of Rapamycin</b> )
MTT	- bromek 3-(4,5-dimetylo-2-ilo)-2,5-difenylotetrazolu
MZB	- mizorybina
NAD	- dinukleotyd nikotynamidoadeninowy
NAD <sup>+</sup> /NADH	- dinukleotyd nikotynamidoadeninowy (forma uleciona/forma zredukowana)
NAG	- <i>N</i> -acetyloglukozamina
NAN	- not a number
NK	- komórki NK, naturalni zabójcy (ang. <b>Natural Killers</b> )
NMM	- <i>N</i> -metylomorfolina
NMR	- Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. <b>Nuclear Magnetic Resonance</b> )
NOX2	- oksydaza NADPH
p	- istotność statystyczna
PBMC	- komórki jednojądrowe krwi obwodowej (ang. <b>Peripheral Blood Mononuclear Cells</b> )
PBS	- bufor fosforanowy
pDCs	- plazmatyczne komórki dendrytyczne
pNA	- <i>p</i> -nitroanilina
PP <sub>i</sub>	- reszta kwasu ortofosforowego
PPAR <sub>γ</sub>	- receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów gamma (ang. <b>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma</b> )
PRPP	- fosforybozylopirofosforan
Py	- pirydyna
RCKiK	- Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa
SAR	- zależność struktura-aktywność
SI	- współczynnik selektywności
SPE	- ekstrakcja do fazy stałej (ang. <b>Solid Phase Extraction</b> )
TAD	- dinukleotyd tiazol-4-karboksyamidowo-adeninowy
TBTU	- <i>O</i> -(benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametylouronian tetrafluoroboranu
TdR-3H	- metyl-[ <sup>3</sup> H]-tymidyny
TEA	- trietyloamina

*Wykaz stosowanych skrótów i symboli*

temp. pok.	-	temperatura pokojowa
temp. top.	-	temperatura topnienia
TLC	-	chromatografia cienkowarstwowa (ang. <b>Thin Layer Chromatography</b> )
TNF- $\alpha$	-	czynnik nekrozy nowotworów
TR	-	tiazofuryna
UGTs	-	enzym UDP-glukuronylotransferaza
wyd.	-	wydajność
XMP	-	5'-monofosforan ksantyny
XTT	-	sól sodowa 2,3-bis(2-metoksy-4-nitro-5-sulfofenylo)-2H-tetrazolo-5-karboksyanilidu

## STRESZCZENIE

Immunosupresja jest procesem polegającym na hamowaniu reakcji immunologicznych. Odgrywa ona zasadniczą rolę zarówno w transplantologii, jak i w leczeniu chorób z autoagresji. Stosowane leki immunosupresyjne m.in. kwas mykofenolowy (MPA) **6**, mykofenolan mofetylu (MMF) **7** czy mykofenolan sodu (EC-MPS) **8** (Rys. 2) zapobiegają nie tylko ostremu, ale również przewlekłemu odrzucaniu przeszczepu. W związku z metabolizowaniem MPA do nieaktywnego 7-*O*-glukuronidu musi być on stosowany w dużych dawkach. Wywołuje to szereg skutków ubocznych (dolegliwości ze strony układu pokarmowego, moczowo-płciowego czy nerwowego) dlatego wciąż poszukuje się nowych jego analogów o lepszych właściwościach farmakologicznych.

Kontynuując poszukiwania mniej toksycznych, bardziej selektywnych i bezpieczniejszych immunosupresantów zaprojektowałam nowe aminokwasowe analogi kwasu mykofenolowego (MPA) zarówno w postaci estrów metylowych **49a-k** (Schemat 8), jak i z wolną grupą karboksylową **50a-k** (Schemat 9).

Syntezę zaplanowanych połączeń MPA z estrami metylowymi aminokwasów (Gly oraz Ala, Val, Glu, Leu, Phe w postaci L- i D-enancjomerów) prowadziłam w roztworze stosując odpowiednie odczynniki kondensujące i warunki prowadzenia reakcji (HBTU/NMM, BOP/HOBt, DCC/NMM, TBTU/HOBt, DPPA/TEA, EEDQ/Py, EDCI/DMAP, CCMT/DMAP) oraz metodę mieszanych bezwodników z chloromrówczanem izobutyli i NMM. Najlepsze wydajności reakcji i najczystsze produkty otrzymałam z EDCI w obecności DMAP prowadząc reakcję w bezwodnym DMF w temperaturze 0°C. Zsyntetyzowałam 11 pochodnych estrowych (**49a-k**), które następnie poddałam deprotekcji za pomocą LiOH/MeOH otrzymując aminokwasowe analogi MPA z wolną grupą karboksylową (**50a-k**). Zsyntetyzowane z dobrymi wydajnościami związki scharakteryzowałam za pomocą technik spektroskopowych (<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, MS) oraz analitycznych (TLC, MS-HPLC), a także określiłam ich temp. top. i skręcalność właściwą.

Wszystkie otrzymane związki (**49a-k**, **50a-k**) i MPA **6** poddałam wstępnym badaniom biologicznym *in vitro* na limfoidalnej linii komórkowej Jurkat oraz mononuklearnych komórkach krwi obwodowej (PBMC) pochodzących od zdrowych dawców. Wykonałam: testy żywotności MTT badające toksyczność związków (**49a-k**, **50a-k**, **6**) w celu wyznaczenia IC<sub>50</sub>; testy aktywności proliferacyjnej metodą inkorporacji TdR-3H w celu wyznaczenia EC<sub>50</sub>; porównałam aktywności analogów (**49a-k**, **50a-k**) w stosunku do MPA **6** wyznaczając współczynnik selektywności; wykonałam testy selektywności efektu działania związków

## Streszczenie

(49a-k, 50a-k, 6) wobec IMPDH poprzez badanie aktywności antyproliferacyjnej metodą inkorporacji TdR-3H wobec linii komórkowej Jurkat z dodatkiem GMP. Na podstawie uzyskanych wyników wybrałam związki o najkorzystniejszych parametrach do badań *in vivo*.

Wyselekcjonowane analogi poddałam kolejnym testom. Określiłam ich wpływ na ekspansję i dojrzewanie komórek dendrytycznych (DC) wykorzystując fenotypowanie z przeciwciałami: lineage cocktail 1 (lin 1 - CD3, CD14, CD16, CD19, CD20); HLA-DR PerCP-CY5.5; APC CD11c; CD123 PE-CY7; CD80 PE; CD83 PE; CD86 PE. Następnie badałam wpływ komórek dendrytycznych traktowanych badanymi związkami na aktywność proliferacyjną alogenicznych limfocytów T metodą inkorporacji TdR-3H. Jednocześnie zbadalam wyselekcjonowane związki na obecność endotoksyn od których zależy dojrzewanie DC.

## **WSTĘP**

Transplantologia jest jedną z najszybciej rozwijających się dziedzin nauki. Przeszczep pozostaje jedyną drogą leczenia chorób powodujących schyłkową niewydolność narządów. Ze względu na ograniczoną dostępność dawców, wielu chorych oczekuje na przeszczep przez długi okres czasu, co skutkuje wyższą śmiertelnością [1]. W roku 2009 Europejska Agencja Leków (EMA) wydała oświadczenie, w którym informowała, że rocznie dokonuje się 15 000 przeszczepów nerki (w tym 2000 od żyjących dawców), 5 500 przeszczepów wątroby, 2000 serca, 900 płuc (100 w kombinacji serce-płuco) oraz 700 trzustki [2]. Ilość wykonanych przeszczepów pediatrycznych stanowi ok. 5% ogólnej liczby przeszczepów [2].

Częstość odrzucania przeszczepu zależy od wielu czynników wewnętrznych oraz od rodzaju przeszczepu. Występowanie ostrego odrzutu jest bardzo zróżnicowane w zależności od narządu. W ciągu pierwszych 12 miesięcy odnotowano 10-40% dla nerki, 20-50% dla wątroby, 10-40% dla trzustki, ok. 50% dla płuc oraz 50-80% w przypadku przeszczepu serca w ciągu pierwszych 6 miesięcy [2].

Po każdym przeszczepie niezbędne jest rozpoczęcie terapii immunosupresyjnej, która decyduje o powodzeniu transplantacji. Stosowane leki immunosupresyjne powinny być jak najbardziej selektywne, aby zminimalizować ryzyko nadmiernej immunosupresji, która może powodować zwiększone ryzyko nowotworów oraz infekcji bakteryjnych, wirusowych czy grzybiczych [1, 3].

Jak już wspomniałam wcześniej bardzo istotny jest dobór odpowiedniej terapii immunosupresyjnej. Istnieje kilka rodzajów małocząsteczkowych immunosupresantów m.in. leki hamujące kalcyneurynę, leki hamujące podziały komórkowe oraz leki hamujące mTOR [4, 5]. Kolejnym rodzajem są preparaty biologiczne, m.in. przeciwciała poliklonalne, przeciwciała monoklonalne anty-CD3, anty-CD25, anty-CD20, anty-CD52, a także poliklonalne surowice antylimfocytarne [6-11].

W przeszczepach wątroby, nerki i serca najczęściej stosowane są pochodne kwasu mykofenolowego (MPA) **6** – mykofenolan mofetylu (MMF) **7** oraz mykofenolan sodu (EC-MPS) **8** (Rys. 2) w monoterapii lub częściej w leczeniu skojarzonym z innymi immunosupresantami [12].

Niestety żaden ze znanych leków nie jest pozbawiony skutków ubocznych. W celu zmniejszenia występujących dolegliwości naukowcy nadal pracują nad bezpieczniejszymi potencjalnymi lekami.

## *Wstęp*

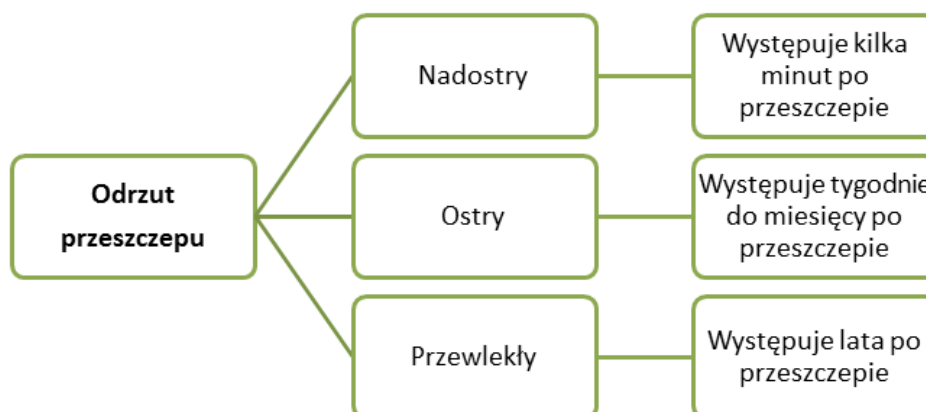
W swojej pracy przedstawiłam syntezę nowych aminokwasowych analogów kwasu mykofenolowego oraz wyniki przeprowadzonych badań *in vitro*.

## 1. CZĘŚĆ LITERATUROWA

### 1.1. Immunosupresja i transplantologia

Transplantologia jest stosunkowo młodą dziedziną nauki zajmującą się przeszczepianiem narządów. W 1954 roku Murray [13] jako pierwszy dokonał udanego przeszczepu nerki i w 1990 roku otrzymał nagrodę Nobla w dziedzinie medycyny. W Polsce pierwsza próba przeszczepu nerki odbyła się w 1965 roku, zaś powodzeniem zakończył się przeszczep wykonany w 1966 roku przez Nielubowicza oraz Orłowskiego [14]. Obecnie zabiegi takie wykonuje się praktycznie codziennie. Transplantacja ratuje i poprawia jakość życia wielu pacjentów i jest związana ze stosowaniem do końca życia odpowiednich leków immunosupresyjnych.

Immunosupresja polega na zahamowaniu reaktywności układu immunologicznego. Istnieje wiele związków o różnej budowie i mechanizmie działania zaliczanych do immunosupresantów. Powodują one osłabienie bądź hamowanie odpowiedzi immunologicznej i stosowane są przy przeszczepach narządów (np. nerek, wątroby, serca, szpiku, płuc, rogówki oka) i tkanek w celu zapobiegania odrzutom oraz w chorobach autoimmunologicznych (np. stwardnienia rozsianego) [15]. W praktyce klinicznej stosowane leki nie są jednak pozbawione skutków ubocznych. W związku z tym nadal poszukuje się nowych leków lub modyfikuje się już istniejące w celu wyeliminowania lub ograniczenia zagrożenia odrzucenia przeszczepu (Schemat 1). Najnowsze wyniki poszukiwań immunosupresantów przedstawiono w publikacji Dzierzbicka i in [16].



**Schemat 1.** Podział odrzutów przeszczepów.

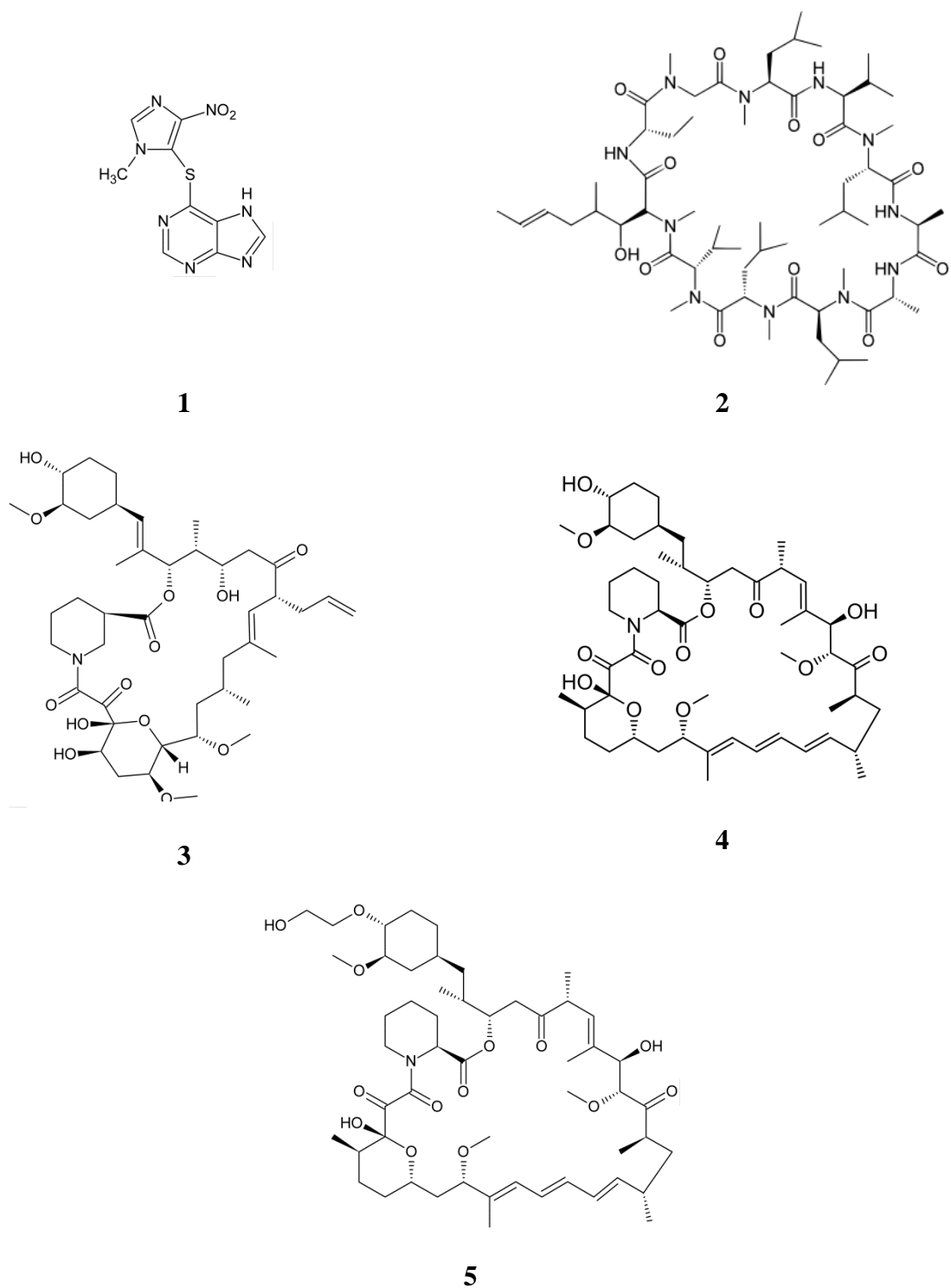
Wyróżniamy kilka grup leków immunosupresyjnych stosowanych w medycynie [15, 16]:

1. glikokortykosteroidy np. prednizon, metyloprednizolan,
2. leki cytostatyczne,
3. przeciwciała monoklonalne,
4. leki działające na immunofiliny: cyklosporyna, takrolimus, sirolimus, ewerolimus,
5. leki antyproliferacyjne: azatiopryna, MMF, MPA,
6. leki nieklasyfikowane: interferony, białko wiążące TNF.

Terapię immunosupresyjną rozpoczyna się przed przeszczepem, a następnie kontynuuje po przeszczepie do końca życia. Zazwyczaj podawana jest mieszanina trzech leków, np. pierwszym jest związek z grupy glikokortykosteroidów hamujących produkcję cytokin biorących udział w aktywacji komórek [16], drugim inhibitor kalcyneuryny, lek łączący się z immunofiliną, a trzecim inhibitor proliferacji limfocytów [16].

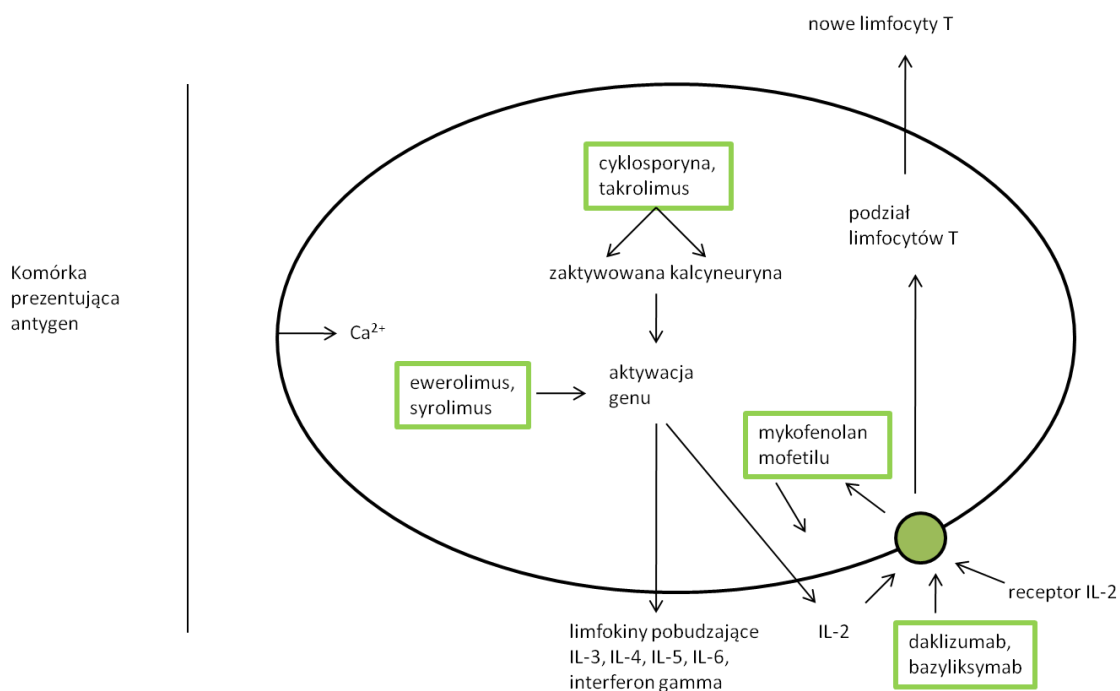
Jednym z pierwszych stosowanych leków była azatiopryna **1** (Rys. 1). Inną często używaną substancją jest cyklosporyna **2** (Rys. 1), należąca do inhibitorów kalcyneuryny. Jej końcowy efekt polega na osłabieniu działania limfocytów efektorowych T [15]. Dodatkowo hamuje ona oporność wielolekową MDR w badaniach *in vitro* i *in vivo* [16]. Wykazuje ona niestety właściwości nefrotoksyczne dlatego często zastępuje się ją takrolimusem **3** (Rys. 1) posiadającym identyczny mechanizm działania, ale słabszy efekt nefrotoksyczny [17]. Sirolimus **4** (Rys. 1) wykazuje inny mechanizm działania, tzn. hamuje II, a nie I fazę aktywacji limfocytów T. Stosowany jest on najczęściej z glikokortykosteroidami i cyklosporyną A [18]. Ewerolimus **5** (Rys. 1) jest analogiem sirolimusu o podobnym mechanizmie działania i większej biodostępności [19]. Daklizumab i bazyliksymab należą do antylimfocytarnych przeciwciał monoklonalnych. Oba preparaty są dobrze tolerowane przez organizm [20].





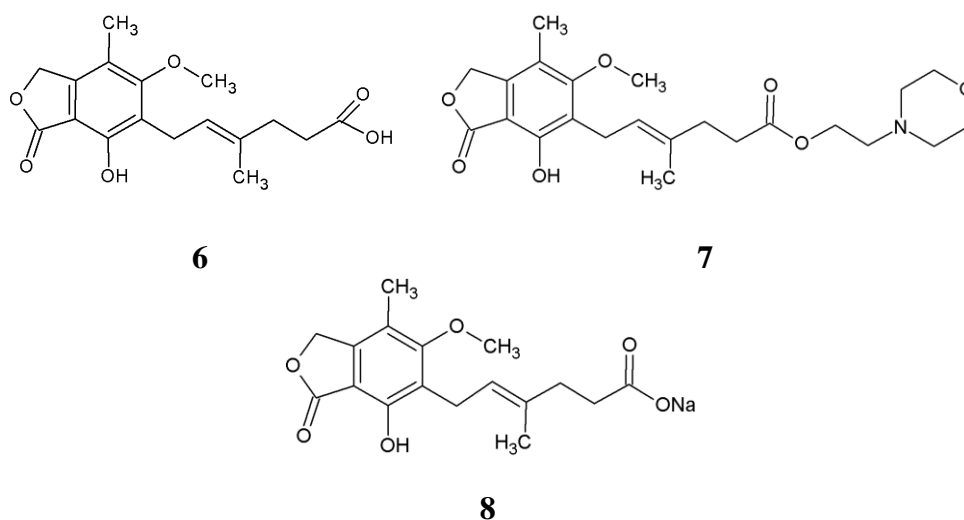
**Rys. 1.** Struktury stosowanych leków immunosupresyjnych **1-5** [15-19].

Mechanizm działania wcześniej opisanych związków na limfocyty T został przedstawiony na Schemacie. 2.



**Schemat 2.** Mechanizm działania leków immunosupresyjnych na limfocyty T [15].

Substancją wykazującą aktywność immunosupresyjną jest również kwas mykofenolowy (MPA) **6**, którego dwie pochodne stosowane są klinicznie – mykofenolan mofetylu (MMF) **7** oraz mykofenolan sodu (EC-MPS) **8** (Rys. 2).



**Rys. 2.** Struktura MPA **6**, MMF **7** i EC-MPS **8** [16, 21].

## 1.2. Kwas mykofenolowy (MPA)

Kwas mykofenolowy (MPA) **6** (Rys. 2) po raz pierwszy został wyizolowany w 1896 roku przez Gosio [21]. Jest on naturalnym metabolitem pleśni z rodzaju *Penicillium* zwłaszcza *P. brevicompactum*, *P. stoloniferum* i *P. roqueforti* [22]. Pomimo, iż został on wyizolowany w XIX wieku to jego strukturę określono dopiero w 1957 roku [23], zaś pierwszą chemiczną syntezę opisano w 1969 roku [24]. MPA zbudowany jest z aromatycznego pierścienia zawierającego grupy -OH, -CH<sub>3</sub>, -OCH<sub>3</sub> i sześciowęglowego łańcucha bocznego z wiązaniem podwójnym zakończonym grupą karboksylową oraz 6-podstawionego układu ftalidowego. Geometria wiązania podwójnego odgrywa zasadniczą rolę. Jedyne związki o konfiguracji *trans* charakteryzowały się aktywnością biologiczną.

MPA wykazuje szereg właściwości m.in. przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze (odkryte w 1940 roku), immunosupresyjne oraz przeciwwirusowe [25]. Związek ten należy do leków immunosupresyjnych stosowanych w zapobieganiu zarówno ostremu, jak i przewlekłemu odrzucaniu przeszczepu [26-28]. Jednak jego liczne skutki uboczne ze strony układu pokarmowego m. in. biegunka, wymioty czy nudności spowodowały, że nadal poszukuje się nowych analogów [29]. MPA po raz pierwszy został zastosowany w transplantologii w 1995 roku. W 2004 roku stał się drugim najczęściej przepisywanym immunosupresantem w Stanach Zjednoczonych [30].

### 1.2.1. Mechanizm działania MPA

Głównym celem molekularnym MPA jest IMPDH [31]. MPA jest specyficznym, silnym, niekompetycyjnym i odwracalnym inhibitorem IMPDH izoformy typu II [32, 33]. Pomimo hamowania obu izoform IMPDH, to jej aktywność jest 5 razy większa w stosunku do IMPDH II [32].

Literatura wskazuje, że kwas mykofenolowy łączy się z wcześniej utworzonym kompleksem E-IMP-NAD poprzez wiązanie z subdomeną N oraz częścią subdomeny P [32, 34]. MPA wiąże się w następujący sposób [33]:

- pierścień aromatyczny – wiązanie z miejscem przeznaczonym dla cząsteczki nikotynamidu,
- część laktonowa – rozłożenie na tzw. region PDB1JR1,
- łańcuch boczny – poprzez oddziaływanie z Ser 276 tworzy się wiązanie z częścią subdomeny P, zaś subdomena A pozostaje natomiast pusta.

Cząsteczka MPA tworzy również kilka wiązań *van der Waalsa* z miejscem aktywnym IMPDH składającym się z Asp 274, Ser 276, Asn 303, Arg 322, Gln 441, które reagują z podstawnikiem metoksyowym, metylowym oraz łańcuchem bocznym. Dodatkowo wytwarzane są wiązania wodorowe tworzone przez atom tlenu występujący w pierścieniu laktonowym oraz wodorem Gly 326 i Thr 333. Także grupa fenolowa generuje wiązania wodorowe z Thr 333 i Gln 441. Udowodniono wpływ konfiguracji wiązania podwójnego kwasu mykofenolowego. Ułożenie *trans* sprzyja tworzeniu wiązania pomiędzy grupą hydroksylową pochodzącą od Ser 276, a atomami tlenu grupy karboksylowej MPA [33].

### 1.2.2. Aktywność biologiczna MPA

Jak wspomniałam wcześniej kwas mykofenolowy jest inhibitorem IMPDH. W związku z tym powoduje zmniejszenie ilości trifosforanu guanozyny w komórkach. To zaś skutkuje zatrzymaniem cyklu komórkowego w fazie G1, zahamowanie proliferacji limfocytów, hamowanie dojrzewania komórek dendrytycznych (DC), zahamowanie produkcji przeciwciał stymulowanych miogenami i antygenami, indukcję apoptozy aktywowanych limfocytów T. Hamuje on również proliferację limfocytów T i ich migrację do przeszczepu [35-39].

Pomimo, iż większość naukowców uważa, że MPA wykazuje działanie apoptotyczne to ukazało się również wiele informacji o jego działaniu nekrotycznym [40].

Dodatkowo znaleziono związek między MPA a rakiem stercza [41, 42], nerwiakiem płodowym [43, 44], rakiem piersi [45], białaczką [46] i czerniakiem [47].

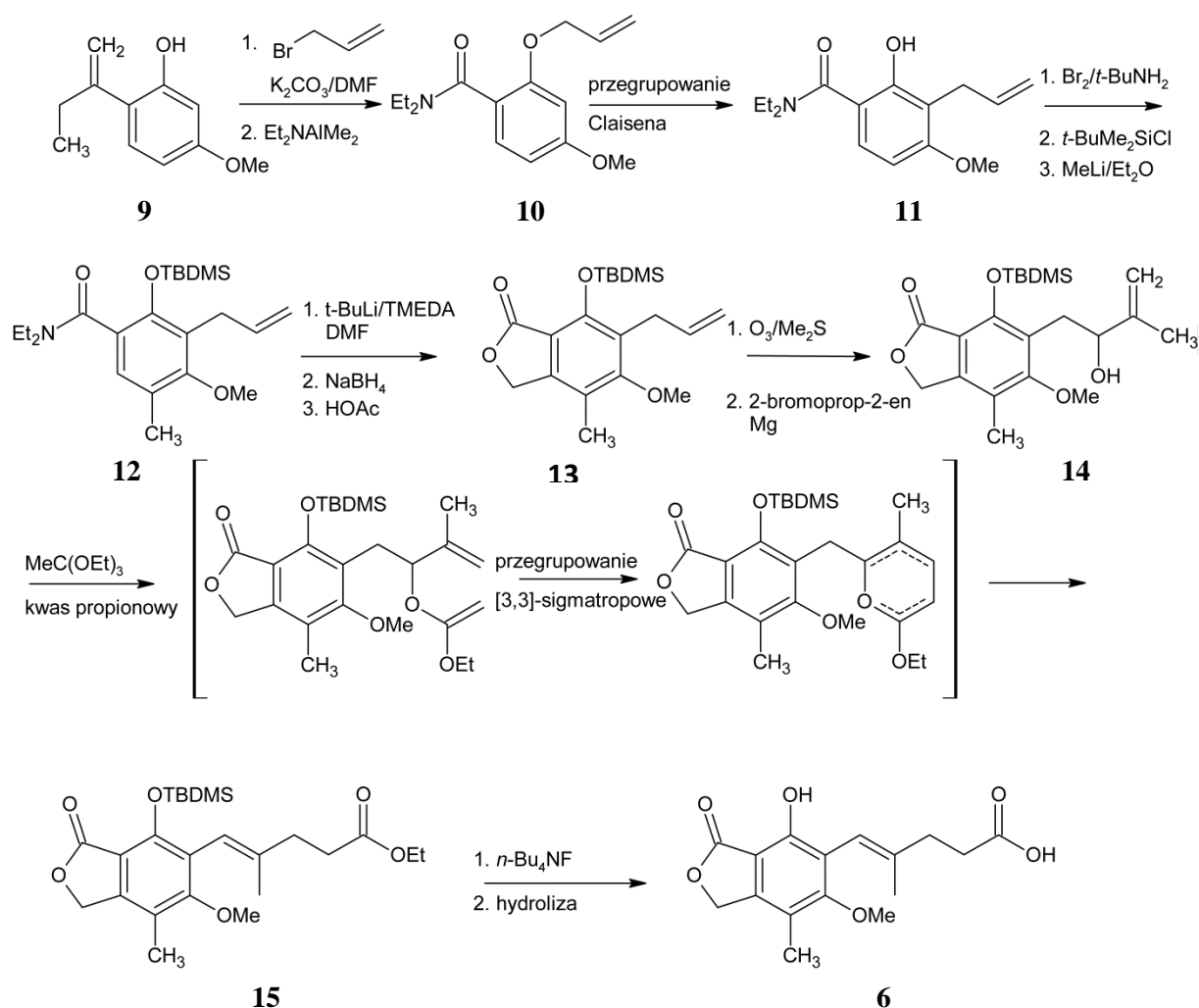
Jednocześnie jest on inhibitorem NOX2 [48, 49] oraz agonistą receptora PPAR $\gamma$  [50].

### 1.2.3. Synteza MPA

Opisano kilka metod syntezy MPA m.in. Bircha i Wrighta [51], Pattersona [52-54], R.A. de la Cruza [55], Danheisera [56], Covarrubias-Zuñiga [57-59], Canonica [60] czy Plé [61].

W naszym laboratorium stosowaliśmy syntezę Pattersona [52] wykorzystującą 2-hydroksy-metoksybenzoesan metylu **9** i 3-bromoprop-1-en, a następnie Et<sub>2</sub>NAlMe<sub>2</sub> otrzymując *N,N*-dietylo-4-metoksy-2-(prop-2-enylo)benzamid **10**, który w wyniku przegrupowania Claisena przekształca się w fenol **11**. Następnie przeprowadzono bromowanie oraz metylowanie w pozycji 6 poprzedzone wprowadzeniem grupy ochronnej na grupę hydroksylową. Otrzymany *N,N*-dietylo-2-[(*tert*-butylodemetylosililo)oksy]-4-metoksy-

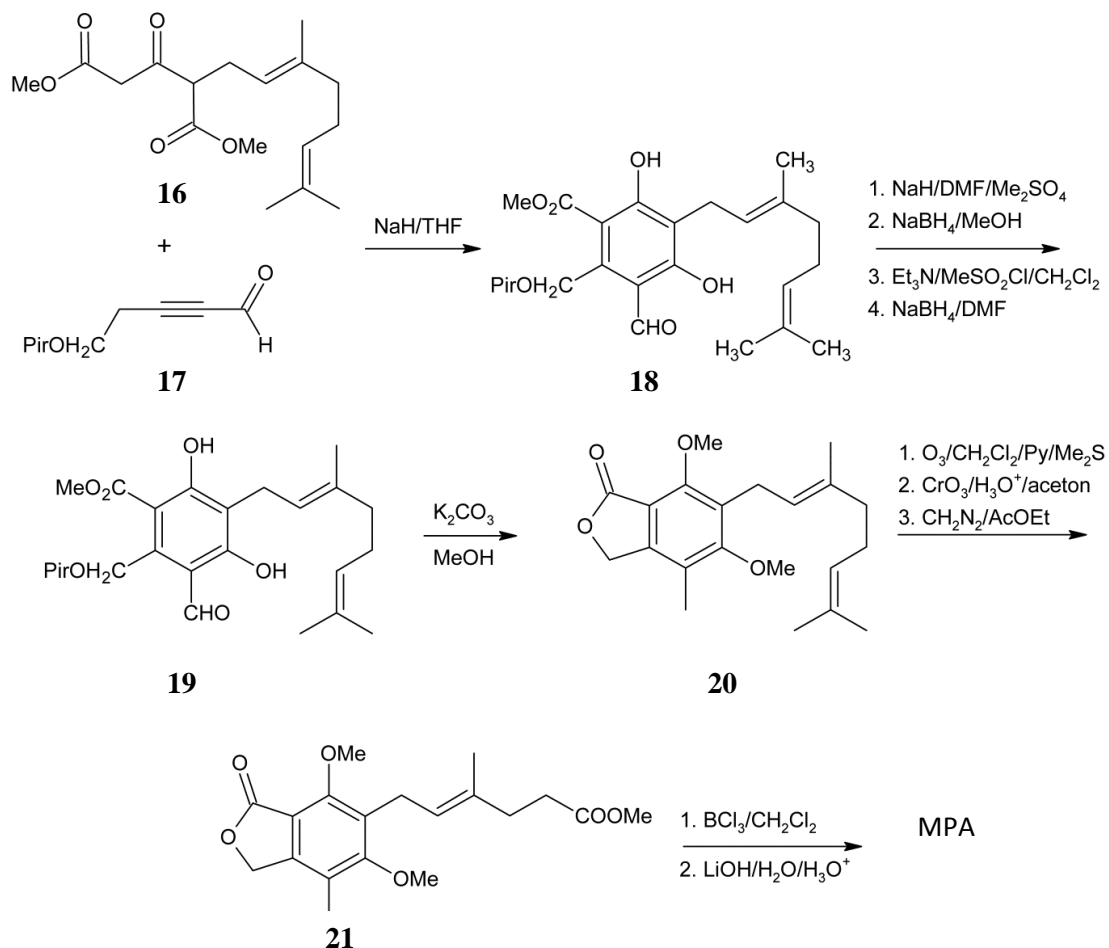
5-metylo-3-(prop-3-enylo)benzamid **12** poddano redukcji hydroboranem sodu w celu otrzymania alkoholu oraz laktonizacji w obecności kwasu octowego. Otrzymano 1,3-dihydro-4-[(*tert*-butylodimetylosililo)oksy]-6-metoksy-7-metylo-3-okso-5-(prop-2-enylo)izobenzofuran **13**, który poddano utlenieniu do aldehydu i przekształceniu w alkohol allilu **14** w wyniku reakcji z bromkiem 2-propylenomagnezu. Alkohol **14** był substratem w przegrupowaniu Johnsona-Claisena w celu otrzymania alkenu o konfiguracji *trans* **15**. Produkt ten poddano deprotekcji oraz hydrolizie w celu otrzymania MPA **6** (Schemat 3).



**Schemat 3.** Synteza MPA zaproponowana przez Pattersona [52].

Jedną z najnowszych metod otrzymywania MPA **6** została opisana przez Covarrubias-Zuñiga [57-59]. W metodzie tej 6-cio podstawiony benzen **18** otrzymywany jest w jednym etapie. Reakcja aldehydu **17** z pochodną geranialu **16** zachodzi zgodnie z reakcją addycji Michaela, po której następuje kondensacja Dieckmanna. Następnie grupa fenolowa związku

**18** zostaje poddana metylacji, a grupę aldehydową redukuje się do grupy metylowej. Otrzymany związek **19** przekształcano w lakton **20**. W kolejnych dwóch etapach, utlenianiu i redukcji z diazometanem otrzymywano ester metylowy **21**, który poddano selektywnej demetylacji oraz hydrolizie otrzymując MPA **6** (Schemat 4).



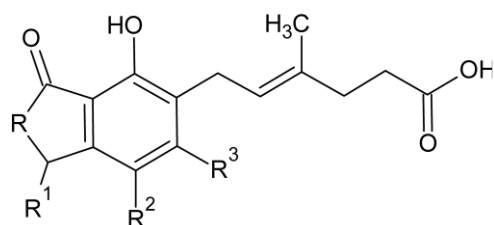
**Schemat 4.** Synteza MPA **6** zaproponowana przez Covarrubias-Zuñiga [57-59].

### 1.2.4. Analogi kwasu mykofenolowego

#### I. Modyfikacje pierścienia aromatycznego i laktonowego [62]

Modyfikacja ta polega na zastąpieniu pierścienia laktonowego przez inne cykliczne fragmenty, bądź podstawienie grup 6-OCH<sub>3</sub> i 7-CH<sub>3</sub> innymi resztami.

Wszystkie pochodne, w których modyfikowano pierścień laktonowy były słabszymi inhibitorami IMPDH II w porównaniu z MPA. Wymiana tlenu laktonowego na siarkę (**22a**), CH<sub>2</sub> (**22b**) czy NH (**22c**) prowadziła do 5-10-krotnego zmniejszenia aktywności. Zastąpienie tlenu dużą grupą np. NCH<sub>3</sub> (**22d**) powodowało nawet 400-krotnie mniejszą aktywność niż w przypadku grupy NH. Dołączenie grupy CH<sub>3</sub> do ftalidu metylenowego (**22e**) również powodowało spadek aktywności związku. Wymiana grupy metoksylowej na winyl (**22f**), etyl (**22g**) czy metyl (**22h**) prowadziła do otrzymania związku o podobnej bądź wyższej aktywności w stosunku do MPA. Większe grupy powodowały spadek aktywności, podobnie jak podstawienie w to miejsce atomu wodoru (**22i**). Również podstawienia w pozycji R<sup>2</sup> wykazały, że grupa CH<sub>3</sub> okazała się najkorzystniejsza. Mniejsze, jak i większe podstawniki powodowały 10-50-krotny spadek aktywności w porównaniu do MPA [62]. Opisane związki **22a-i** zostały przedstawione na Rys. 3.



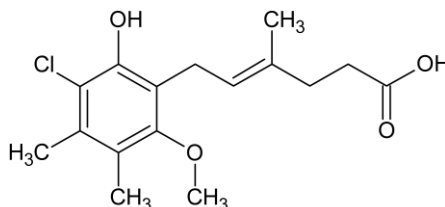
**22**

Związek	R	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
<b>6</b>	O	H	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
<b>22a</b>	S	H	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
<b>22b</b>	CH <sub>2</sub>	H	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
<b>22c</b>	NH	H	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
<b>22d</b>	NCH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
<b>22e</b>	O	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
<b>22f</b>	O	H	CH <sub>3</sub>	CH=CH <sub>2</sub>
<b>22g</b>	O	H	CH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
<b>22h</b>	O	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<b>22i</b>	O	H	H	OCH <sub>3</sub>

**Rys. 3.** Przykładowe związki bicykliczne **22a-i** [62].

## II. Monocykliczne fenole [62]

Najbardziej aktywnym analogiem MPA nie zawierającym układu ftalidowego jest chlorofenolowa pochodna **23** (Rys. 4). Inne związki powodowały znaczny spadek aktywności [62].

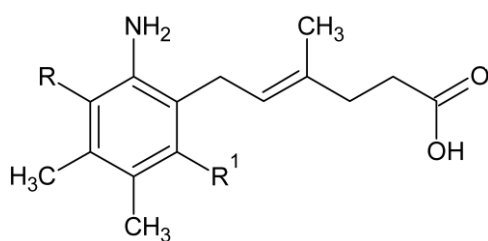
**23**

**Rys. 4.** Chlorofenolowa pochodna MPA **23** [62].

Badania zależności struktura-aktywność (SAR) wykazały, że grupa OH w pierścieniu aromatycznym jest niezbędna dla zachowania aktywności MPA. Zastąpienie jej przez atom wodoru powodowało 3-20-krotny spadek aktywności związku [62].

## III. Monocykliczne aminy [62]

Wprowadzenie zamiast grupy fenolowej aminową (**24a-d**) (Rys. 5) również nie przyniosło korzystnych rezultatów. Związki te charakteryzowały się nawet 30-krotnym spadkiem aktywności [62].

**24**

Związek	R	R <sup>1</sup>
<b>24a</b>	H	CH <sub>3</sub>
<b>24b</b>	Br	OCH <sub>3</sub>
<b>24c</b>	NO <sub>2</sub>	OCH <sub>3</sub>
<b>24d</b>	CN	OCH <sub>3</sub>

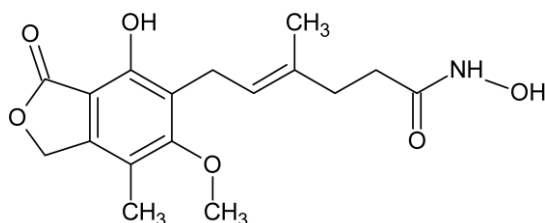
**Rys. 5.** Przykładowe związki aminowe **24a-d** [62].

## IV. Modyfikacje łańcucha bocznego

Modyfikacje łańcucha bocznego okazały się najbardziej obiecujące. Pomimo, iż większość modyfikacji odznaczało się spadkiem aktywności [63], np. uwodornianie wiązania



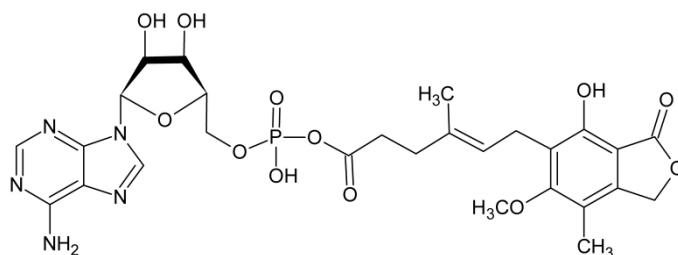
podwójnego, to zdarzają się wyjątki takie jak: MMF **7**, EC-MPS **8** (Rys. 2) oraz mykofenolan kwasu hydroksamowego **25** (MAHA) (Rys. 6). MAHA wykazuje porównywalną aktywność hamującą IMPDH do MPA. Dodatkowo hamuje on deacetylazę histonową (HDECs) w stosunku do której MPA nie posiada aktywności. Enzymy te katalizują usuwanie grupy acetylowej z jednostek lizyny w histonach i są celem molekularnym dla leków przeciwnowotworowych [64, 65].

**25**

**Rys. 6.** Struktura MAHA **25** [64].

Badania wykazały, że podstawienie w miejsce wiązania podwójnego innej grupy, bądź wiązania potrójnego powodowało znaczny spadek aktywności. Obecność wiązania podwójnego w izomerii *trans* jest niezbędna dla zachowania aktywności MPA [63].

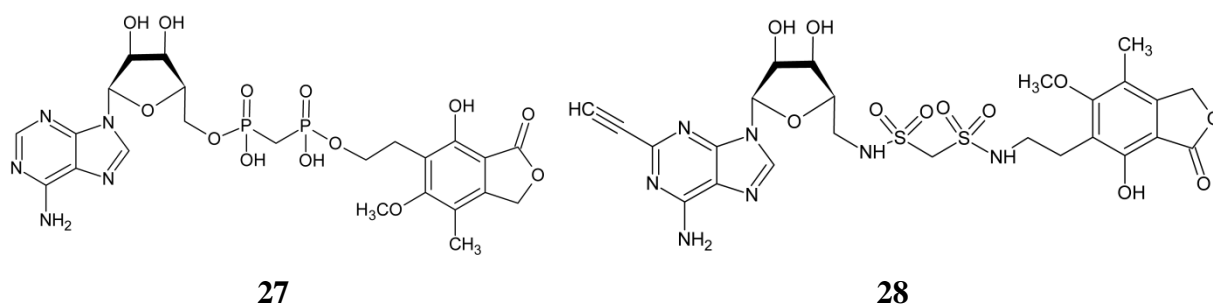
Obecnie projektowanie wielu potencjalnych leków opiera się na modyfikacji struktury znanych już terapeutyków. Lesiak i in. [66] otrzymali MAD **26** (Rys. 7), który budową przypomina cząsteczkę NAD. Okazał się on inhibitorem IMPDH, co jest spowodowane brakiem zdolności do przenoszenia wodoru.

**26**

**Rys. 7.** Budowa cząsteczki MAD **26** [66].

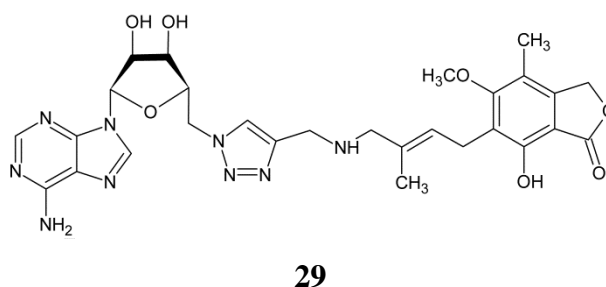
W 2002 roku Pankiewicz i in. [67] opisali nowe pochodne MAD m.in. C2-MAD **27** (Rys. 8). Związek ten był odporny na UDP-glukuronotransferazy. Dodatkowo C2-MAD oraz

jego analogi wykazały wysoką aktywność inhibicyjną. Niestety wbrew wcześniejszym założeniom związki te wykazały słabszą aktywność w porównaniu z MPA. Ich wadą jest również brak specyficzności w stosunku do IMPDH izoformy typu II [67-68]. Pankiewicz i in. w 2008 roku [69] opisali pochodne mykofenolowo-adenino(sulfonoamidowe) **28** (MABS) (Rys. 8), charakteryzował je spadek aktywności.



**Rys. 8.** Budowa cząsteczki C2-MAD **27** oraz pochodnej MABS **28** [68].

Dwa lata później ci sami autorzy otrzymali analogi MAD zawierające grupę 1,2,3-triazolową **29** (Rys. 9) zamiast reszty fosforanowej. Okazało się, że związki te są silnymi inhibitorami IMPDH. Inhibują IMPDH pochodzącą z *Mycobacterium tuberculosis* (*mt*IMPDH) [69].



**Rys. 9.** Struktura przykładowego analogu MAD z ugrupowaniem 1,2,3-triazolowym **29** [69].

## **1.2.5. Analogi MPA stosowane klinicznie**

### **1.2.5.1. Mykofenolan mofetylu (MMF)**

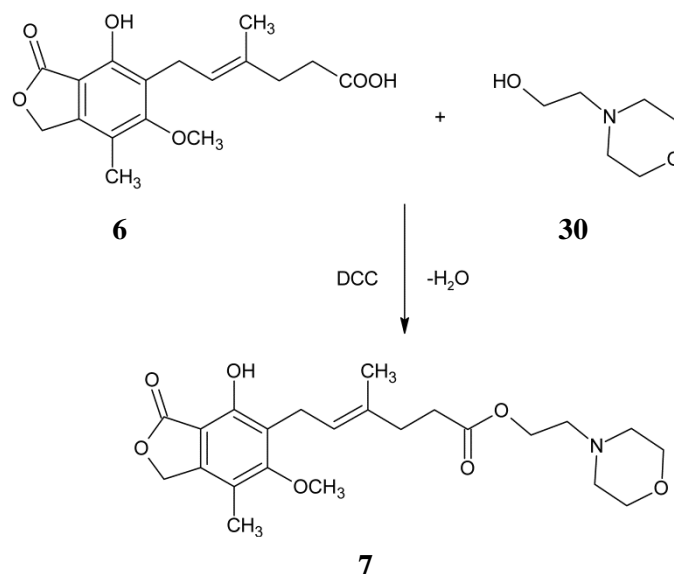
Mykofenolan mofetylu **7** (MMF) (Rys. 2), produkowany jako lek pod nazwą handlową CellCept® przez firmę Roche, jest 2-morfolinoetylowym estrem MPA. Wykazuje on działanie cytostatyczne zarówno w stosunku do limfocytów T, jak i B. MMF jest najczęściej stosowanym (zwykle w dawce 0.5-2.0 mg/dziennie, doustnie) w transplantologii organów i komórek macierzystych analogiem MPA. Charakteryzuje się on również znacznym efektem immunosupresyjnym w przypadku chorób autoimmunologicznych wykazując 93% biodostępności [70-72]. Badania potwierdziły, że wydłużał przeżycie po przeszczepach szpiku kostnego, wysp trzustkowych, wątroby, jelita, serca czy nerki. MMF podawany jest w dwóch formach, dożylniej i doustnej, przy czym w Polsce dopuszczona jest tylko forma doustna leku [73].

MMF hamował również proliferacyjną arteriopatię w modelach doświadczalnych aorty i przeszczepach serca u szczurów oraz u naczelnych po ksenogenicznym przeszczepie serca. Mykofenolan mofetylu stosowany jest samodzielnie lub w połączeniu z innymi lekami immunosupresyjnymi [74-77]. Wykazano, że hamuje on immunologiczną odpowiedź zapalną w modelach zwierzęcych oraz hamuje rozwój nowotworu [73].

W roku 2011 zidentyfikowano geny odpowiedzialne za odpowiedź na leczenie MMF [78]. W przyszłości może to pozwolić na bardziej ukierunkowaną terapię, a tym samym na lepsze rezultaty leczenia.

Niestety MMF wywołuje również skutki uboczne m.in. wymioty, bóle brzucha, biegunkę, nudności, jednak jest on lepiej tolerowany niż MPA [79, 80].

MMF otrzymuje się w reakcji estryfikacji MPA **6** z 2-morfolinoetanołem **30** w obecności odczynnika kondensującego np. DCC (Schemat 5) [81], substancji wiążącej wodę (nieorganiczne sole, sita molekularne) [82], bądź poprzez ogrzewanie w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika, np. ksylenu [83, 84]. Estryfikacja może być również katalizowana przez enzymy [85].



Schemat 5. Synteza MMF 7 [81].

### 1.2.5.2. Mykofenolan sodu (EC-MPS)

Mykofenolan sodu **8** (EC-MPS, Novartis, Myfortic) (Rys. 2) wykazuje 72% biodostępności [70-72]. Badania przeprowadzone w ostatnim czasie pokazały, że skuteczność działania obu pochodnych jest zbliżona [86, 87], jednak mykofenolan sodu jest lepiej tolerowany przez pacjentów [88-90]. Jest on dobrze rozpuszczalny w obojętnym pH, np. w jelicie i nie ulega hydrolizie w warunkach kwasowych, np. w żołądku [91].

W badaniach *de novo*, częstość przerwania leczenia z powodu działań niepożądanych wyniosła 18% (39/213) dla EC-MPS i 17% (35/210) dla MMF. Najczęstsze działania niepożądane prowadzące do przerwania terapii dla EC-MPS to odrzut przeszczepu (2%), biegunka (2%), wymioty (1%), niewydolność nerek (1%), infekcja cytomegalowirusem CMV (1%) oraz leukopenia (1%) [91].

Należy również zwrócić uwagę, że skutki uboczne występują dużo częściej u dzieci niż u dorosłych [73, 91].

### 1.3. Dehydrogenaza inozyno-5'-monofosforanu (IMPDH) – cel molekularny MPA

#### 1.3.1. Struktura i funkcja IMPDH

Kontrola wzrostu i różnicowania komórek jest podstawową cechą różnorodności funkcji biologicznych. Efektywność w przypadku działania podczas patologicznego różnicowania lub wzrostu komórek (terapia przeciwnowotworowa), bądź odpowiedzi komórkowej na zewnętrzne antygeny (immunosupresja) jest znacznie zwiększona poprzez wcześniejszą identyfikację celu molekularnego. Dzięki ukierunkowaniu terapii np. na konkretny enzym, może ona skutkować znacznie lepszymi efektami [92].

Dehydrogenaza inozyno-5'-monofosforanu (IMP-NAD oksydoreduktaza, Enzyme Classification E.C.1.2.1.14; IMPDH) katalizuje metaboliczny szlak podczas syntezy puryn [93]. Enzym ten jest odpowiedzialny za katalizę NAD-zależną utleniania IMP do XMP i wykorzystywany w biosyntezie *de novo* nukleotydów purynowych (guanina). XMP jest przekształcany w GMP z wykorzystaniem glutaminy jako donora grupy aminowej. Reakcja ta jest szczególnie istotna dla limfocytów T i B [94, 95].

IMPDH jest wewnątrzkomórkowym regulatorem puli nukleotydów guaninowych. W związku z tym odgrywa on ważną rolę podczas syntezy DNA i RNA, transdukcji sygnału, przekazywania energii, syntezy glikoprotein oraz wpływa na inne procesy związane z proliferacją komórek [92].

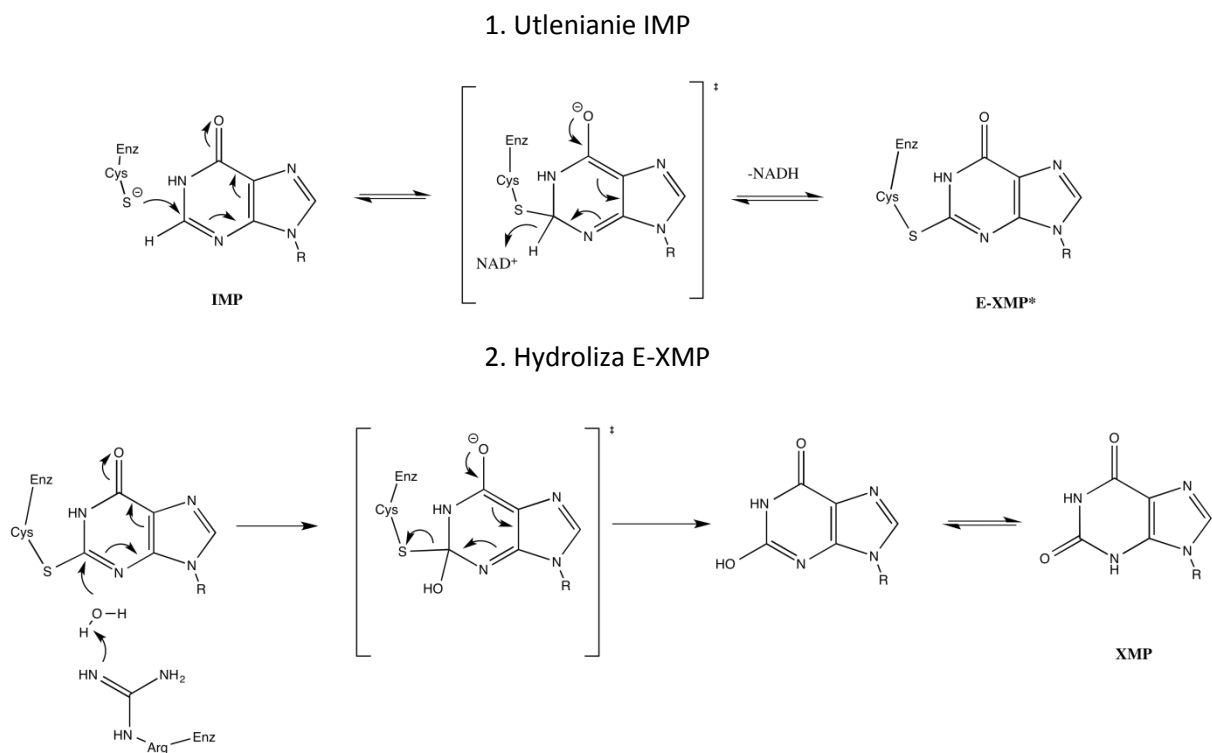
IMPDH jest tetramerycznym enzymem składającym się z monomerycznych podjednostek o masie cząsteczkowej około 55kDa. Składa się on z 400-500 reszt aminokwasowych [92, 93].

Kompleks ludzkiego enzymu pokazuje tę samą, tetrametryczną organizację struktury jak możemy zaobserwować np. u chomika. Różnicę pomiędzy dehydrogenazą ludzką a dehydrogenazą chomika stanowi zaledwie sześć aminokwasów. Każdy monomer składa się z dwóch głównych domen: domeny katalitycznej i mniejszej domeny flankującej [92].

Względne położenie domen katalitycznych i pomocniczych różni się pomiędzy enzymem ludzkim oraz pochodzącym od chomika, najprawdopodobniej z powodu różnego krystalicznego upakowania struktury [92]. Dodatkowo ekspresja ludzkiego IMPDH zachodzi pod kontrolą białka p53 [96, 97].

### 1.3.2. Mechanizm działania IMPDH

Bez względu na pochodzenie dehydrogenaza inozyno-5'-monofosforanu wykazuje ten sam mechanizm działania. Pierwszym etapem jest utlenianie IMP. Utworzenie aktywnego kompleksu IMP-enzym powoduje zainicjowanie reakcji. Następnie w wyniku utworzenia wiązania pomiędzy C-2 5'-monofosforanu inozyny oraz siarką (Cys331) z centrum aktywnego powstaje kowalencyjny produkt pośredni E-IMP (enzym-IMP), który w wyniku przeniesienia wodoru przekształca się w E-XMP\*. Kolejnym etapem jest hydroliza powstałego kompleksu E-XMP\* [32, 92-100]. Etapem decydującym o szybkości reakcji jest odłączanie XMP [92]. Zachodzące przemiany przedstawia Schemat 6.



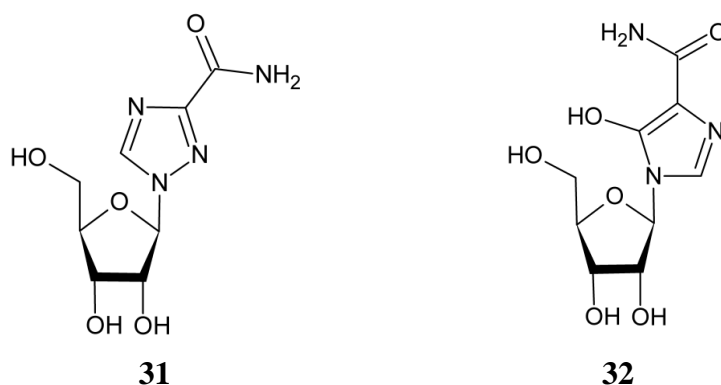
**Schemat 6.** Reakcja katalizowana IMPDH [32].

### 1.3.3. Inhibitory ludzkiej IMPDH typu II wykorzystywane klinicznie

Rola IMPDH jako celu chemoterapeutycznego wzrosła w wyniku odkrycia dokonanego w 1990 roku przez Natsumeda i in. [98] którzy udowodnili istnienie dwóch izoform: typu I i typu II. Obie izoformy mają identyczny rozmiar i dzielą 84% sekwencji. Dodatkowo obie izoformy są kodowane przez różne geny [99, 100]. IMPDH I ulega konstytutywnej ekspresji zarówno w normalnych komórkach, jak i ludzkiej neoplastycznej

linii komórkowej [101], podczas gdy w przypadku IMPDH *II* następuje wzrost ekspresji w komórkach neoplastycznych [98, 102]. Dodatkowo jest ona główną izoformą występującą w aktywowanych limfocytach [103, 104] oraz nowotworach [105, 106]. Stąd, izoforma typu *II* jest również celem molekularnych w immunosupresji. Wyższy poziom IMPDH *II* występuje również w komórkach, które zostały zainfekowane wirusem. Jest to spowodowane wzrostem syntezy RNA lub DNA, czyli w momencie większego zapotrzebowania np. na guaninę [107].

Istnieje wiele potencjalnych i selektywnych inhibitorów IMPDH. Dwa z nich, rybawiryna **31** (1- $\beta$ -ribofuranozyl-1,2,4-triazol-3-karboksamid, Virazole®) i mizorybina **32** (MZB) (Rys. 10) są fosforyzowane w komórkach do odpowiednich 5'-monofosforanów i wchodzi w reakcję z substratem (IMP) [108].



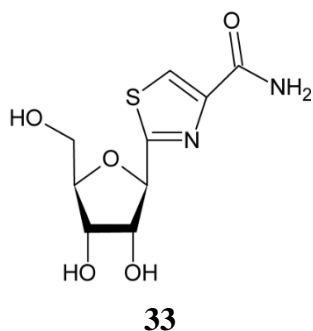
**Rys. 10.** Struktura rybawiryny **31** [109] i mizorybiny **32** [110].

Rybawiryna **31** (Rys. 10) jest związkiem o szerokim spektrum działania. Jest on przeciwwirusowym czynnikiem hamującym replikację DNA i RNA wirusów. Najbardziej wrażliwe są HSV-1, HSV-2, wirus ospy, grypy, odry oraz niektóre wirusy nowotworowe [111-113]. Jest on również inhibitorem niektórych retrowirusów dlatego wykorzystywany jest w leczeniu AIDS [114]. Kombinacja interferonu  $\alpha$  oraz rybawiryny okazała się skuteczna w leczeniu przewlekłego zapalenia wątroby typu C [115].

Mizorybina **32** (Rys. 10) jest nukleozydem imidazolu oraz lekiem immunosupresyjnym. Działanie immunosupresyjne wywoływane jest przez hamowanie syntezy DNA w fazie S cyklu komórkowego. Po fosforylacji mizoribin-5'-monofosforanu (MZB-P) hamuje GMP poprzez antagonistyczne blokowanie IMPDH oraz GMP-syntetazy w

szlaku przekształcania IMP do GMP. MZB hamuje zarówno układ humoralny jak i komórkowy poprzez selektywne hamowanie proliferacji limfocytów [116].

Kolejnym związkiem jest tiazofuryna **33** (TR) (Rys. 11) metabolicznie przekształcana w TAD oraz współdziała z NAD-stroną enzymu. Warto zauważyć, że TR jest jedynym inhibitorem IMPDH stosowanym klinicznie w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej (CML) [117].



**Rys. 11.** Struktura tiazofuryny **33** [117].

Innymi związkami są MMF **7** oraz EC-MPS **8**, stosowane klinicznie jako leki immunosupresyjne w profilaktyce odrzucania przeszczepów narządów. Są one pochodnymi MPA **6** (Rys. 2), jednego z najsilniejszych inhibitorów *h*IMPDH ( $K_i=7\text{nM}$ ) [33].

Niestety żaden z wymienionych leków nie wykazuje znaczącej selektywności wobec IMPDH typu II. Pomimo postępów w rozwoju stosowanych klinicznie inhibitorów IMPDH, otrzymywane leki nie spełniają oczekiwań. W związku z tym nadal poszukuje się nowych związków np. poprzez zmiany w strukturze znanych już inhibitorów [33, 62, 117, 118].



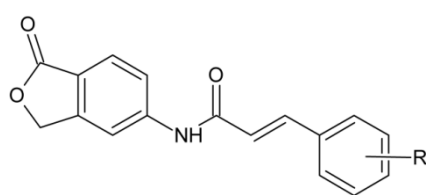
### 1.3.4. Inhibitory IMPDH oparte na strukturze MPA

Jak już wspomniałam wcześniej zarówno MPA, jak i IMPDH cieszą się dużym zainteresowaniem wśród naukowców. Nadal poszukuje się nowych analogów MPA [119], jak i inhibitorów IMPDH [117]. Poniżej przedstawię najnowsze dokonania, które łączą oba powyższe aspekty.

W ostatnich latach otrzymano wiele nowych pochodnych MPA, ale tylko niektóre z nich wykazały interesującą aktywność biologiczną [119].

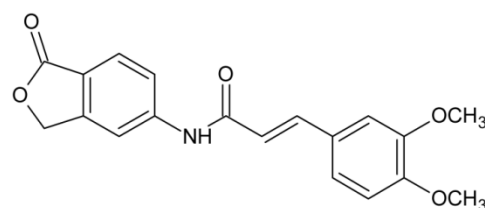
Yang i in. [118] zsyntetyzował 35 izobenzofuranowych pochodnych MPA oraz wykonał analizę zależności struktura-aktywność.

Pierwszą grupą związków były  $\alpha,\beta$ -nienasycone amidy **34** (Rys. 12). Wśród otrzymanych pochodnych najwyższą aktywność w stosunku do limfocytów T wykazały związki posiadające w swojej strukturze fluor, grupę metoksyową bądź acetoksyłową jako podstawniki w pozycji 3. W przypadku pochodnej metoksyłowej zsyntetyzowano również związek dipodstawiony w pozycjach 3 i 4 **35** (Rys. 12).



**R** = alkil, aryl, halogen, CN, metoksyl

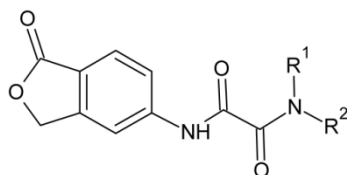
**34**



**35**

**Rys. 12.** Struktura  $\alpha,\beta$ -nienasyconych amidów **34** oraz 3,4-dimetoksyfenylowa pochodna kwasu cynamonowego **35** [118].

Kolejną grupą związków były pochodne mocznika **36** (Rys. 13) [118]. Generalnie analogi te charakteryzowały się mniejszą aktywnością niż  $\alpha,\beta$ -nienasycone amidy. Dodatkowo stwierdzono, że sprzężony pierścień benzenowy jest kluczowy dla utrzymania bądź zwiększenia aktywności analogów mocznika.



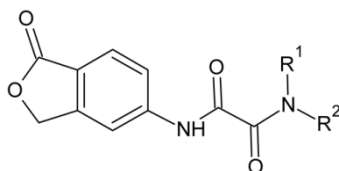
$R^1$  = grupa alkilowa, aryłowa

$R^2$  = H, grupa metylowa

**36**

**Rys. 13.** Struktura pochodnych mocznika **36** [118].

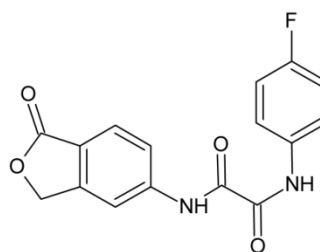
Inną zależność struktura-aktywność zaobserwowano dla pochodnych diamidowych **37** (Rys. 14) [118]. W tym przypadku najwyższą aktywność zaobserwowano w przypadku pochodnej *p*-fluorofenyłowej **38** (Rys 14).



$R^1$  = alkil, aryl

$R^2$  = H, CH<sub>3</sub>

**37**

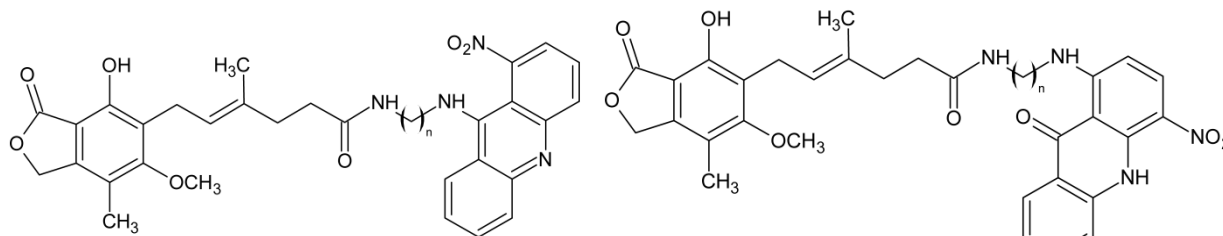


**38**

**Rys. 14.** Struktura pochodnych diamidowych **37** oraz pochodna *p*-fluorofenyłowa **38** [118].

Testy aktywności otrzymanych analogów wobec IMPDH typu *II* wykazały, że najwyższą zdolność hamowania dehydrogenazy posiadała pochodna **35** (Rys. 12), jednak była ona niższa niż dla MPA.

W 2012 roku w naszym laboratorium Małachowska-Ugarte i in. [120] opisali koniugaty nitro-akrydyny **39** / akrydonu **40** MPA (Rys. 15).



$n = 2 - 6$

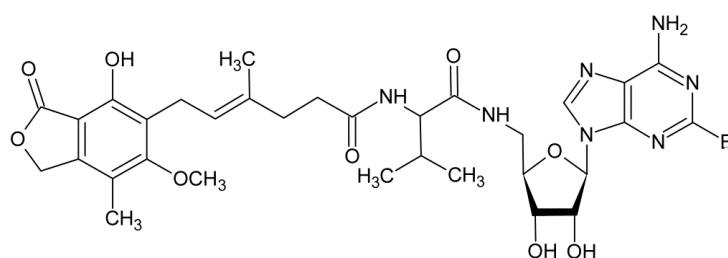
**39**

**40**

**Rys. 15.** Struktura pochodnych nitro-akrydyny **39** / akrydonu **40** MPA [120].

Koniugaty **39** i **40** wykazały aktywność jako inhibitory linii komórkowych: Jurkat, Molt-4, HL-60, i CCRF L1210 oraz PBMC. Związki te okazały się inhibitorami *h*IMPDH, a ich aktywność zależała zarówno od długości łącznika diaminowego, jak i budowy związku heterocyklicznego. Koniugaty akrydynowe charakteryzowały się wyższą aktywnością niż analogi akrydonowe oraz MPA [120].

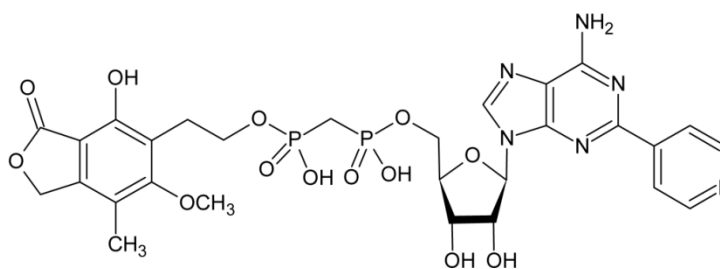
W 2014 roku Felczak i in. [121] opublikowali syntezę i aktywność aminokwasowych analogów MPA połączonych z 5'-aminoadenozyną. Wykazano, że pochodne zawierające D-walinę **41** (Rys. 16) posiadały wysoką aktywność w stosunku do IMPDH I oraz IMPDH II.



**41**

**Rys. 16.** Mykofenolan-D-walilo-*N*-adenozyny **41** [121].

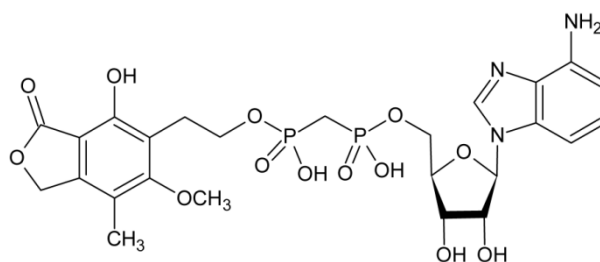
Zsyntetyzowali oni również nowe pochodne MAD podstawione w pozycji 2 [121]. Najbardziej aktywnym związkiem był 2-(4-pirydylo)MAD **42** (Rys. 17), który wykazał wysoką aktywność wobec IMPDH I i IMPDH II oraz kilku nowotworowych linii komórkowych.



**42**

**Rys. 17.** Mykofenolan-2-(4-pirydylo)-adenozyno-5'-ylo-metylenobi(fosfonianu) **42** [121].

Otrzymali oni również pochodną 4-aminobenzimidazolową **43** (Rys. 18).



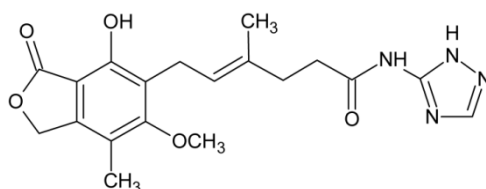
43

**Rys. 18.** Mykofenolan-1,3-dideaza-adenozyno-5'-ylo-metylobi(fosfonianu) **43** [121].

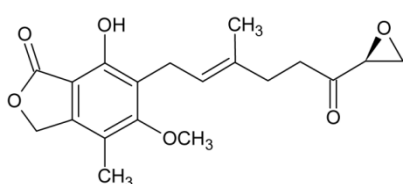
W rezultacie podstawienie ugrupowania adeniny grupą 4-aminobenzimidazolu umożliwiło silniejsze oddziaływanie i lepszą selektywność wobec IMPDH II.

W 2013 roku Sunohara i in. [122] zaprezentowali 10 nowych pochodnych MPA jako potencjalne podwójne inhibitory dla HDAC oraz IMPDH II. Najlepszym inhibitorem komórek K562 okazał się amid kwasu *N*-(2,3,5-triazoyl)mykofenolowego **44** (Rys. 19), którego aktywność była porównywalna z MPA.

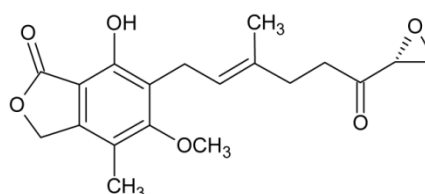
Otrzymano również enancjomeryczne mykofenolowe epoksyketony (*R*)-**45** i (*S*)-**46** (Rys. 19). Oba związki wykazywały podobny indeks selektywności IMPDH I/IMPDH II jak MPA [122].



44



45

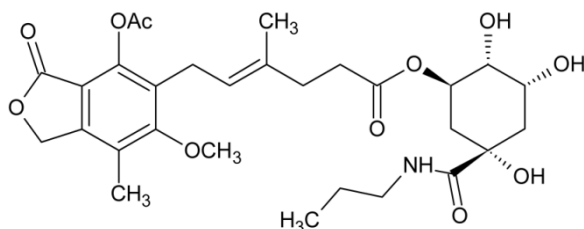


46

**Rys. 19.** Pochodne MPA **44-46** [122].

Wu i in. [123] w celu znalezienia leku immunosupresyjnego o mniejszej toksyczności w przypadku przeszczepu wysepek, otrzymali związek JP-3-110 **47** (Rys. 20). Otrzymany

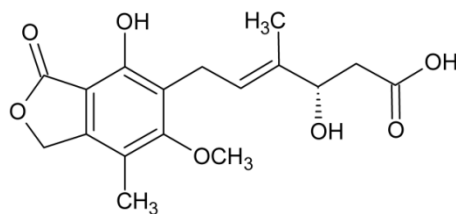
ester wykazał podobną aktywność immunosupresyjną *in vitro* jak MPA **6** (Rys. 2), mógł jednak zapewnić bezpieczniejszy przeszczep ludzkich wysepek trzustkowych ze względu na zmniejszenie skutków proapoptotycznych [123].



**47**

**Rys. 20.** Struktura związku JP-2-110 (**47**) [123].

Pomimo, iż większość nowych związków została otrzymana na drodze syntezy chemicznej to w roku 2012 wyizolowano pięć nowych analogów MPA z grzybów *Penicillium* sp. SOF07 [124].



**48**

**Rys. 21.** Struktura związku **48** [124].

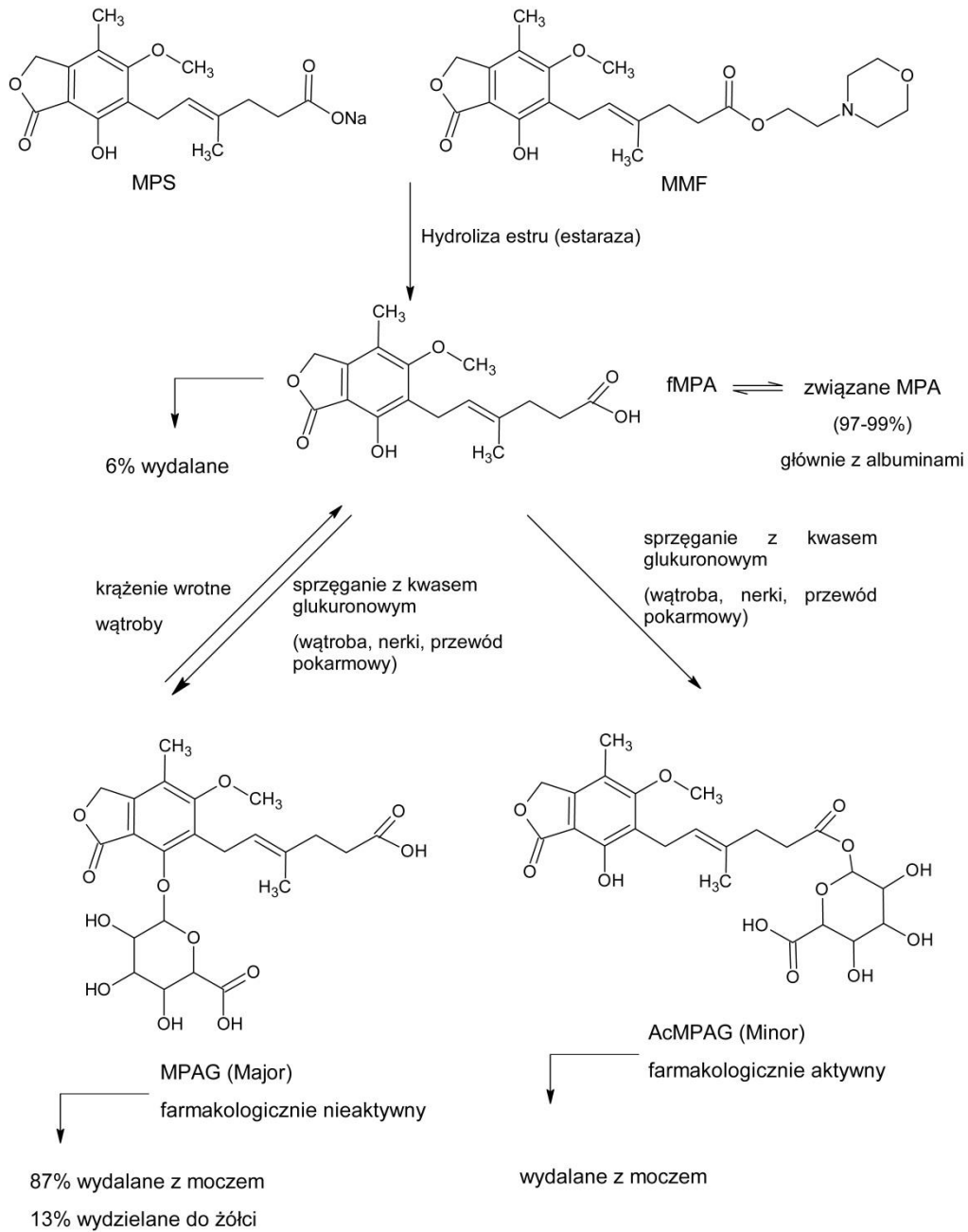
Najbardziej obiecującym analogiem jest związek **48**. Wykazuje on znacznie niższą cytotoksyczność ( $IC_{50}=73,24\mu M$ ), w porównaniu do MPA ( $IC_{50}=73,24\mu M$ ), w stosunku do IMPDH. Również stężenie tego związku ( $IC_{50}>30\mu M$ ) w porównaniu do MPA ( $IC_{50}=0,32\mu M$ ) w przypadku inhibicji proliferacji mysich komórek śledziona wydaje się być interesujące [124].

### **1.3.5. Metabolizm MPA, MMF oraz MPS**

Po podaniu doustnym i dożylnym, MMF **7** (Rys. 2) ulega szybkiemu i całkowitemu metabolizmowi do aktywnego metabolitu, jakim jest MPA [73]. MPA jest silnie wiązany z białkami (> 98% wiąże się z albuminami) i powstaje nieaktywny metabolit 7-*O*-glukuronianu (MPAG), który usuwany jest przez nerki, bądź wydalany z żółcią. Drugim metabolitem jest acyloglukuronid (AcMPAG), którego aktywność jest podobna do niezwiązanego MPA. MPAG [34, 91].

EC-MPS **8** (Rys. 2) wykazuje liniową i proporcjonalną farmakokinetykę w zależności od dawki (360 do 2160mg) i ulega biotransformacji podobnie jak MMF. Średni okres półtrwania MPA i MPAG wynosi odpowiednio od 8 do 16 godzin dla MPA oraz od 13 do 17 godzin dla MPAG (Schemat 7) [91].

## Część literaturowa



**Schemat 7.** Biotransformacja MPA [125].

Warto zwrócić uwagę, że proces glukuronidacji MPA *in vivo* jest przyczyną ograniczeń stosowania MPA, bądź jego pochodnych. Dlatego nadal poszukuje się skuteczniejszych analogów [126-136].

## 2. CEL I ZAKRES PRACY

Celem mojej rozprawy doktorskiej jest synteza oraz badania aktywności biologicznej aminokwasowych analogów kwasu mykofenolowego w postaci estrów metylowych oraz z wolną grupą karboksylową o potencjalnej aktywności immunosupresyjnej.

Otrzymane związki poddałam badaniom *in vitro* w Zakładzie Immunologii Klinicznej i Transplantologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

### Synteza chemiczna

#### *I. Synteza aminokwasowych analogów MPA w postaci estrów*

W celu otrzymania pochodnych MPA przetestowałam różne metody tworzenia wiązania amidowego, stosując jako wzorzec HClxD-Ala-OCH<sub>3</sub>. Zaprojektowane analogi MPA otrzymałam wykorzystując EDCI jako czynnik kondensujący w obecności DMAP w bezwodnym DMF.

#### *II. Synteza aminokwasowych analogów MPA z wolną grupą karboksylową*

Deprotekcję grupy estrowej przeprowadziłam zgodnie z procedurą opisaną przez Nelsona i in. [62] stosując LiOH·H<sub>2</sub>O.

### Badania biologiczne

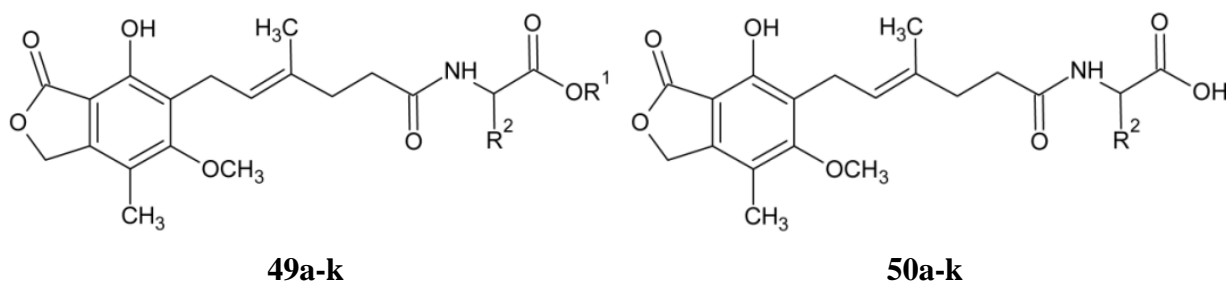
Wszystkie otrzymane analogi MPA zostały poddane badaniom biologicznym, które obejmowały:

- testy żywności MTT badające toksyczność związków **49a-k**, **50a-k**, **6** wobec linii komórkowej Jurkat i PBMC w celu wyznaczenia IC50;
- testy aktywności antyproliferacyjnej związków **49a-k**, **50a-k**, **6** metodą inkorporacji TdR-3H wobec linii komórkowej Jurkat i PBMC w celu wyznaczenia EC50;
- porównanie aktywności analogów MPA **49a-k**, **50a-k** w stosunku do MPA **6**;
- testy selektywności efektu działania związków **49a-k**, **50a-k**, **6** wobec IMPDH poprzez badanie aktywności antyproliferacyjnej metodą inkorporacji TdR-3H wobec linii komórkowej Jurkat z dodatkiem GMP;
- wybór związków do badań *in vivo*;
- wykonanie testu na obecność endotoksyny w wyselekcjonowanych związkach;



### Cel i zakres pracy

- wpływ wyselekcjonowanych związków na ekspansję i dojrzewanie komórek dendrytycznych – fenotypowanie z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych przeciw: Lineage cocktail 1 (lin 1) - CD3, CD14, CD16, CD19, CD20; HLA-DR; CD11c; CD123; CD80; CD83; CD86;
- wpływ komórek dendrytycznych traktowanych badanymi związkami na aktywność proliferacyjną alogenicznych limfocytów T metodą inkorporacji TdR-3H.



$R^1 = CH_3$

$R^2 = H, CH_3, CH_2CH_2COOCH_3, CH(CH_3)_2, CH_2CH(CH_3)_2, CH_2Ph, CH(OH)CH_3$

**Rys. 22.** Struktury badanych związków: **49a-k**, **50a-k**.

Prace syntetyczne wykonałam w Katedrze Chemii Organicznej Politechniki Gdańskiej pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Krystyny Dzierzbickiej.

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

### **3. OMÓWIENIE WYNIKÓW PRACY**

#### **3.1. Prace syntetyczne**

Część syntetyczna pracy obejmowała otrzymanie 11-stu aminokwasowych analogów kwasu mykofenolowego w postaci estrów **49a-k** oraz 11-stu z wolną grupą karboksylową **50a-k**.

##### **3.1.1. Synteza aminokwasowych analogów MPA w postaci estrów**

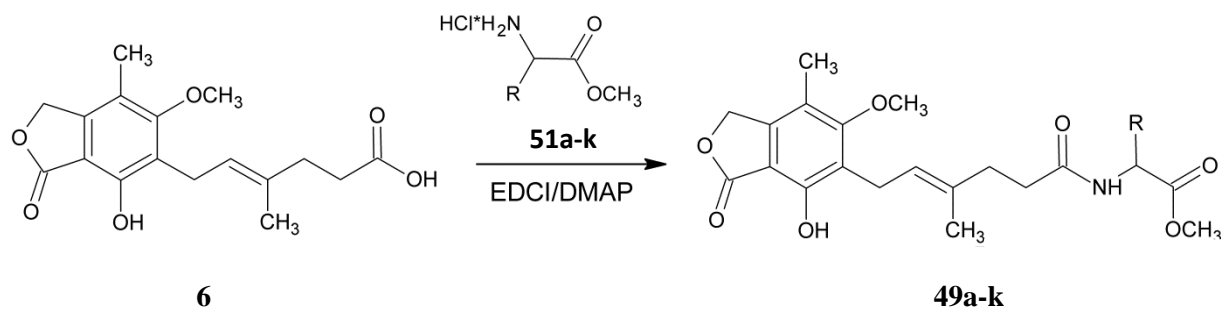
W celu syntezy pochodnych MPA wykorzystałam następujące estry aminokwasów: HClxGly-OCH<sub>3</sub>, HClxD-Ala-OCH<sub>3</sub>, HClxAla-OCH<sub>3</sub>, HClxD-Val-OCH<sub>3</sub>, HClxVal-OCH<sub>3</sub>, HClxD-Glu-(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, HClx-Glu-(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, HClxD-Leu-OCH<sub>3</sub>, HClxLeu-OCH<sub>3</sub>, HClxD-Phe-OCH<sub>3</sub>, HClxPhe-OCH<sub>3</sub>.

Do tworzenia wiązania peptydowego przetestowałam różne odczynniki kondensujące: chloromrówczan izobutyli/NMM (metoda mieszanych bezwodników), DPPA/TEA, EEDQ/Py, HBTU/NMM, TBTU/HOBt, BOP/HOBt, DCC/NMM, CCMT/DMAP oraz EDCI/DMAP. Najkorzystniejsza okazała się procedura wykorzystująca EDCI w obecności DMAP [156].

W reakcji stosowałam MPA **6**, odpowiedni ester aminokwasu i DMAP w bezwodnym DMF. Mieszaninę chłodziłam do 0°C, po czym dodawałam EDCI. Całość mieszałam przez 2h w 0°C, a następnie w temp. pok. przez 24-48h (Schemat 8). Postęp reakcji kontrolowałam za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) w układzie A, bądź B (w zależności od otrzymywanego produktu). Po zakończeniu reakcji i oddestylowaniu DMF pozostałość rozcieńczałam octanem etylu, przenosiłam do rozdzielacza i przemywałam wodą oraz 7% roztworem NaHCO<sub>3</sub>. Warstwę organiczną oddzielałam, suszyłam MgSO<sub>4</sub>, odsączałam od środka suszącego i oddestylowywałam rozpuszczalnik na wyparce obrotowej. Otrzymałam produkty **49a-k** z wydajnością 54-86% (Tabela 1).

Surowy produkt oczyszczałam za pomocą TLC stosując odpowiednie układy rozpuszczalników A, B lub C w zależności od produktu. Stosowałam również ekstrakcję do fazy stałej (SPE).

Omówienie wyników pracy



**Schemat 8.** Schemat otrzymywania aminokwasowych analogów MPA **49a-k**.

**Tabela 1.** Otrzymane pochodne aminokwasowe MPA w postaci estrów metylowych **49a-k**.

Nr związku	51	R	Wyd. 49 [%]
<b>49a</b>	HCl*D-Ala	CH <sub>3</sub>	77
<b>49b</b>	HCl*Ala	CH <sub>3</sub>	75
<b>49c</b>	HCl*Gly	H	86
<b>49d</b>	HCl*Glu	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOR'	68
<b>49e</b>	HCl*D-Glu	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOR'	63
<b>49f</b>	HCl*Val	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	54
<b>49g</b>	HCl*D-Val	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	55
<b>49h</b>	HCl*Leu	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	71
<b>49i</b>	HCl*D-Leu	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	81
<b>49j</b>	HCl*Phe	CH <sub>2</sub> Ph	64
<b>49k</b>	HCl*D-Phe	CH <sub>2</sub> Ph	69

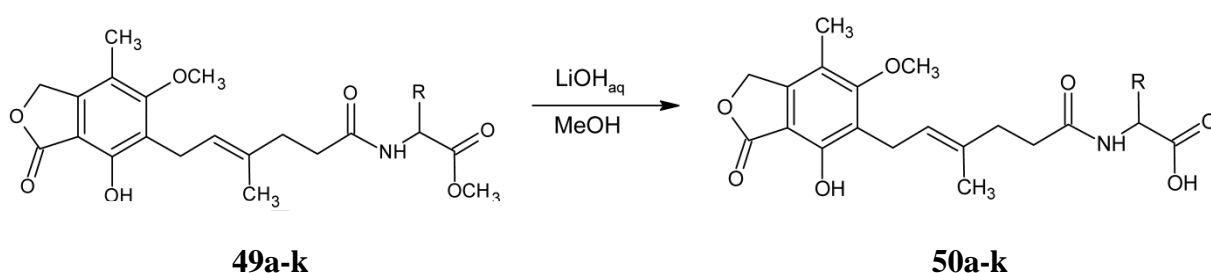
Wszystkie zsyntetyzowane związki charakteryzowałam za pomocą widm <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, MS, HPLC-MS, a także określiłam temperatury topnienia oraz skręcalność właściwą.

### 3.1.2. Synteza aminokwasowych analogów MPA z wolną grupą karboksylową

W związku z obecnością w cząsteczce aminokwasowych analogów MPA estrów metylowych ich deprotekcję przeprowadziłam za pomocą rozcieńzonego roztworu LiOH zgodnie z procedurą opisaną przez Nelsona i in. [62].

W reakcji stosowałam pochodną aminokwasową MPA w postaci estru oraz LiOH·H<sub>2</sub>O w mieszaninie H<sub>2</sub>O/MeOH (Schemat 9). Całość mieszałam przez 48h w temp. pok. Postęp reakcji kontrolowałam za pomocą TLC. Po zakończeniu reakcji mieszaninę rozcieńczałam wodą, przenosiłam do rozdzielacza i przemywałam eterem. Warstwę organiczną oddzielałam, zaś wodną zakwaszałam 2N HCl. Następnie zakwaszoną warstwę ponownie przenosiłam do rozdzielacza i ekstrahowałam octanem etylu. Warstwę octanową oddzielałam i suszyłam MgSO<sub>4</sub>. Następnie odsączałam od środka suszącego i oddestylowywałam rozpuszczalnik na wyparce obrotowej. Otrzymałam produkty **50a-k** z wydajnością 45-70% (Tabela 2).

Surowy produkt oczyszczałam na płytkach TLC stosując układ rozpuszczalników (D). W przypadku trudności w otrzymaniu czystego związku stosowałam również ekstrakcję do fazy stałej (SPE).



**Schemat 9.** Schemat hydrolizy.

**Tabela 2.** Otrzymane aminokwasowe analogi MPA z wolną grupą karboksylową.

Nr związku	R	Wyd. 50 [%]
<b>50a</b>	D-CH <sub>3</sub>	62
<b>50b</b>	L-CH <sub>3</sub>	60
<b>50c</b>	H	68
<b>50d</b>	L-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	70
<b>50e</b>	D-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	65
<b>50f</b>	L-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	64

## *Omówienie wyników pracy*

<b>50g</b>	D-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	62
<b>50h</b>	L-CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	69
<b>50i</b>	D-CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	68
<b>50j</b>	L-CH <sub>2</sub> Ph	59
<b>50k</b>	D-CH <sub>2</sub> Ph	57

---

Wszystkie zsyntetyzowane związki charakteryzowałam za pomocą widm <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, MS, HPLC-MS. Zbadałam również ich temperatury topnienia oraz skręcalność właściwą.

### 3.2. Omówienie wyników badań biologicznych

Związki będące potencjalnymi lekami, zanim zostaną skierowane do badań *in vivo*, muszą zostać poddane wstępnym testom w celu określenia ich aktywności.

Testy żywotności umożliwiają określenie stanu błony komórkowej lub mierzą stan metaboliczny komórki. Można je podzielić na kilka grup [137-147]:

- I. Testy wykorzystujące błonę komórkową jako barierę. Dzięki ujemnemu naładowaniu błony komórkowej żywych komórek związki takie nie wnikają do komórki. W trakcie uszkodzenia błony następuje zanik potencjału pomiędzy wewnętrzną i zewnętrzną błoną. Dzięki temu wybarwieniu ulegają jedynie martwe komórki. Najczęściej stosowanymi barwnikami są: błękit trypanu (BT), zieleń lizaminowa, eozyna Y, erytrozyna B.
- II. Testy, w których związki mogą przechodzić przez błonę komórkową dzięki czemu wybarwiane są żywe komórki. Często wykorzystywanym barwnikiem jest dwuocian fluoresceiny. W wyniku nagromadzenia fluoresceiny, komórka widoczna jest w mikroskopie fluorescencyjnym w wyniku świecenia na kolor zielony. Komórki uszkodzone nie są w stanie nagromadzić odpowiedniego stężenia fluoresceiny w komórce, w związku z czym pod mikroskopem są niewidoczne.
- III. Testy podwójnego barwienia polegają na wybarwieniu zarówno komórek żywych i martwych. Często połączonym jest dwuocian fluoresceiny barwiący komórki żywe oraz bromek etydyny wybarwiający martwe komórki na kolor pomarańczowo-czerwony. Takie barwniki jak bromek etydyny, jodek propidyny czy oranż akrydyny należą do grupy fluorochromów. Oznacza to, że w specyficzny sposób wiążą się z kwasami nukleinowymi.
- IV. Testy wykorzystujące barwienie konkretnych organelli np. wakuoli. Często barwnikiem jest czerwień obojętna, akumulowana w kwaśnych organellach np. lizosomach. W przypadku śmierci komórki barwnik przechodzi do cytoplazmy.
- V. Testy określające aktywność metaboliczną komórek. Jednym z najpopularniejszych jest test MTT.

W teście tym mierzona jest aktywność przemian energetycznych w mitochondriach. Test polega na redukcji żółtawego barwnika MTT do ciemnoniebieskiego, nierozpuszczalnego formazanu. Określona spektrofotometrycznie ilość barwnego formazanu jest proporcjonalna do aktywności oksydacyjnej mitochondriów. Nowszą wersją testu MTT jest test XTT.

## *Omówienie wyników pracy*

Kolejnymi testami badającymi aktywność enzymów są: LDH oraz NAG.

W celu zbadania aktywności proliferacyjnej związków stosuje się znakowane prekursorzy takie jak: metyl-[<sup>3</sup>H]-tymidyna, <sup>14</sup>C-urydyna, <sup>14</sup>C-adenina oraz <sup>32</sup>P fosfor. Znaczniki te wbudowywane są do DNA w trakcie fazy S.

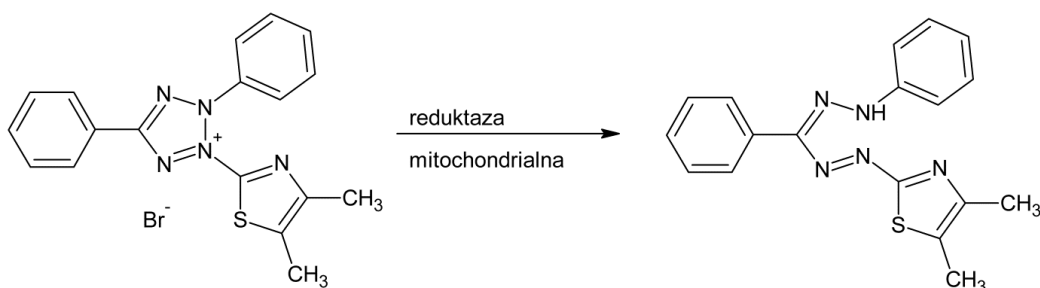
W swojej pracy wykorzystałam test MTT w celu określenia żywotności komórek oraz test inkorporacji metyl-[<sup>3</sup>H]-tymidyny do wyznaczenia stopnia zahamowania proliferacji pod wpływem otrzymanych związków **49a-k**, **50a-k** oraz **6**. Aktywność związków zbadalam na limfoidalnej linii komórkowej Jurkat oraz mononuklearnych komórkach krwi obwodowej (PBMC). Wszystkie testy wykonałam w trzykrotnych powtórzeniach. Związki rozpuszczałam w DMSO w celu przygotowania rozcieńczenia 10mg/mL. Następnie wykonywałam kolejne rozcieńczenia metodą seryjnych rozcieńczeń. Wykonałam również odpowiednie rozcieńczenia chronionych aminokwasów oraz rozpuszczalnika DMSO w celu zbadania ich wpływu na komórki. Badania te umożliwiły wstępną selekcję pochodnych MPA do dalszych badań.

Wyselekcjonowane związki poddałam testom z zastosowaniem komórek dendrytycznych (DC).

### 3.2.1. Analiza przeżywalności komórek metodą MTT

Test MTT jest obecnie najczęściej stosowany do oceny cytotoksyczności i zalecany jako referencyjny przez organizacje normotwórcze [137]. Umożliwia on wyselekcjonowanie związku o najniższym stopniu toksyczności w stosunku do badanych komórek. W teście tym wyznaczana jest wartość  $IC_{50}$  (stężenie związku, przy którym proliferacja komórek zostaje zahamowana w 50% w stosunku do komórek kontrolnych), która służy ocenie potencjalnej dawki jaką można byłoby zastosować, jeśli związek zostałby użyty w celach terapeutycznych. Zgodnie z teorią, im wyższa wartość  $IC_{50}$ , tym lepiej związek jest tolerowany przez organizm.

Metoda ta polega na redukcji bromku tetrazoliowego (MTT) przez dehydrogenazę bursztynianową, występującą jedynie w żywych komórkach, do farmazanu, który wytrąca się w podłożu jako szarofioletowe kryształki. Kryształki te rozpuszczane są za pomocą izopropanolu. Intensywność zabarwienia mierzona spektrofotometrycznie jest miarą żywotności komórek.



**Rys. 23.** Schemat redukcji bromu tetrazoliowego (MTT) przez dehydrogenazę bursztynianową

#### 3.2.1.1. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej metodą MTT aminokwasowych analogów MPA wobec linii komórkowej Jurkat oraz aktywowanych limfocytów

Test MTT stosowany jest do wyznaczenia wartości  $IC_{50}$  (stężenie związku, przy którym proliferacja komórek zostaje zahamowana w 50% w stosunku do komórek kontrolnych), która służy ocenie potencjalnej dawki jaką można byłoby zastosować, jeśli związek zostałby użyty w celach terapeutycznych.

W celu wstępnej oceny cytotoksyczności związków wykonałam test MTT na komórkach linii Jurkat, która jest modelową linią ludzkich limfocytów oraz PBMC, które wykorzystywane są jako model immunosupresyjny *in vitro*. Komórki inkubowałam



w cieplarni wraz z badanymi analogami MPA w pięciu różnych stężeniach przez 48h. Po tym czasie dodawałam MTT i inkubowałam kolejne 3h. Wytrącony formazan rozpuszczałam 0,4N HCl w izopropanolu i wytrząsałam 15 min. Następnie wykonywałam pomiar absorbancji ( $\lambda=570\text{nm}$ ).

### **I. Pochodne w postaci estrów metylowych 49a-k**

Wyniki zaprezentowane w Tabeli 3 wskazują, że pochodne aminokwasowe kwasu mykofenolowego w postaci estrów metylowych wykazują mniejszą bądź porównywalną cytotoksyczność w porównaniu z MPA **6**. Jednakże, aktywność estrów zależy od podstawnika oraz konfiguracji w części aminokwasowej. Zależność tą można dokładnie zaobserwować w przypadku alaniny **49a,b**, waliny **49f,g**, oraz leucyny **49h,i**, gdzie D-enancjomer jest mniej toksyczny w stosunku do komórek linii Jurkat niż L-enancjomer. Z odwrotną sytuacją mamy do czynienia obserwując D-feniloalaninę, dla której D-enancjomer **49k** jest bardziej toksyczny niż L-enancjomer **49j**.

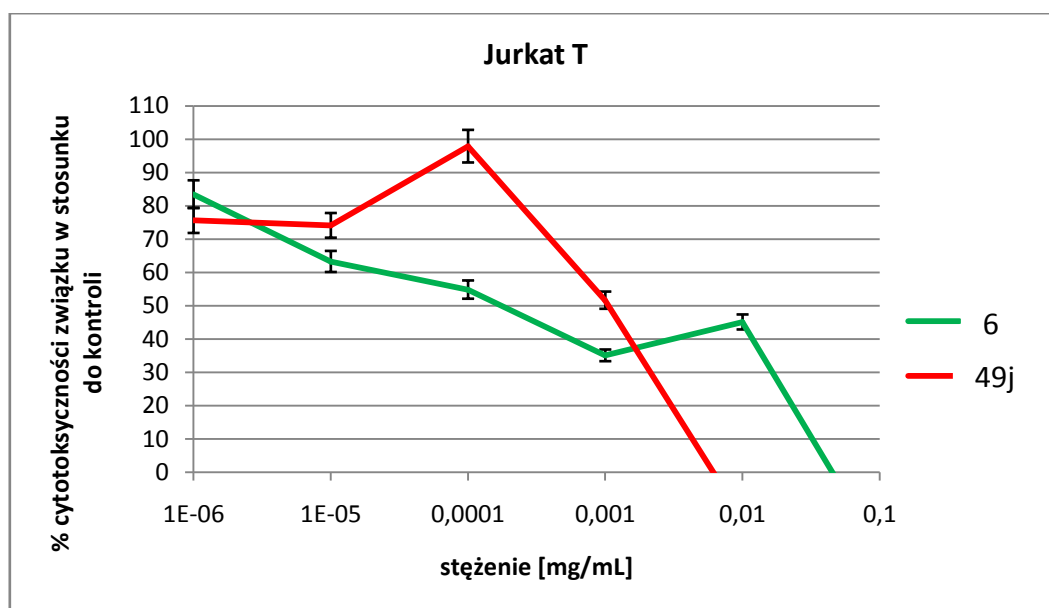
Aktywność pochodnych zawierających kwas D- i L-glutaminowy **49d,e** była porównywalna. Najlepsze wyniki zostały otrzymane dla estru metylowego *N*-mykofenoioglicyny **49c** oraz estru metylowego *N*-mykofenolilo-D-alaniny **49a**. Związek **49j** wykazywał nieznacznie wyższą cytotoksyczność ( $IC_{50}=23,92\mu\text{M}$ ,  $p=0,044610$ ) w porównaniu z MPA **6**, ale jednocześnie ponad 250 razy mniejszą toksyczność w stosunku do aktywowanych komórek PBMC ( $IC_{50}=12,06\mu\text{M}$ ,  $p<0,05$ ). Najbardziej toksyczny okazał się związek **49h**, którego toksyczność była 4-krotnie wyższa w przypadku komórek Jurkat oraz ponad 200-krotnie wyższa dla komórek PBMC.

Omówienie wyników pracy

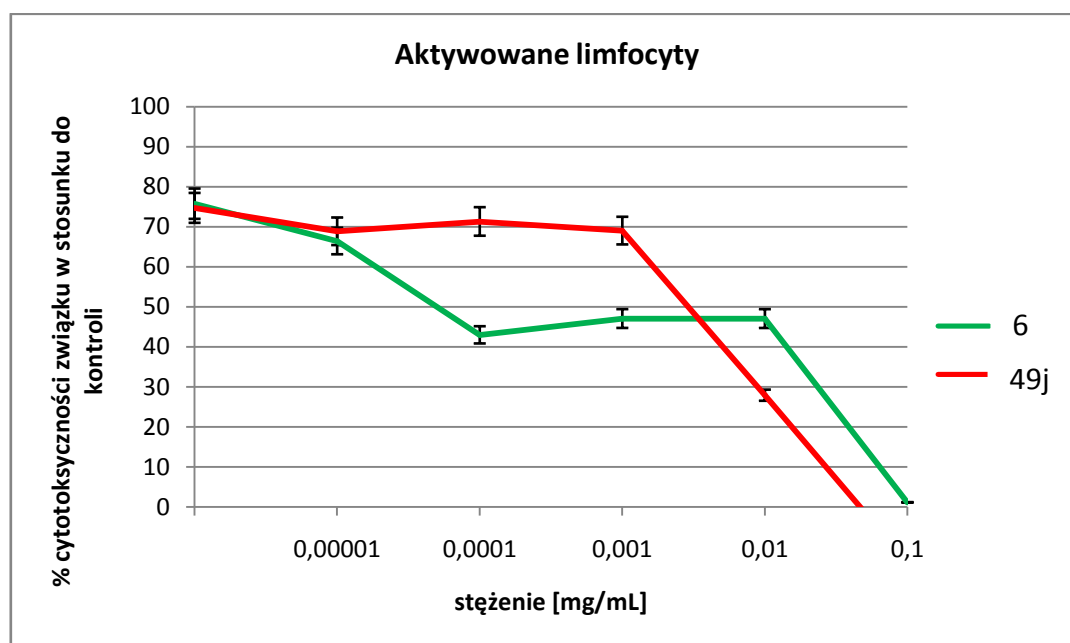
**Tabela 3.** Wartości IC<sub>50</sub> [μM] aktywności cytotoksycznej związków **49a-k, 6** obliczone na podstawie testu kolorymetrycznego MTT dla linii komórkowej Jurkat T oraz PBMC (mediana±SD)

Nr związku	Jurkat T			PBMC		
	IC <sub>50</sub>	p	F	IC <sub>50</sub>	p	F
<b>49a</b>	<b>65,70 ± 0,011</b>	0,069	103,64	<b>3,5 ± 0,0035</b>	0,055	165,02
<b>49b</b>	23,47 ± 0,0059	0,051	194,48	<0,00025	0,394	2,71
<b>49c</b>	<b>65,28 ± NAN</b>	0,067	109,26	<b>0,092±0,0008</b>	<0,05	500,29
<b>49d</b>	20,33±0,0142	0,063	124,59	0,05±2,12*10 <sup>-5</sup>	0,184	14,27
<b>49e</b>	25,99±0,0036	<0,05	476,29	<b>0,15±0,0002</b>	0,060	136,14
<b>49f</b>	2,31 ± 0,0005	<0,05	1243,35	<b>0,16 ± 0,00019</b>	<0,05	761,10
<b>49g</b>	27,03 ± 0,018	<0,05	309,65	0,027 ± 0,0011	<0,05	689,42
<b>49h</b>	6,5±0,0009	<0,05	329,40	<0,0002	0,0863	67,62
<b>49i</b>	19,26±0,006	<0,05	365,16	<b>0,67±0,0004</b>	0,106	44,02
<b>49j</b>	23,92±0,0096	<0,05	250,75	<b>12,06±0,0054</b>	<0,05	2452,07
<b>49k</b>	6,45±0,0037	<0,05	3175,26	<b>7,07±0,009</b>	<0,05	1788,72
<b>6</b>	28,21±0,02536	-	-	0,044±2,1*10 <sup>-5</sup>	-	-

\*IC<sub>50</sub> związków wyższe od IC<sub>50</sub> MPA, p – istotność statystyczna różnicy, F – test Fishera dla porównania związek:MPA



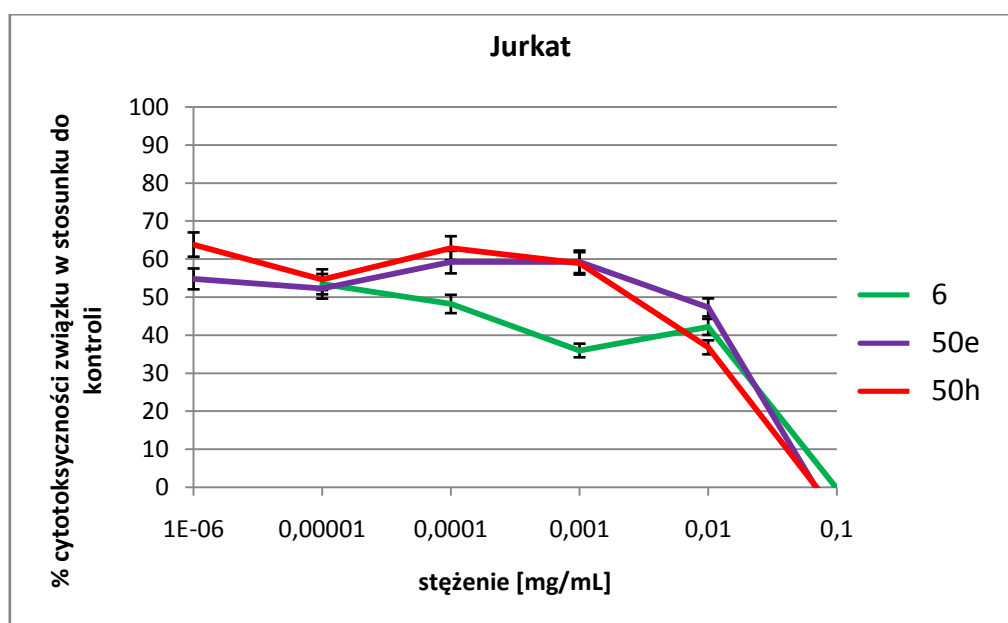
**Wykres 1.** Krzywa zależności cytotoksyczności związku **49j** oraz **6** (MPA) od stężenia wobec linii Jurkat w teście MTT (wykres związku wyselekcjonowanego do dalszych badań biologicznych)



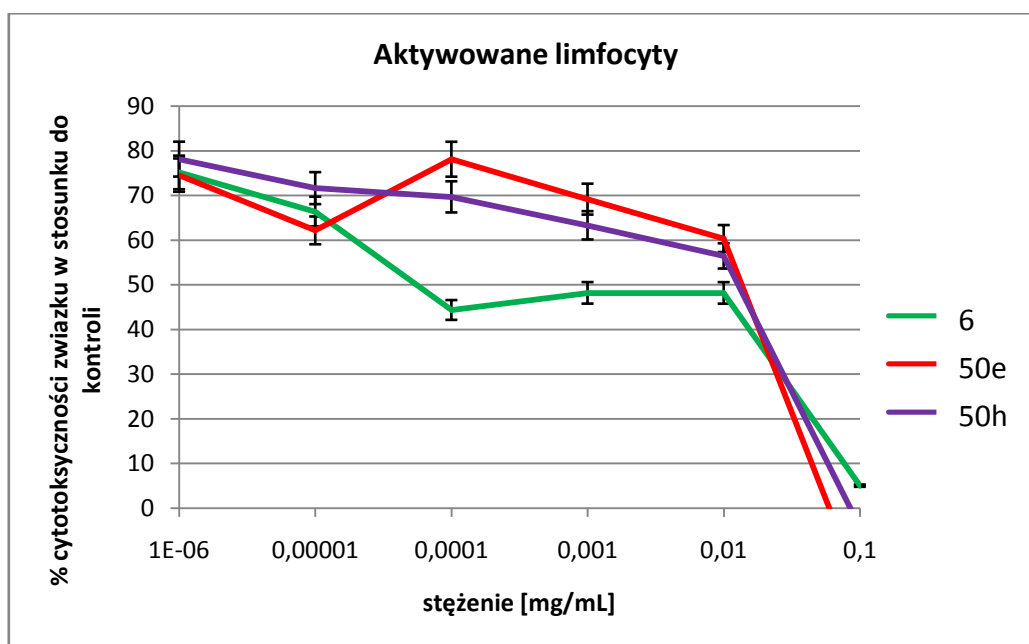
**Wykres 2.** Krzywa zależności cytotoksyczności związku **49j** oraz **6** (MPA) od stężenia wobec aktywowanych limfocytów w teście MTT (wykres związku wyselekcjonowanego do dalszych badań biologicznych)

## II. Aminokwasowe analogi MPA z wolną grupą karboksylową 50a-k

Jak możemy zauważyć w Tabeli 4 deprotekcja grupy metylowej zmieniła aktywność pochodnych aminokwasowych w znacznym stopniu. Wpływ konfiguracji centrum chiralnego w części aminokwasowej pozostał podobny jak dla estrów metylowych, jednak związki z wolną grupą karboksylową wykazują znacznie wyższą cytotoksyczność w porównaniu z ich związkami wyjściowymi. Wyjątek stanowi związek **50e**, którego toksyczność została zmniejszona prawie 2500-krotnie w stosunku do komórek PBMC ( $IC_{50} > 111,5 \mu M$ ,  $p < 0,05$ ). Również związki **50d**, **50g** oraz **50i** wydają się obiecujące w porównaniu z MPA w teście z komórkami Jurkat oraz PBMC.



**Wykres 3.** Krzywa zależności cytotoksyczności związku **50e**, **50h** oraz **6** (MPA) od stężenia wobec linii Jurkat w teście MTT (wykres związków wyselekcjonowanych do dalszych badań biologicznych)



**Wykres 4.** Krzywa zależności cytotoksyczności związku **50e**, **50h** oraz **6** (MPA) od stężenia wobec aktywowanych limfocytów w teście MTT (wykres związków wyselekcjonowanych do dalszych badań biologicznych)

Omówienie wyników pracy

**Tabela 4.** Wartości IC<sub>50</sub> obliczone na podstawie testu MTT dla aminokwasowych pochodnych MPA z wolną grupą karboksylową **50a-k, 6** wyrażone w [μM] ±SD

Nr związku	Jurkat T			PBMC		
	IC <sub>50</sub>	p	F	IC <sub>50</sub>	p	F
<b>50a</b>	9,73 ± NAN	0,113	38,43	0,0033 ± 3,6*10 <sup>-5</sup>	0,074	90,97
<b>50b</b>	1,85 ± NAN	<0,05	408,15	< 0,0003	<0,05	410,23
<b>50c</b>	5,03 ± NAN	<0,05	202,62	<b>16,4 ±NAN</b>	<0,05	703,29
<b>50d</b>	<b>32,56±0,0194</b>	0,0548	173,48	<b>4,24±NAN</b>	<0,05	801,51
<b>50e</b>	21,18±NAN	<0,05	336,61	<b>&gt;111,5</b>	0,078	80,55
<b>78f</b>	0,19±NAN	<0,05	431,28	<b>1,39±0,0026</b>	<0,05	1353,12
<b>50g</b>	<b>38±0,0406</b>	<0,05	529,82	<b>2,92±0,0281</b>	<0,05	1711,39
<b>50h</b>	8,78±0,016	0,139	25,53	<b>27,95±0,0098</b>	0,094	56,42
<b>50i</b>	<b>41,8±0,0146</b>	<0,05	2010,23	<b>27,26±0,0082</b>	0,074	89,73
<b>50j</b>	<b>32,31±0,025</b>	<0,05	743,89	<b>0,13±0,018</b>	0,051	657,78
<b>50k</b>	18,26±0,056	<0,05	223,56	<b>0,15±0,0145</b>	<0,05	485,57
<b>6</b>	28,21±0,02536	-	-	0,044±2,1*10 <sup>-5</sup>	-	-

\*IC<sub>50</sub> związków wyższe od IC<sub>50</sub> MPA, p – istotność statystyczna różnicy, F – test Fishera dla porównania związek:MPA

### 3.2.2. Analiza aktywności proliferacyjnej metodą inkorporacji TdR-3H

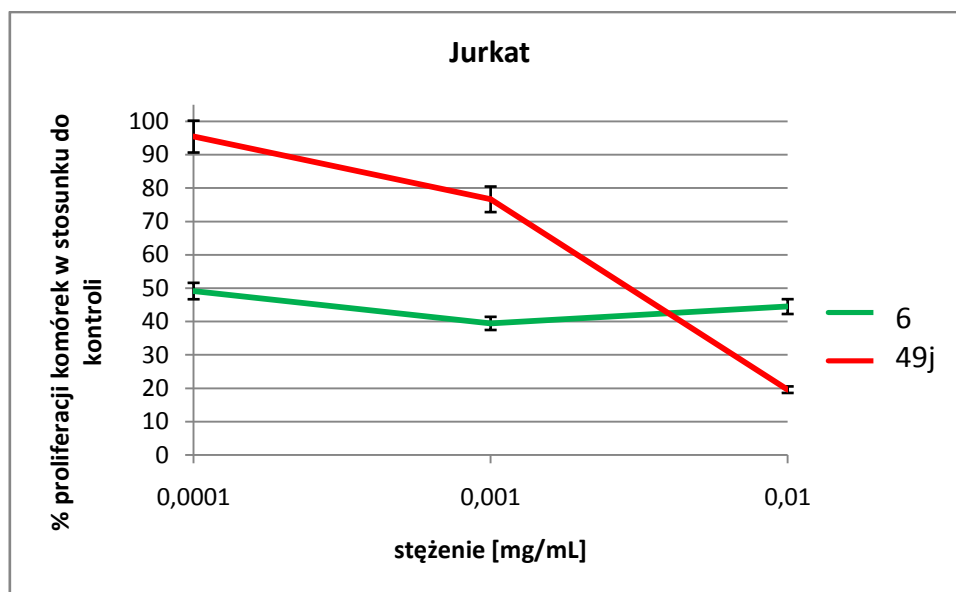
Testy zahamowania proliferacji służą ocenie skuteczności działania związku jako leku immunosupresyjnego. Wyznaczaną wartością jest  $EC_{50}$  (50% effect concentration). Im niższa wartość  $EC_{50}$ , tym niższe stężenie substancji, jakie można byłoby zastosować w leczeniu. Test ze znakowaną trytem tymidyną jest powszechnie używany jako wskaźnik monitorowania syntezy DNA i proliferacji komórek. Test ten wykonałam na limfoidalnej linii komórkowej Jurkat, która jest modelową linią ludzkich limfocytów oraz aktywowanych limfocytach.

#### 3.2.2.1. Oznaczanie aktywności antyproliferacyjnej metodą inkorporacji TdR-3H aminokwasowych analogów MPA wobec linii komórkowej Jurkat oraz aktywowanych limfocytów

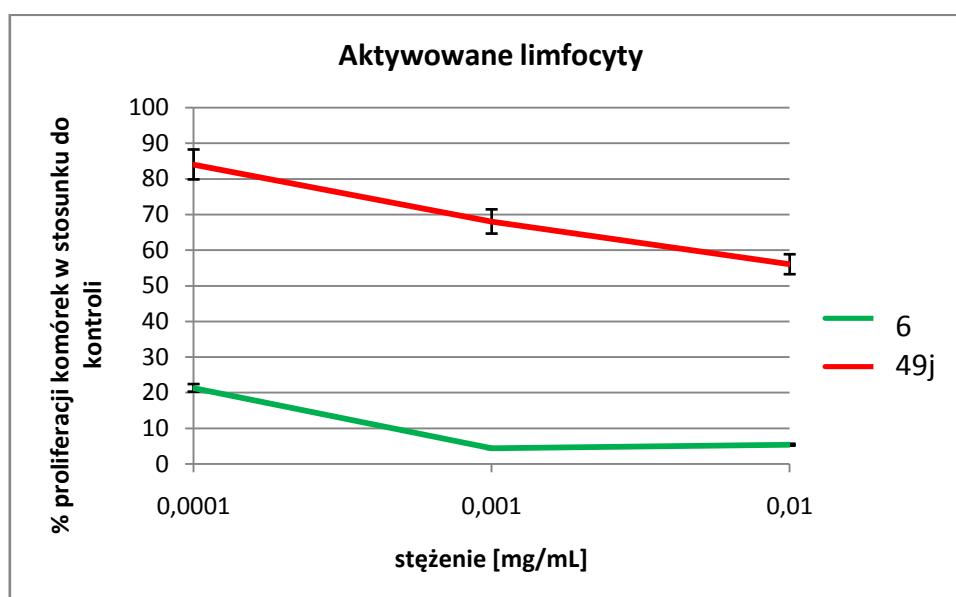
Metoda ta polega na wbudowywaniu znakowanej trytem tymidyny w strukturę DNA przez żywe komórki. Test ten dostarcza informacji na temat aktywności badanych substancji. Na płytkach okrągłodennych 96-dołkowych inkubowałam komórki odpowiedniej linii komórkowej wraz z odpowiednimi stężeniami badanych związków. Po 72h do każdego dołka dodawany jest TdR-3H. Całość pozostawiłam na kolejne 18h. Po tym czasie komórki zbieramy na filtry celulozowe i pozostawiamy do wyschnięcia. Do każdego naczynia zawierającego „bibułkę” dodajemy płyn scyntylicyjny i dokonujemy pomiaru radioaktywności. Wynik mierzony jest w CPM. Za pomocą zależności pomiędzy wartościami CPM od stężenia związku wyznaczałam  $EC_{50}$  przyjmując wartość komórek kontrolnych jako 100%.

##### *I. Pochodne w postaci estrów metylowych 49a-k*

Jak można zauważyć w Tabeli 5 wszystkie estry wykazują wyższą wartość  $EC_{50}$  niż MPA wobec PBMC. W przypadku komórek Jurkat pięć pochodnych **49b** ( $EC_{50}=5,68\mu\text{M}$ ), **49h** ( $EC_{50}=6,27\mu\text{M}$ ), **49i** ( $EC_{50}=8,29\mu\text{M}$ ), **49j** ( $EC_{50}=6,66\mu\text{M}$ ) i **49k** ( $EC_{50}=7,9\mu\text{M}$ ) charakteryzuje się niższą wartością  $EC_{50}$  niż MPA. Wszystkie otrzymane wartości są istotne statystycznie ( $p<0,05$ ). Enancjomery L były bardziej aktywne dla alaniny **49a,b** oraz waliny **49f,g** przeciw komórkom Jurkat. Dodatkowo można zauważyć zmniejszony wpływ chiralności reszty aminokwasowej na aktywność pochodnych dla kwasu glutaminowego **49d,e**, leucyny **49h,i** oraz fenyloalaniny **49j,k**. Niestety żadna pochodna nie wykazała wyższej aktywności wobec aktywowanych limfocytów niż MPA **6**.



**Wykres 5.** Krzywe zależności stopnia zahamowania proliferacji komórek od stężenia związku 49j oraz 6 wobec linii komórkowej Jurkat (związek wyselekcjonowany do badań biologicznych *in vivo*).



**Wykres 6.** Krzywe zależności stopnia zahamowania proliferacji komórek od stężenia związku 49j oraz 6 wobec aktywowanych limfocytów (związek wyselekcjonowany do badań biologicznych *in vivo*).



Omówienie wyników pracy

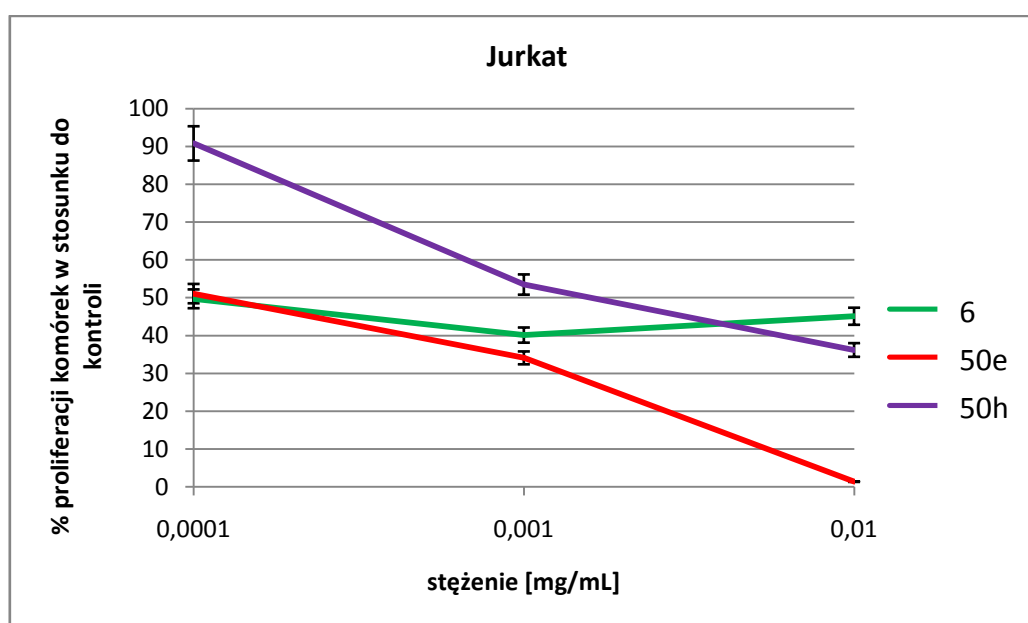
**Tabela 5.** Wartości EC<sub>50</sub> obliczone na podstawie testu TdR-3H dla aminokwasowych pochodnych MPA w postaci estrów **49a-k, 6** wyrażone w [μM] ±SD

Nr związku	Jurkat T			PBMC		
	EC <sub>50</sub>	p	F	EC <sub>50</sub>	p	F
<b>49a</b>	30,134 ± 0,011	<0,05	285,37	0,0030 ± 0,0002	<0,05	69,08
<b>49b</b>	<b>5,681 ± 0,0017</b>	<0,05	29331,43	0,0017 ± 0,0001	<0,05	70,12
<b>49c</b>	24,58 ± 0,0028	<0,05	351,21	0,0069 ± 0,0007	<0,05	122,62
<b>49d</b>	26,2 ± 0,0174	<0,05	738,37	0,0021±0,0002	<0,05	165,40
<b>49e</b>	24,73 ± 0,0272	<0,05	1594,73	0,0065±0,0007	<0,05	194,19
<b>49f</b>	15,25 ± 0,0032	<0,05	6091,42	0,0005 ± 0,0001	<0,05	31,64
<b>49g</b>	36,04 ± 0,0236	0,059	141,23	0,0014 ± 0,0004	<0,05	56,03
<b>49h</b>	<b>6,27 ± 0,0031</b>	<0,05	204,07	0,0016±6,9*10 <sup>-5</sup>	<0,05	20,55
<b>49i</b>	<b>8,29 ± 0,0036</b>	<0,05	37153,29	0,0038±0,0013	<0,05	100,81
<b>49j</b>	<b>6,66±0,0014</b>	<0,05	5723,37	0,0042±0,0004	<0,05	242,27
<b>49k</b>	<b>7,9±0,0304</b>	<0,05	65934,89	0,0052±0,0012	<0,05	220,02
<b>6</b>	9,45±0,0789	-	-	0,00006±4,6*10 <sup>-6</sup>	-	-

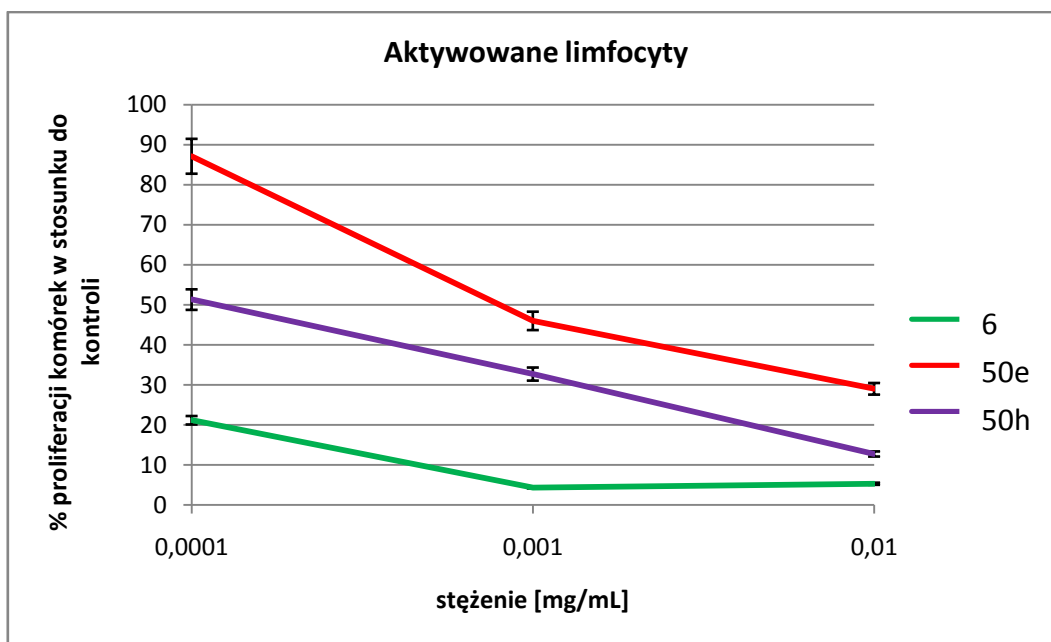
\*IC<sub>50</sub> związków wyższe od IC<sub>50</sub> MPA, p – istotność statystyczna różnicy, F – test Fishera dla porównania związek:MPA

**II. Aminokwasowe analogi MPA z wolną grupą karboksylową 50a-k**

W Tabeli 6 przedstawiłam wartości  $EC_{50}$  dla aminokwasowych analogów MPA z wolną grupą karboksylową. Analogi **50a** ( $EC_{50}=7,9\mu M$ ), **50c** ( $EC_{50}=1,25\mu M$ ), **50e** ( $EC_{50}=0,45\mu M$ ), **50h** ( $EC_{50}=6,01\mu M$ ) charakteryzują się niższą wartością  $EC_{50}$  niż MPA ( $EC_{50}=9,45\mu M$ ) dla limfoidalnej linii komórkowej Jurkat. Godnymi uwagi są związki glicyny **50c** oraz kwasu D-glutaminowego **50e**, które okazały się najbardziej aktywnymi pochodnymi kwasu MPA. Dodatkowo związki **50e** ( $EC_{50}=0,0033\mu M$ ) i **50h** ( $EC_{50}=0,0039\mu M$ ) wykazały niższą wartość  $EC_{50}$  niż jakakolwiek inna pochodna **50** dla PBMC.



**Wykres 7.** Krzywe zależności stopnia zahamowania proliferacji komórek od stężenia związków **50e**, **50h** oraz **6** wobec linii komórkowej Jurkat (związki wyselekcjonowane do badań biologicznych *in vivo*).



**Wykres 8.** Krzywe zależności stopnia zahamowania proliferacji komórek od stężenia związku **50e**, **50h** oraz **6** wobec aktywowanych limfocytów (związki wyselekcjonowane do badań biologicznych *in vivo*).

Omówienie wyników pracy

**Tabela 6.** Wartości EC<sub>50</sub> obliczone na podstawie testu TdR-3H dla aminokwasowych pochodnych MPA z wolną grupą karboksylową **50a-k, 6** wyrażone w [μM] ±SD

Nr związku	JURKAT			PBMC		
	EC <sub>50</sub>	p	F	EC <sub>50</sub>	p	F
<b>50a</b>	<b>7,9 ± 0,0023</b>	<0,05	2216,50	0,0056 ± 0,0003	<0,05	142,75
<b>50b</b>	13,3 ± 0,0028	<0,05	1250,55	0,0051± 0,0005	<0,05	61,84
<b>50c</b>	<b>1,25±0,008</b>	<0,05	1719,10	0,0225 ±0,0005	<0,05	316,24
<b>50d</b>	19,85 ± 0,0027	<0,05	1235,00	0,0065±0,0007	<0,05	75,31
<b>50e</b>	<b>0,45±7,3*10<sup>-5</sup></b>	<0,05	7978,35	0,0033± 0,0003	<0,05	33,21
<b>50f</b>	21,51±0,0015	<0,05	8855,69	0,0060±0,0004	<0,05	67,84
<b>50g</b>	19,12±0,0016	<0,05	17986	0,0062±0,0002	<0,05	96,32
<b>50h</b>	<b>6,01±0,0016</b>	<0,05	11663,82	0,0039±0,0002	<0,05	32,79
<b>50i</b>	16,17±0,0050	<0,05	2770,586	0,0155±0,0012	<0,05	307,08
<b>50j</b>	19,49±0,025	<0,05	659,89	0,016±0,0003	<0,05	56,78
<b>50k</b>	21,20±0,056	<0,05	157,54	0,01±0,0013	<0,05	73,75
<b>6</b>	9,45±0,0789	-	-	0,00006±4,6*10 <sup>-6</sup>	-	-

\*IC<sub>50</sub> związków wyższe od IC<sub>50</sub> MPA, p – istotność statystyczna różnicy, F – test Fishera dla porównania związek:MPA

### 3.2.3. Wybór analogów MPA o najkorzystniejszych parametrach

W celu określenia zależności pomiędzy  $IC_{50}$  oraz  $EC_{50}$  analogów MPA policzyłam współczynnik selektywności (SI). Im wartość SI jest większa tym mniejsza jest toksyczność związku w porównaniu z zastosowaną dawką leku.

$$SI = \frac{IC_{50}}{EC_{50}}$$

gdzie:

$IC_{50}$  – stężenie hamujące otrzymane w teście MTT [ $\mu M$ ]

$EC_{50}$  - stężenie efektywne otrzymane w teście proliferacyjnym [ $\mu M$ ]

Zgodnie z Tabelą 7 najbardziej obiecującymi pochodnymi są **49j** (SI=2871,429), **50e** (SI=33787,88) i **50h** (SI=7166,667) w przypadku komórek PBMC. Nawet jeżeli ich wartość  $EC_{50}$  była wyższa niż dla MPA, wykazały one znacznie mniejszą toksyczność. Jednocześnie pochodna kwasu D-glutaminowego dała najlepszy indeks selektywności dla limfoidalnej linii komórkowej Jurkat oraz aktywowanych komórek PBMC.

**Tabela 7.** Indeks selektywności pochodnych aminokwasowych MPA **49a-k**, **50a-k** i **6**.

Nr związku	Jurkat	PBMC
	SI	SI
<b>49a</b>	2,2	1166,7
<b>49b</b>	4,1	0,1
<b>49c</b>	2,7	13,3
<b>49d</b>	0,8	23,8
<b>49e</b>	1,05	23,1
<b>49f</b>	0,1	320,0
<b>49g</b>	0,75	19,3
<b>49h</b>	1,04	0,1
<b>49i</b>	2,3	176,3
<b>49j</b>	3,6	2871,4
<b>49k</b>	0,8	1359,6

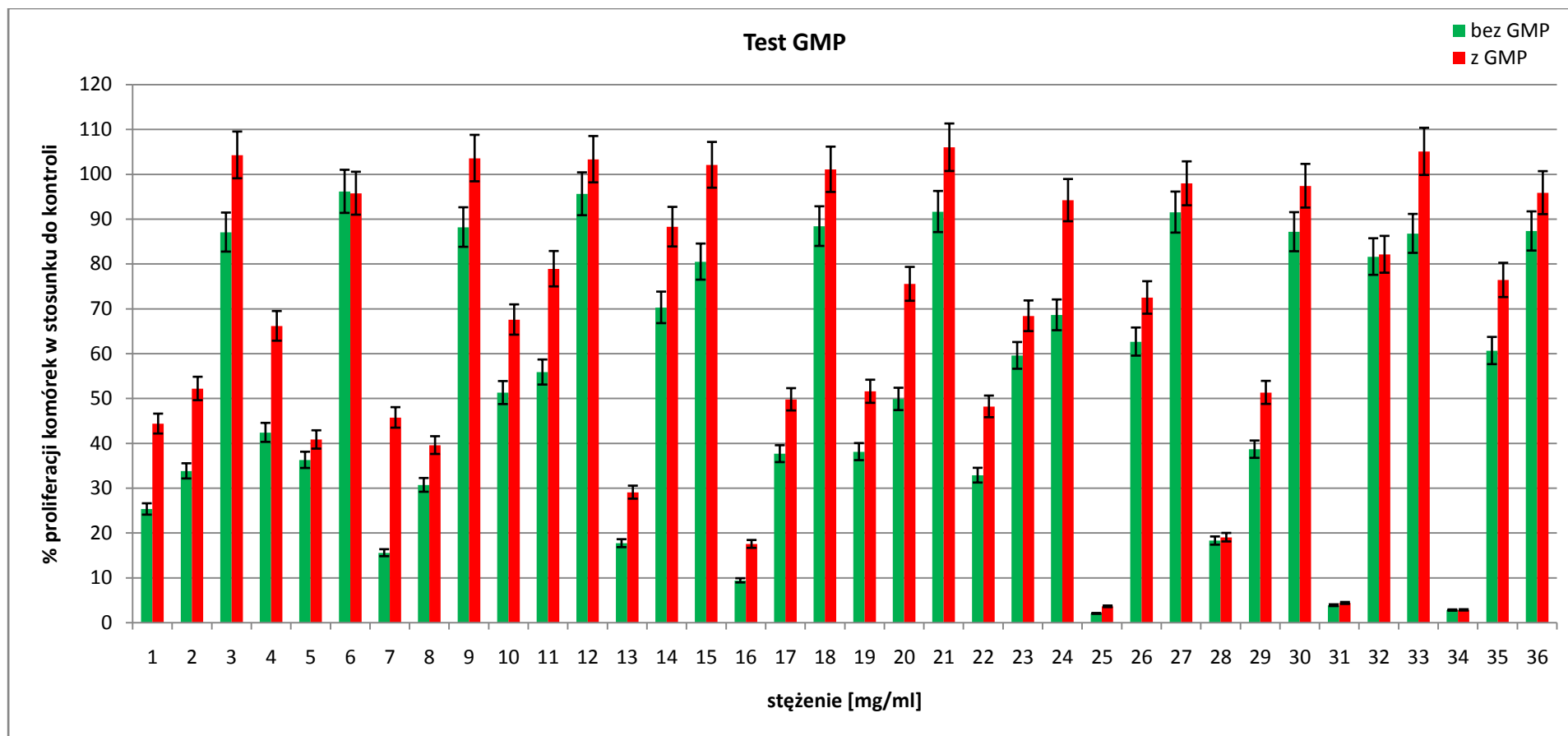
### Omówienie wyników pracy

<b>50a</b>	1,2	0,6
<b>50b</b>	0,1	0,1
<b>50c</b>	4,02	728,9
<b>50d</b>	1,6	652,3
<b>50e</b>	<b>47,1</b>	<b>33787,9</b>
<b>50f</b>	0,01	231,7
<b>50g</b>	2,0	471,0
<b>50h</b>	1,5	7166,7
<b>50i</b>	2,6	1758,7
<b>50j</b>	1,7	8,1
<b>50k</b>	0,9	15,1
<b>6</b>	2,99	733,3

#### **3.2.4. Oznaczanie aktywności antyproliferacyjnej metodą inkorporacji TdR-3H aminokwasowych analogów MPA wobec linii komórkowej Jurkat w obecności GMP**

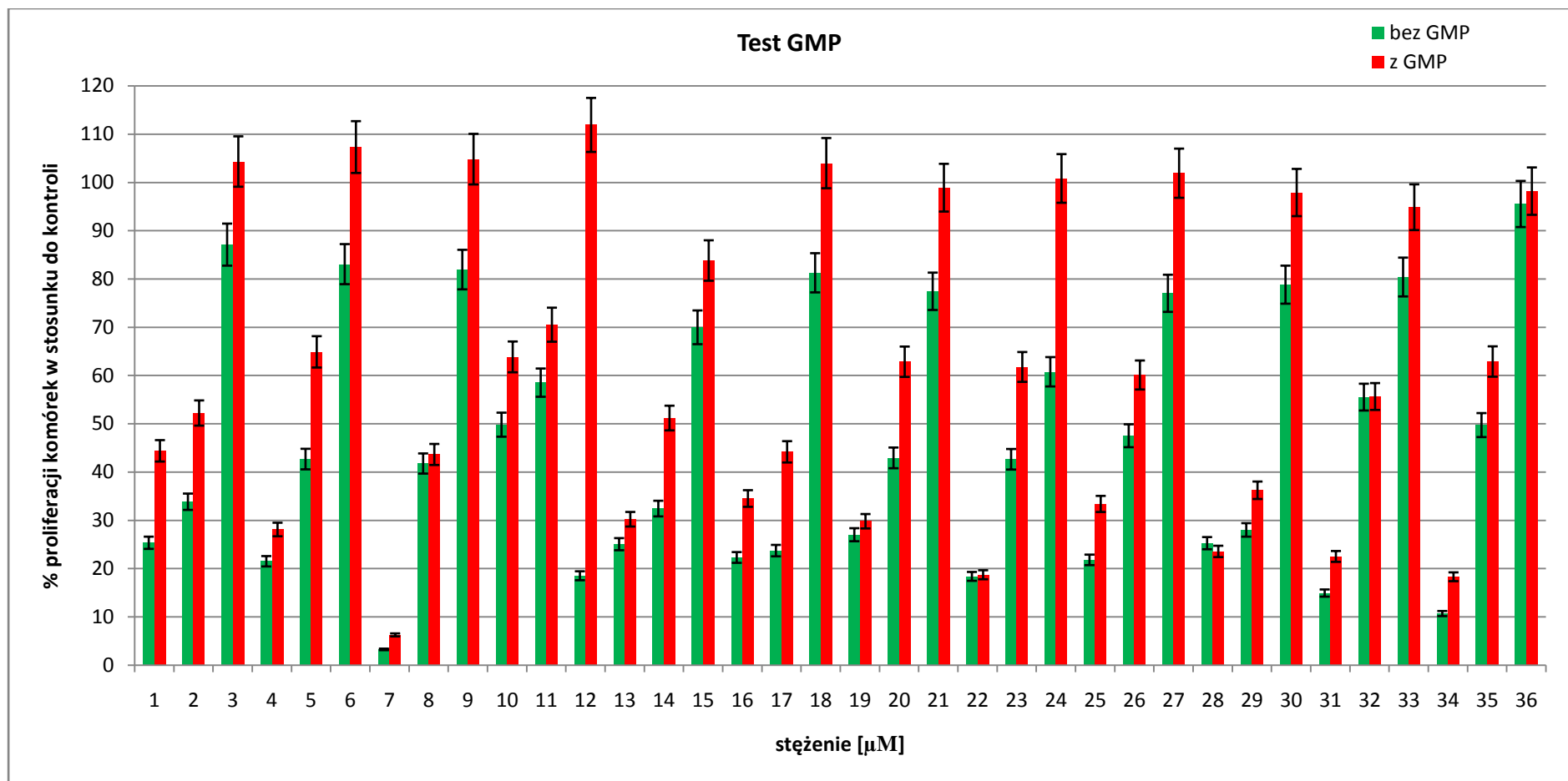
Kwas mykofenolowy jest znanym inhibitorem dehydrogenazy 5'-monofosforanu IMPDH. W celu sprawdzenia czy aktywność antyproliferacyjna otrzymanych analogów MPA oparta jest selektywna i oparta o ten sam mechanizm działania co MPA przeprowadziłam test z tymidyną znakowaną trytem z dodatkiem 50  $\mu$ M GMP. W literaturze można znaleźć informacje, że supresja proliferacji komórek pod wpływem inhibitorów enzymu IMPDH jest odwracalna przez dodatek guanozyny, GMP, GTP, detoksy-GMP. Efekt ten mogliśmy zaobserwować zarówno dla pochodnych w postaci estrów metylowych **49a-k** (Wykres 9), jak również związków z wolną grupą karboksylową **50a-k** (Wykres 10).

Wykres 9. Aktywność proliferacyjna pochodnych **49a-k** w obecności GMP.



Związki: **6**: 1- 312,5  $\mu$ M, 2- 31,25  $\mu$ M, 3- 3,125  $\mu$ M; **49a**: 4- 246,9  $\mu$ M, 5- 24,69  $\mu$ M, 6- 2,469  $\mu$ M; **49b**: 7- 246,9  $\mu$ M, 8- 24,69  $\mu$ M, 9- 2,469  $\mu$ M; **49c**: 10- 255,7  $\mu$ M, 11- 25,57  $\mu$ M, 12- 2,557  $\mu$ M; **49d**: 13- 209,6  $\mu$ M, 14- 20,96  $\mu$ M, 15- 2,096  $\mu$ M; **49e**: 16- 209,6  $\mu$ M, 17- 20,96  $\mu$ M, 18- 2,096  $\mu$ M; **49f**: 19- 230,9  $\mu$ M, 20- 23,09  $\mu$ M, 21- 2,309  $\mu$ M; **49g**: 22- 230,9  $\mu$ M, 23- 23,09  $\mu$ M, 24- 2,309  $\mu$ M; **49h**: 25- 223,7  $\mu$ M, 26- 22,37  $\mu$ M, 27- 2,237  $\mu$ M; **49i**: 28- 223,7  $\mu$ M, 29- 22,37  $\mu$ M, 30- 2,237  $\mu$ M; **49j**: 31- 207,9  $\mu$ M, 32- 20,79  $\mu$ M, 33- 2,079  $\mu$ M; **49k**: 34- 207,9  $\mu$ M, 35- 20,79  $\mu$ M, 36- 2,079  $\mu$ M.

**Wykres 10.** Aktywność proliferacyjna pochodnych **50a-k** w obecności GMP.

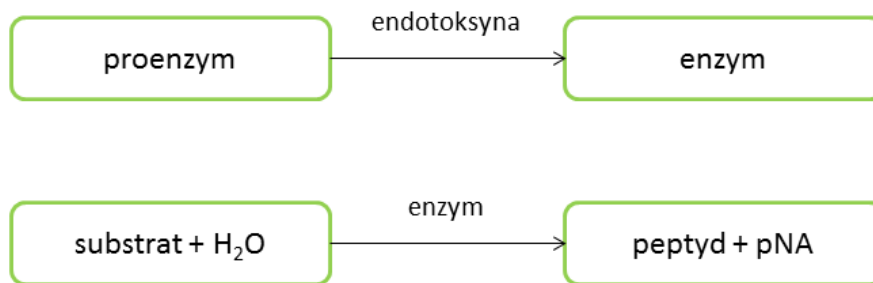


**Związek: 6:** 1- 312,5 µM, 2- 31,25 µM, 3- 3,125 µM; **50a:** 4- 255,7 µM, 5- 25,57 µM, 6- 2,557 µM; **50b:** 7- 255,7 µM, 8- 25,57 µM, 9- 2,557 µM; **50c:** 10- 265,2 µM, 11- 26,52 µM, 12- 2,652 µM; **50d:** 13- 222,7 µM, 14- 22,27 µM, 15- 2,227 µM; **50e:** 16- 222,7 µM, 17- 22,27 µM, 18- 2,227 µM; **50f:** 19- 238,6 µM, 20- 23,86 µM, 21- 2,386 µM; **50g:** 22- 238,6 µM, 23- 23,86 µM, 24- 2,386 µM; **50h:** 25- 230,9 µM, 26- 23,09 µM, 27- 2,309 µM; **50i:** 28- 230,9 µM, 29- 23,09 µM, 30- 2,309 µM; **50j:** 31- 214,1 µM, 32- 21,41 µM, 33- 2,141 µM; **50k:** 34- 214,1 µM, 35- 21,41 µM, 36- 2,141 µM.



### 3.2.5. Test na obecność endotoksyny (LAL)

Endpoint Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate (LAL) jest testem opartym na lizacji amebocytów skrzypłocza. Endotoksyna bakterii Gram- katalizuje aktywację proenzymu w LAL. Szybkość początkowa zależy od stężenia obecnej endotoksyny. Zaktywowany enzym katalizuje odejście p-nitroaniliny (pNA) z bezbarwnego substratu Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA (Schemat 10). Następnie, po zatrzymaniu reakcji, ilość wolnej pNA mierzona jest fotometrycznie ( $\lambda=405-410\text{nm}$ ) poprzez badanie absorbancji. Jest to ilościowym testem obecności endotoksyny bakterii Gram-.



**Schemat 10.** Zasada działania testu LAL.

Wykonany test potwierdził, że badane związki nie zawierają endotoksyny, która mogłaby powodować dojrzewanie DC, a tym samym zafałszowanie wpływu badanych związków.

### 3.2.6. Oznaczanie wpływu związków wyselekcjonowanych do badań *in vivo* na ekspansję i dojrzewanie komórek dendrytycznych z prekursorów monocytarnych ludzkiej krwi obwodowej

Komórki dendrytyczne w znaczącym odsetku wywodzą się z monocytów, jako tzw. mieloidalne komórki dendrytyczne (moDC). Badania wykazały, że prekursorzy monocytów dojrzewają w szpiku kostnym, a następnie przechodzą jako dojrzałe monocyty do krwi. Przed migracją do tkanki, gdzie rozwiną się w różne rodzaje makrofagów, krążą przez kilka dni. Komórki z tej linii są zbiorczo nazywane fagocytami jednojądrzastymi lub monocytami/makrofagami [148]. U ludzi i myszy, monocyty posiadają pewne charakterystyczne cechy morfologiczne: nieregularny kształt komórek, jądra owalne lub w kształcie nerki, pęcherzyki cytoplazmatyczne, wysoki stosunek cytoplazmy do jądra. W analizach laboratoryjnych monocyty są najbardziej zbliżone do komórek dendrytycznych (DCs), aktywowanych limfocytów oraz komórek NK [148-151]. Należy podkreślić, że monocyty i pochodzące z nich moDC są również odmienne od plazmatycznych komórek dendrytycznych (plasmacytoid dendritic cells, pDCs), drugiej dużej grupie komórek DC wywodzących się z linii limfoidalnej [152-157].

Najważniejszą funkcją monocytów jest udział w procesie zapalnym oraz prezentacja antygenów. Ta ostatnia funkcja jest w dużej mierze realizowana poprzez powstające z nich makrofagi tkankowe oraz komórki moDC [158-161]. Różnicowanie monocytów do komórek dendrytycznych jest obserwowane głównie w stanach zapalnych [162].

Komórki dendrytyczne pochodzące z monocytów (moDCs) można różnicować DC w obecności GM-CSF oraz IL-4 *in vitro* [163,164]. Tak powstałe DC są w stanie stymulować proliferację komórek T w hodowlach autologicznych i alogenicznych [152].

*In vivo*, w szpiku kostnym wspólne monocytarne prekursorzy komórek dendrytycznych różnicują się do monocytów oraz innych prekursorów nazywanych wspólnymi prekursorami DC i pre-cDCs. Dodatkowo monocyty są prekursorami nielimfoidalnych DC obwodowych narządów oraz przyczyniają się do migracji DC w stanach zapalnych [165].

W celu określenia wpływu wyselekcjonowanych związków na ekspansję komórek dendrytycznych z prekursorów monocytarnych ludzkiej krwi obwodowej wykonałam badania cytometryczne.

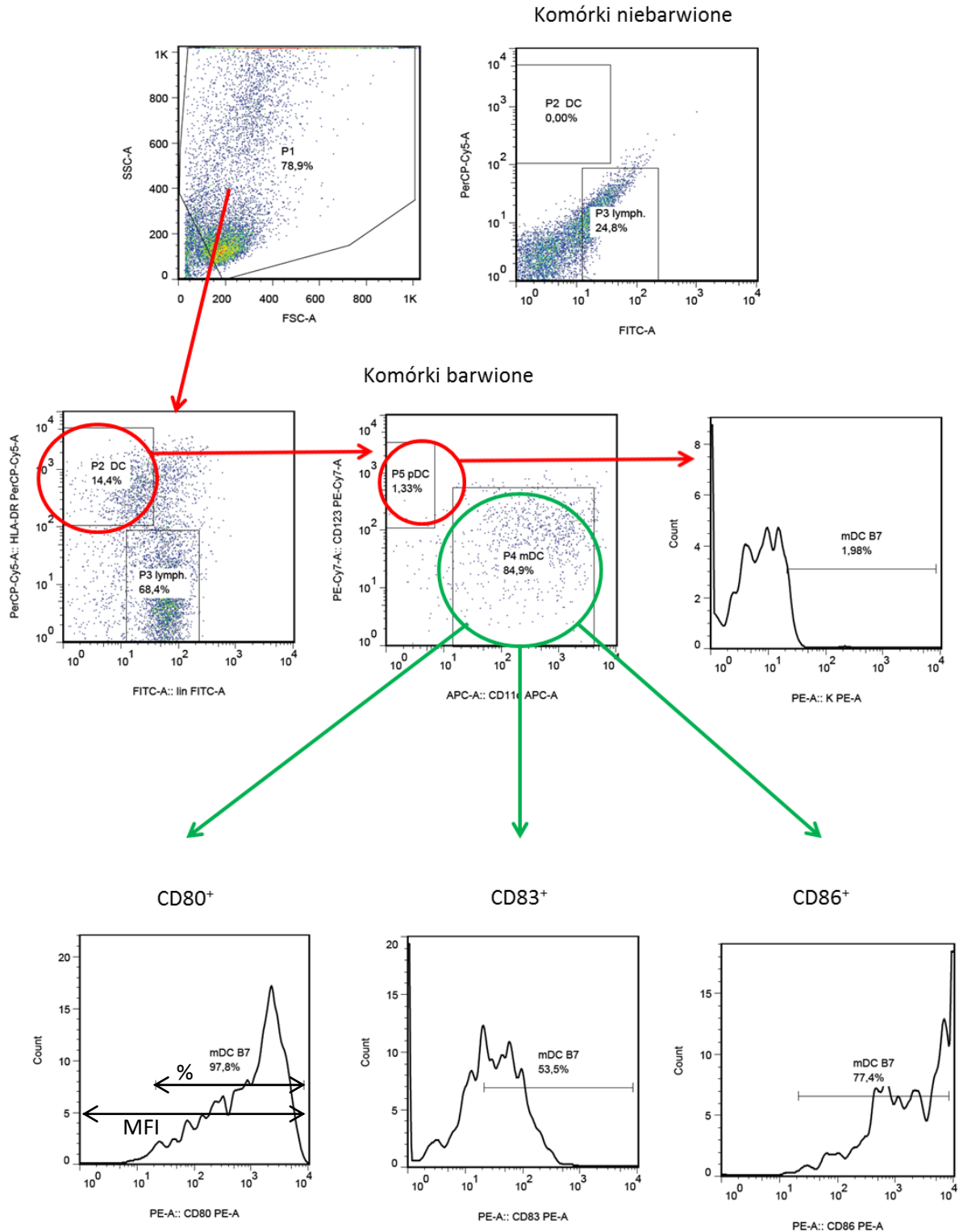
Wyizolowane monocyty z dodatkiem IL-4 i GM-CSF w pożywce GMC-DC inkubowałam przez 7 dni w cieplarni CO<sub>2</sub> w 37°C. Po tym czasie dodawałam LPS-u oraz badanych związków zgodnie z wcześniej wyliczonymi stężeniami EC<sub>50</sub> dla komórek

## *Omówienie wyników pracy*

PBMC i pozostawiałam na kolejne 72h. Po 10 dniach wykonywałam badania cytometryczne z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych przeciw: lineage cocktail 1 (lin 1) - CD3, CD14, CD16, CD19, CD20; HLA-DR; CD11c; CD123; CD80; CD83; CD86. W badaniu cytometrycznym stosowałam następujące bramki: HLA DR/lin w celu wyodrębnienia komórek dendrytycznych HLA DR+lin-. Z tej populacji wyliczałam odsetek DC plazmacytoidalnych CD123+ oraz mieloidalnych CD11c+, a następnie analizowałam ekspresję markerów dojrzewania w tych populacjach, tj.: CD80<sup>+</sup>, CD83<sup>+</sup> i CD86<sup>+</sup>. Badanie to umożliwiło określenie wpływu badanych związków na dojrzewanie komórek dendrytycznych.

Schemat 11 przedstawia analizę cytometryczną składu fenotypowego komórek.

Omówienie wyników pracy

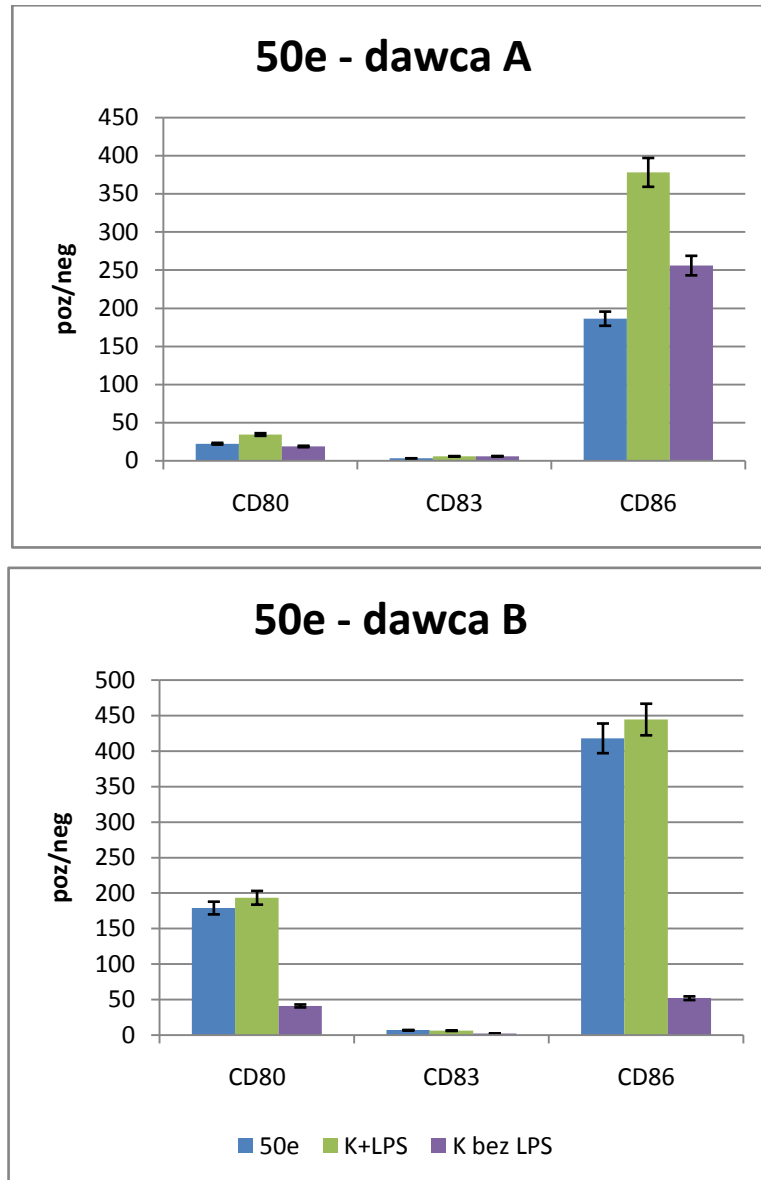


**Schemat 11.** Analiza cytometryczna komórek DC otrzymanych w wyniku ekspansji ze związkiem 50e.

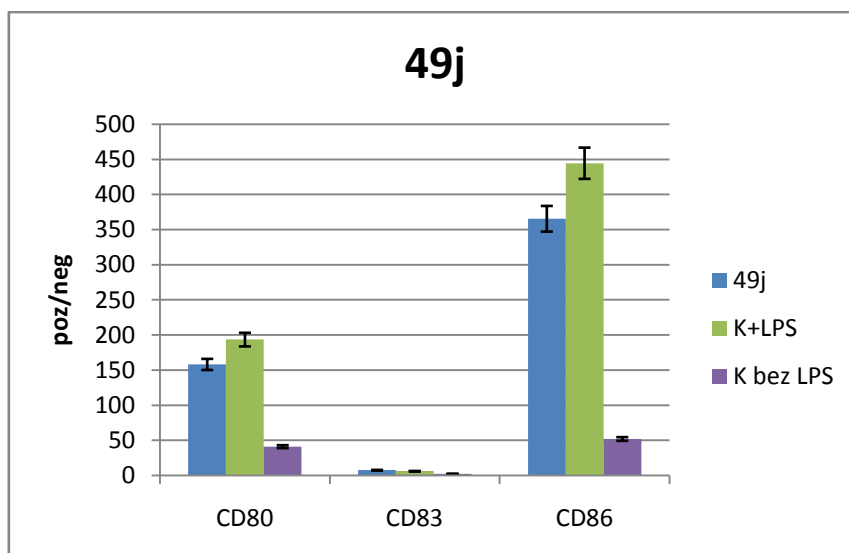
Wcześniejsze badania wykazały wpływ dnia dodania związku na ilość DC. Pochodne aminokwasowe charakteryzowały się lepszym hamowaniem dojrzewania DC w przypadku

dodania związku siódmego dnia. W związku z powyższymi wynikami postanowiliśmy wprowadzać badane związki po siedmiu dniach od rozpoczęcia hodowli wraz ze stymulatorem (LPS).

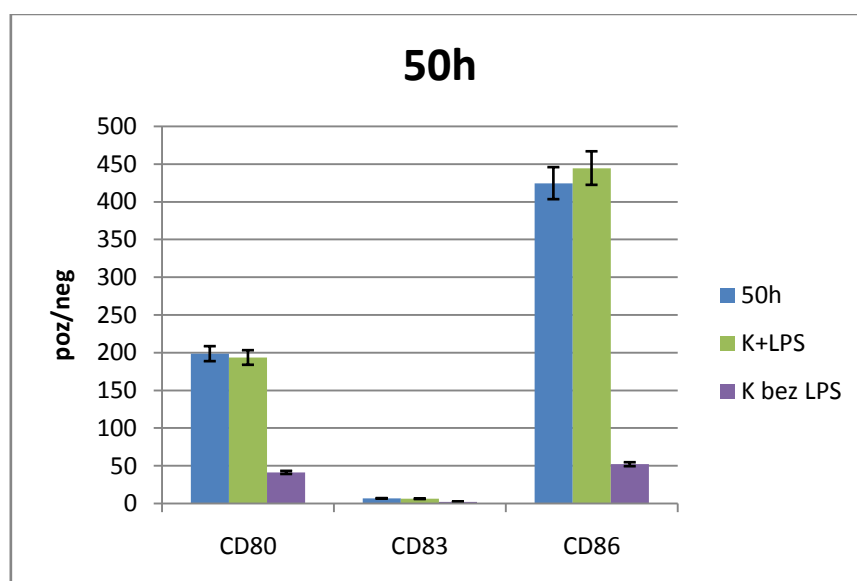
Otrzymane wyniki zaprezentowane są na wykresach 11-14.



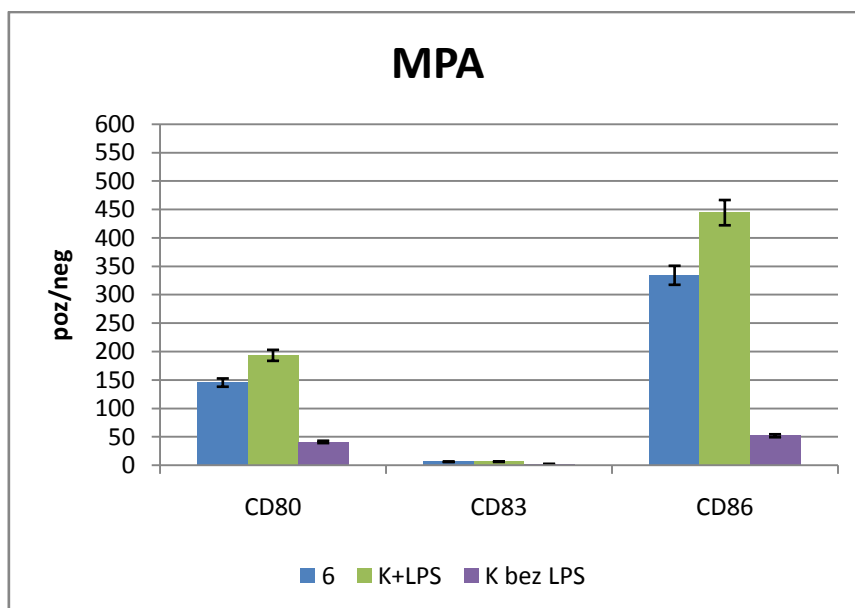
**Wykres 11.** Wpływ związku **50e** na dojrzewanie komórek dendrytycznych pochodzących od dawcy A i B (poz/neg – indeks wartości fluorescencji MFI otrzymanej przy barwieniu komórek przeciwciałami do wartości dla kontroli izotypowej).



**Wykres 12.** Wpływ związku **49j** na dojrzewanie komórek dendrytycznych (poz/neg – indeks wartości fluorescencji MFI otrzymanej przy barwieniu komórek przeciwciałami do wartości dla kontroli izotypowej).



**Wykres 13.** Wpływ związku **50h** na dojrzewanie komórek dendrytycznych (poz/neg – indeks wartości fluorescencji MFI otrzymanej przy barwieniu komórek przeciwciałami do wartości dla kontroli izotypowej).



**Wykres 14.** Wpływ MPA **6** na dojrzewanie komórek dendrytycznych (poz/neg – indeks wartości fluorescencji MFI otrzymanej przy barwieniu komórek przeciwciałami do wartości dla kontroli izotypowej).

Wykres 11 zawiera wyniki wpływu związku **50e** na dojrzewanie DC pochodzącej od dwóch różnych dawców. Jak możemy zauważyć aktywność związku w znacznym stopniu zależy od dawcy. Mimo to wszystkie pochodne spowodowały spadek ilości komórek CD86 w porównaniu z kontrolą zawierającą LPS. Wyjątkową sytuację możemy zaobserwować w przypadku dawcy A dla związku **50e**, dodatek którego spowodował spadek ilość komórek CD86 zarówno w porównaniu z kontrolą traktowaną LPS-em, jak i kontrolą bez LPS-u. U drugiego dawcy zachodzi taka sama zależność jak dla innych związków. Związki **49j** i **50e** wykazały również spadek ekspresji receptora CD80, zaś związek **50h** spowodował nieznaczny wzrost tej ekspresji w porównaniu z kontrolą. Żaden związek nie wywiera większego wpływu na ekspresję receptora CD83. Wszystkie związki wykazują zbliżone działanie do MPA 6 (Wykres 14).

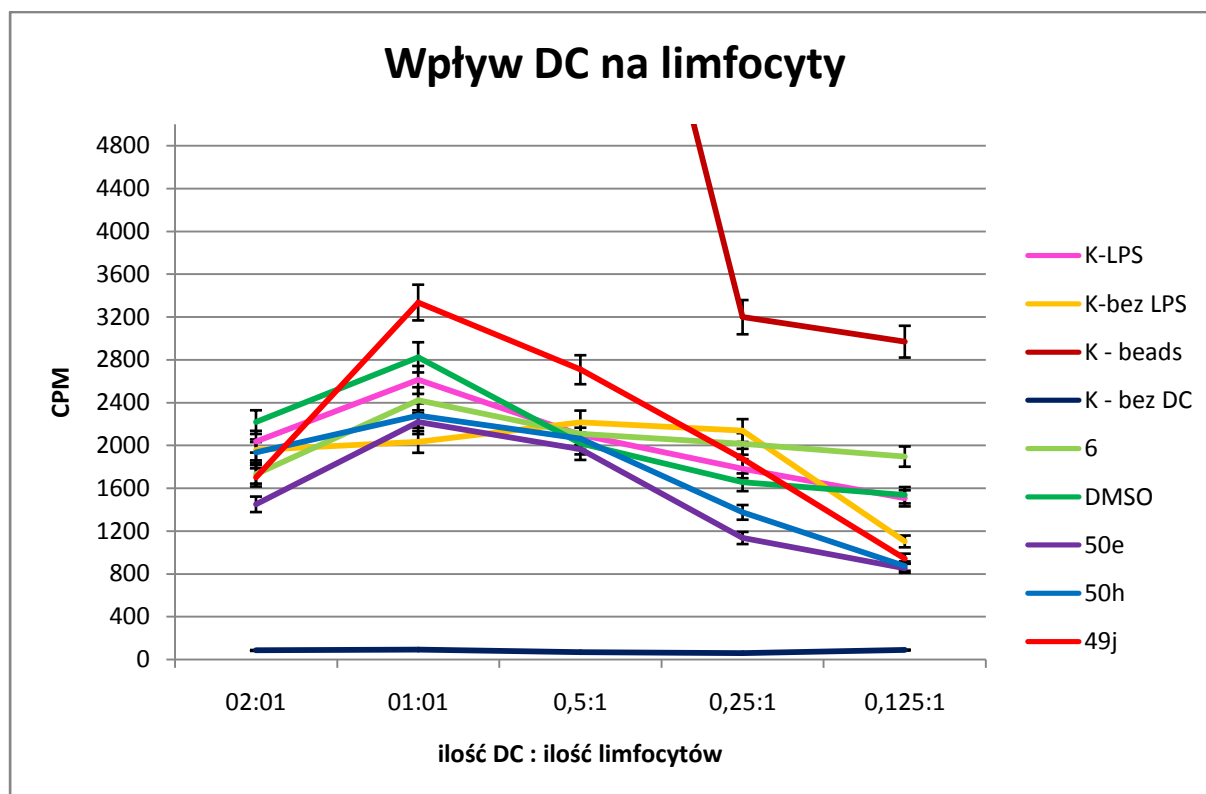
### **3.2.7. Oznaczenie wpływu komórek dendrytycznych na aktywność proliferacyjną metodą inkorporacji TdR-3H wobec limfocytów**

Nabyta odpowiedź immunologiczna przeciwko obcym antygenom (Ags) jest spowodowana przez Ag-specyficzne komórki T. Komórki T CD4+ i CD8+ rozpoznają Ags poprzez wiązanie peptydowe z cząsteczkami MHC klasy I i klasy II [166]. Efektorowe komórki T CD8+ mogą bezpośrednio rozpoznawać komórki nowotworowe lub zainfekowane komórki prezentujące obcy antygen jako powierzchniowy kompleks peptyd-MHC (pMHCs). Po rozpoznaniu pośredniczą w zabijaniu komórek dzięki wydzielaniu toksycznych granul [166, 167]. Komórki efektorowe CD4+ komórek T przyczyniają się do skutecznego aktywowania komórek T CD8+ i regulują funkcje kilku komórek wrodzonego ramienia układu odpornościowego koordynując odpowiedź immunologiczną [167-170]. W zależności od sygnałów dostarczanych przez komórki dendrytyczne komórkom T, mogą one promować różnicowanie komórek T CD4+ w obrębie różnych podgrup: Th1, Th2 i Th17 T regulatorowe [167, 171-175].

Jak już wspomniałam powyżej, DC są najsilniejszymi APC specjalizującymi się w inicjowaniu nabytej odpowiedzi immunologicznej kierując aktywacją oraz różnicowaniem naiwnych limfocytów T [167, 171, 172]. Komórki te mogą prezentować antygeny własne lub obce w różnych tkankach, spowodować migrację do limfatycznych narządów wtórnych oraz zaprezentować przetworzone antygeny komórkom T na cząsteczkach MHC [167, 174].

W celu określenia wpływu wygenerowanych DC na limfocyty w pierwszym etapie przeprowadzałam ekspansję DC. Wyizolowane monocyty z dodatkiem IL-4 i GM-CSF w pożywce GMC-DC inkubowałam przez 7 dni w cieplarni CO<sub>2</sub> w 37°C. Po tym czasie dodawałam LPS-u oraz badanych związków zgodnie z wcześniej wyliczonymi stężeniami EC<sub>50</sub> dla komórek PBMC i pozostawiałam na kolejne 72h. Następnie otrzymane DC dodawałam do wyizolowanych limfocytów w ilości (DC/limfocyty): 2:1, 1:1, 0,5:1, 0,25:1, 0,125:1. Prowadziłam inkubację przez 72h. Po tym czasie dodawałam tymidyny znakowanej trytem i pozostawiałam do dnia następnego. Odczyt wykonywałam na czytniku scyntylicyjnym.





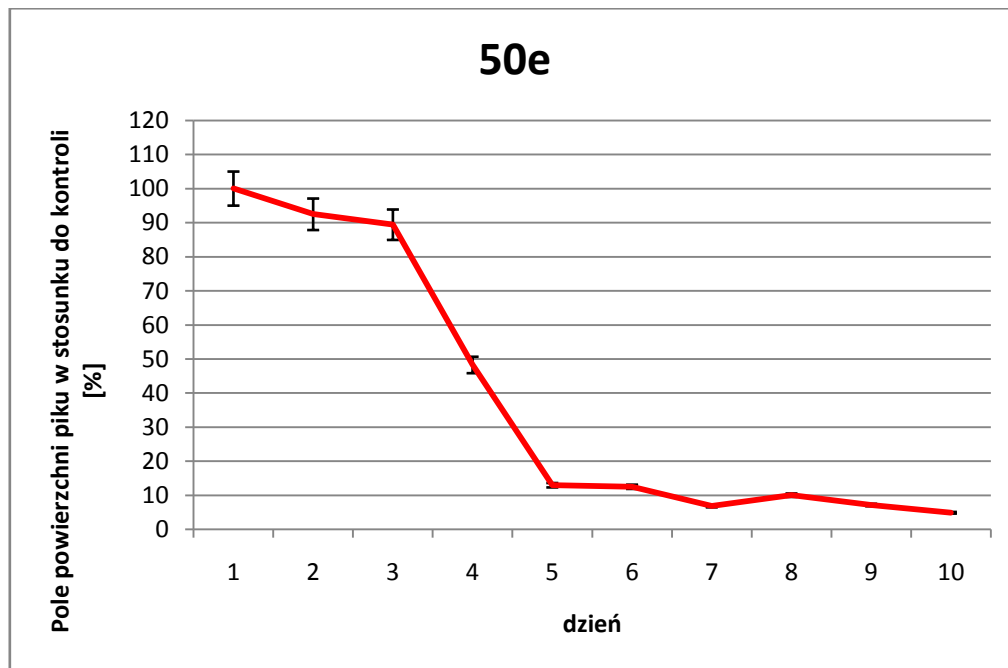
Wykres 15. Wpływ ilości DC na limfocyty.

Wykres 15 zawiera wpływ ilości wygenerowanych DC na proliferację limfocytów. Jak możemy zauważyć dodatek badanych związków nie powoduje hamowania dojrzewania DC. Związki **50e** i **50h** wykazują nieznacznie wyższy poziom hamowania dojrzewania DC w porównaniu z MPA **6**. Najslabsze działanie wykazał związek **49j**, który powodował najwyższy stopień dojrzewania DC. Jednocześnie wszystkie DC wykazywały podobną aktywność w ilości 0,5:1. Na uwagę zasługuje fakt, że DC traktowane każdym z trzech związków w proporcjach DC:limfocytów zbliżonych do fizjologii czyli 0,25:1 i 0,125:1 stymulowały proliferację limfocytów w mniejszym stopniu niż MPA, ale także mniejszym niż niedojrzałe DC (K – bez LPS). Jest to niewątpliwie zaleta uzyskanych związków, która w przypadku zastosowania ich w leczeniu prowadziłaby do sprawniejszego hamowania reakcji odrzucania mediowanego przez limfocyty w porównaniu do samego MPA. Dla porównania umieszczone zostały również wyniki dla limfocytów aktywowanych monoklonalnymi przeciwciałami anti-CD3/anti-CD-28. Proliferacja aktywowanych limfocytów dochodziła do wartości 15000 w stosunku 2:1 i stopniowo malała dla kolejnych wartości (1:1, 0,5:1, 0,25:1, 0,125:1). Wartości te były znacznie wyższe niż dla limfocytów traktowanych DC.

### 3.2.8. Oznaczenie szybkości zużywania związków przez komórki Jurkat na przykładzie związku 50e z wykorzystaniem chromatografii HPLC

W celu określenia szybkości zużywania związków przez komórki w trakcie hodowli postanowiliśmy wykonać test HPLC. Komórki Jurkat inkubowałam przez 10 dni z dodatkiem badanego związku **50e** o stężeniu  $EC_{50}$  wyznaczonym podczas wcześniejszych testów. Następnie każdego dnia pobierana była próbka do testu HPLC. Do badanego dołka dodawałam wody. Tak przygotowany roztwór pobierałam do próbówki i odwirowywałam. Następnie zbierałam nadsącz i przechowywałam w zamrażalniku do zakończenia testu.

Jako wynik otrzymałam pola powierzchni badanego piku. Pole piku otrzymanego pierwszego dnia oznaczałam jako 100% związku.



**Wykres 16.** Zawartość związku **50e** w czasie 10-cio dniowej inkubacji.

Jak możemy zauważyć na wykresie 16 już 4-tego dnia w dołku znajduje się zaledwie 50% związku. W związku z powyższym w trakcie inkubacji komórek przez okres dłuższy niż 5 dni należy dodać ponownie związku podczas pasażowania hodowli.

Dodatkowo, dzięki badaniu obecności piku pochodzącego od MPA, uzyskaliśmy informację, że badane pochodne aminokwasowe nie ulegają rozłożeniu w pożywce do MPA oraz odpowiedniego aminokwasu. Zawartość czystego MPA była na poziomie 0,02%.

#### 4. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

Temperatury topnienia mierzyłam na aparacie Kohler-block i nie były one korygowane.

Otrzymane związki oczyszczałam na płytkach TLC pokrytych żelem krzemionkowym [silica gel 60; 1.05554.0001 Merck] wykorzystując następujące układy rozwijające:

Eluent <b>A</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (10:1, v/v)
Eluent <b>B</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (20:1, v/v)
Eluent <b>C</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH:CH <sub>3</sub> COOH (10:1:0,1, v/v)

Stosowałam również metodą ekstrakcji do fazy stałej (SPE) z wypełnieniem na bazie żelu krzemionkowego z fazą normalną. Przygotowanie kolumnienki obejmowało:

- kondycjonowanie:
  - 25mL metanolu
  - 25mL dichlorometanu:metanolu (50:50, v/v)
  - 25mL dichlorometanu
- naniesienie próbki, zaabsorbowanie na żelu, po ok. 20 min. „odciągnięcie” rozpuszczalnika za pomocą pompki próżniowej
- nałożenie odpowiednich stężeń rozpuszczalnika (Tabela 8)
- wypłukanie pozostałych zanieczyszczeń MeOH

**Tabela 8.**

Lp.	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> [mL]	MeOH [mL]	Lp.	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> [mL]	MeOH [mL]
<b>1</b>	2	-	<b>10</b>	1.98	0.02
<b>2</b>	2	-	<b>11</b>	1.98	0.02
<b>3</b>	1.99	0.01	<b>12</b>	1.98	0.02
<b>4</b>	1.99	0.01	<b>13</b>	1.98	0.02
<b>5</b>	1.99	0.01	<b>14</b>	1.98	0.02
<b>6</b>	1.99	0.01	<b>15</b>	1.98	0.02
<b>7</b>	1.99	0.01	<b>...</b>	1.98	0.02
<b>8</b>	1.99	0.01	<b>n-1</b>	-	10
<b>9</b>	1.99	0.01	<b>n</b>	-	10

Jako odczynnik wywołujący zastosowałam:

- wywoływacz ninhydrynowy o składzie:
  - 200mg ninhydryny
  - 100mL etanolu
  - 2mL kwasu octowego

Widma  $^1\text{H}$  NMR zostały wykonane w rozpuszczalniku  $\text{CDCl}_3$  w temp. pok. na aparacie Varian Unity 500 Plus w Gdańskim Międzyuczelnianym Laboratorium NMR.

*Parametry widm:*

- częstotliwość: 500 MHz
- szerokość okna spektralnego: 8000 Hz
- czas akwizycji: 1.9 s
- odstęp na relaksację: 30 s
- liczba akumulacji: 120
- macierz transformacji: 32 k

Widma masowe zostały wykonane w Pracowni Spektrometrii Mas MALDI-TOF na Uniwersytecie Gdańskim z wykorzystaniem matrycy DHB bądź CCA na aparacie BIFLEX III Bruker.

Widma  $^{13}\text{C}$  NMR zostały wykonane w rozpuszczalniku  $\text{CDCl}_3$  w temp. pok. na aparacie Varian Unity 500 Plus w Gdańskim Międzyuczelnianym Laboratorium NMR.

Oznaczenia skręcalności optycznej wykonałam za pomocą polarymetru Autopol<sup>®</sup> II, model: APII-6W-10 w Katedrze Chemii Organicznej Politechniki Gdańskiej.

Pomiary spektrofotometryczne wykonane zostały za pomocą spektrofotometru PerkinElmer 2030Multilabel Reader Victor<sup>TM</sup>X4 w Zakładzie Immunologii Klinicznej i Transplantologii.

Oznaczenia HPLC-MS/MS wykonywane były na aparacie Agilent 1290 Infinity LC with an Agilent 6540 Accurate Mass Q-TOF LC/MS System w Katedrze Chemii Analitycznej Politechniki Gdańskiej.

Pomiary scyntylicyjne zostały wykonane za pomocą czytnika scyntylicyjnego fazy płynnej LSC-Beckman w Katedrze i Zakładzie Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w czasie 2min/próba.

Wartości  $\text{EC}_{50}$  oraz  $\text{IC}_{50}$  wyznaczane były za pomocą programu SigmaPlot 11.

Wartości p i F wyznaczane były z wykorzystaniem programu STATISTICA 10.0.

Wszystkie reakcje otrzymywania wiązania amidowego wykonywałam w obecności gazu obojętnego jakim był azot lub stosowałam rurkę z CaCl<sub>2</sub>.

#### **4.1. Materiały stosowane podczas syntezy analogów MPA**

<b>Odczynniki stosowane w pracy</b>	
<b>Nazwa</b>	<b>Firma</b>
<b>chronione aminokwasy</b>	Sigma-Aldrich
<b>chronione aminokwasy</b>	BachemAG
<b>DMAP</b>	Sigma-Aldrich
<b>DMF</b>	Sigma-Aldrich
<b>EDCI</b>	Sigma-Aldrich
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	POCH
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	POCH
<b>Płytki TLC</b>	Merck
<b>Kolumnienki SPE CHROMABOND<sup>®</sup> C<sub>18</sub>, 15ml/2000mg</b>	POCH
<b>LiOH·H<sub>2</sub>O</b>	POCH
<b>MeOH</b>	POCH
<b>Octan etylu</b>	POCH
<b>Aceton</b>	POCH

## **4.2. Synteza pochodnych aminokwasowych MPA w postaci estrów**

W celu wyboru odpowiedniej metody do tworzenia wiązania amidowego stosowałam różne odczynniki kondensujące i na tej podstawie wybrałam taką, która dała produkt o najlepszej wydajności i czystości.

### **4.2.1. Chloromrówczan izobutyli i NMM (metoda mieszanych bezwodników)**

0,05g (0,156mmola) MPA rozpuściłam w 1mL bezwodnego DMF i chłodziłam do -15°C. Następnie dodałam 0,017mL (0,156mmola) NMM i 0,020mL (0,156mmola) chloromrówczanu izobutyli. Po 15 minutach dodałam wcześniej ochłodzonego roztworu 0,022g (0,156mmola) HClxD-Ala-OCH<sub>3</sub> i 0,017mL (0,156mmola) NMM w 1,5mL DMF. Całość mieszałam przez 4h w temperaturze -15°C, następnie w temp. pok. do dnia następnego. Postęp reakcji kontrolowałam za pomocą chromatografii TLC w układzie A.

W wyniku reakcji otrzymałam mieszaninę produktów. W celu otrzymania czystego związku stosowałam chromatografię TLC w układzie A. Otrzymałam produkt w postaci oleju z wyd. 7%

### **4.2.2. DPPA/TEA**

Do mieszaniny 0,05g (0,156mmola) MPA i 0,034g (0,234mmola) HClxD-Ala-OCH<sub>3</sub> w 1mL DMF dodałam 0,034ml (0,156mmola) DPPA w 1mL DMF w 0°C. Następnie dodałam 0,044mL (0,312 mmola) TEA w 1 mL DMF w 0°C w czasie 5-10 min. Temperaturę 0°C utrzymywałam przez 3h, a następnie pozostawiałam w temp. pok. przez 48 h. Postęp reakcji kontrolowałam za pomocą chromatografii TLC w układzie A.

W wyniku reakcji otrzymałam mieszaninę produktów. W celu oczyszczenia związku stosowałam chromatografię TLC w układzie A. Otrzymałam produkt w postaci oleju z wyd. 5%.

#### **4.2.3. EEDQ/Py**

Do schłodzonego do  $-10^{\circ}\text{C}$  roztworu 0,05g (0,156mmola) MPA w 1mL DMF dodałam 0,077g (0,3125mmola) EEDQ i 0,034g (0,3125mmola) HClxD-Ala-OCH<sub>3</sub> oraz 0,2mL pirydyny. Całość mieszałam 5h w  $-10^{\circ}\text{C}$ , a później w temp. pok. przez 3 dni. Reakcję kontrolowałam z wykorzystaniem chromatografii TLC w układzie A.

Otrzymałam produkt w postaci oleju. W związku z otrzymaniem mieszaniny związków o bardzo zbliżonym  $R_f$  nie byłam w stanie wydzielić czystego produktu i określić wydajności reakcji.

#### **4.2.4. HBTU/NMM**

0,05g (0,156mmola) MPA i 0,022g (0,156mmola) HClxD-Ala-OCH<sub>3</sub> rozpuściłam w 1mL DMF. Dodałam 0,017mL (0,156mmola) NMM i ochłodziłam do  $0^{\circ}\text{C}$ . Następnie dodałam 0,059g (0,156mmola) HBTU. Całość mieszałam 1h w temperaturze  $0^{\circ}\text{C}$ , a później w temp. pok. do dnia następnego. Postęp reakcji kontrolowałam za pomocą chromatografii TLC w układzie A.

W wyniku reakcji otrzymałam mieszaninę produktów, którą oczyszczałam na płytkach TLC w układzie A. Otrzymałam produkt w postaci oleju z wyd. 8%.

#### **4.2.5. TBTU/HOBt**

Do 0,022g (0,156mmola) HClxD-Ala-OCH<sub>3</sub> rozpuszczonego w 1mL DMF dodałam 0,027mL (0,156mmola) DIPEA oraz 0,017g (0,1245mmola) HOBt. Do tak otrzymanego roztworu dodałam ochłodzonego 0,05g (0,156mmola) MPA i 0,050g (0,156mmola) TBTU. Całość mieszałam 48h w temp. pok. Postęp reakcji kontrolowałam za pomocą TLC w układzie A.

W wyniku reakcji otrzymałam mieszaninę produktów, którą oczyszczałam na płytkach TLC w układzie A. Otrzymałam produkt w postaci oleju z wyd. 10%.

#### **4.2.6. BOP/HOBt**

Do 0,022g (0,156mmola) HClxD-Ala-OCH<sub>3</sub> rozpuszczonego w 1mL DMF dodałam 0,027mL (0,156mmola) DIPEA i 0,017g (0,12455mmola). Roztwór ochłodziłam do  $0^{\circ}\text{C}$

i dodałam 0,05g (0,156mmola) MPA rozpuszczony w 1mL DMF. Całość mieszałam przez 20 minut w 0°C. Po tym czasie dodałam 0,069g (0,156mmola) BOP. Reakcję prowadziłam przez 4 dni w temp. pok. Postęp reakcji kontrolowałam za pomocą chromatografii TLC w układzie A.

W wyniku reakcji otrzymałam mieszaninę produktów trudną do oczyszczenia. Surowy produkt oczyszczałam za pomocą TLC w układzie A. Otrzymałam produkt w postaci oleju z wyd. 15%.

#### **4.2.7. DCC/NMM**

0,05g (0,156mmola) MPA i 0,022g (0,156mmola) HClxD-Ala-OCH<sub>3</sub> rozpuściłam w 1mL DMF i dodałam 0,017mL (0,156mmola) NMM. Po ochłodzeniu do 0°C dodałam 0,031g (0,1525mmola) DCC. Całość mieszałam 1h w 0°C, a później w temp. pok. przez 48h. Postęp reakcji kontrolowałam za pomocą TLC w układzie A.

W wyniku reakcji otrzymałam mieszaninę produktów, którą oczyszczałam na płytkach TLC w układzie A. Otrzymałam produkt w postaci oleju z wyd. 8%.

#### **4.2.8. CCMT/DMAP**

0,05g (0,156mmola) MPA i 0,022g (0,156mmola) HClxD-Ala-OCH<sub>3</sub> rozpuściłam w 1mL DMF i dodałam 0,019g (0,156mmola) DMAP. Po ochłodzeniu do 0°C dodałam 0,066g (0,1525mmola) CCMT. Całość mieszałam 1h w 0°C, a później w temp. pok. przez kilka dni. Postęp reakcji kontrolowałam za pomocą TLC w układzie A.

Surowy produkt oczyszczałam na płytkach TLC w układzie A. W wyniku reakcji otrzymałam produkt z wyd. 25%.

#### **4.2.9. EDCI/DMAP**

0,04g (0,125mmola) MPA, 0,178mmola odpowiedniego estru aminokwasu (wymienione w pkt. 3.1.1) i 0,022g (0,178mmola) DMAP rozpuściłam w 1,5ml bezwodnego DMF. Mieszaninę ochłodziłam do 0°C. Następnie dodałam 0,033g (0,170mmola) EDCI. Całość mieszałam przez 2h w 0°C, a później w temp. pok. przez 48h. Postęp reakcji kontrolowałam za pomocą płytek TLC w odpowiednim układzie (A, B lub C).



#### 4.2.9.1. Synteza estru metylowego *N*-mykofenoilo-*D*-alaniny 49a

Związek otrzymałam zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.2.9 z wydajnością 77% jako biały, krystaliczny produkt.

Rozdział na płytce TLC: eluent B,  $R_f = 0,56$ .

Charakterystyka produktu **49a**:

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  ppm: 1,34 (d, 3H,  $J = 7,3$  Hz); 1,81 (s, 3H); 2,15 (s, 3H); 2,31 (s, 4H); 3,39 (d, 2H,  $J = 7,3$  Hz); 3,74 (s, 3H); 3,76 (s, 3H); 4,55-4,58 (m, 1H); 5,20 (s, 2H); 5,26 (t, 1H,  $J = 6,8$  Hz); 6,02 (s, 1H); 7,67 (s, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$  ppm: 173,85; 173,15; 172,39; 163,90; 153,84; 144,26; 134,65; 123,10; 122,33; 116,98; 106,60; 70,27; 61,24; 52,68; 48,10; 35,27; 35,22; 22,83; 18,70; 16,39; 11,79.

**MS (DHB)**  $m/z$  obliczone dla  $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{O}_7\text{N}$  405,4416; znalezione 406,2 ( $\text{M}^+$ ).

**HPLC-MS/MS** znalezione  $m/z$  404,1726 ( $\text{M} - \text{H}$ ) $^+$ .

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -4^\circ\text{C}$  ( $c = 1$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

**Temp. top.** 135-137°C.

#### 4.2.9.2. Synteza estru metylowego *N*-mykofenoilo-*L*-alaniny 49b

Związek otrzymałam zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.2.9 z wydajnością 75% jako biały, krystaliczny produkt.

Rozdział na płytce TLC: eluent B,  $R_f = 0,58$ .

Charakterystyka produktu **49b**:

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  ppm: 1,34 (d, 3H,  $J = 7,3$  Hz); 1,81 (s, 3H); 2,15 (s, 3H); 2,32 (s, 4H); 3,39 (d, 2H,  $J = 6,8$  Hz); 3,74 (s, 3H); 3,77 (s, 3H); 4,55-4,58 (m, 1H); 5,205 (s, 2H); 5,27 (t, 1H,  $J = 6,8$  Hz); 6,02 (s, 1H); 7,675 (s, 1H).

## Część eksperymentalna

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)** δ ppm: 173,58; 172,88; 172,05; 163,66; 153,62; 143,99; 134,40; 122,86; 122,08; 116,71; 106,36; 70,01; 60,98; 52,40; 47,85; 35,40; 35,40; 22,59; 18,48; 16,15; 11,54.

**MS (DHB)** m/z obliczone dla C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>O<sub>7</sub>N 405,4416; znalezione 406,3 (M<sup>+</sup>).

**HPLC-MS/MS** znalezione m/z 404,17264 (M - H)<sup>+</sup>.

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +4°C (c = 1, CHCl<sub>3</sub>).

**Temp. top.** 138-142°C.

### 4.2.9.3. Synteza estru metylowego *N*-mykofenoioglicyny 49c

Związek otrzymałam zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.2.9 z wydajnością 86% jako biały, krystaliczny produkt.

Rozdział na płycie TLC: eluent A, R<sub>f</sub> = 0,6.

Charakterystyka produktu **49c**:

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)** δ ppm: 1,82 (s, 3H); 2,15 (s, 3H); 2,34 (s, 4H); 3,40 (d, 2H, J = 6,8 Hz); 3,75 (s, 3H); 3,77 (s, 3H); 3,98 (d, 2H, J = 5,4 Hz); 5,205 (s, 2H); 5,27 (t, 1H, J = 6,8 Hz); 5,98 (s, 1H); 7,68 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)** δ ppm: 173,26; 173,26; 170,94; 164,14; 154,09; 144,52; 134,87; 123,55; 122,57; 117,24; 106,87; 70,51; 61,48; 52,78; 41,61; 35,53; 35,28; 23,09; 16,58; 12,02.

**MS (DHB)** m/z obliczone dla C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>O<sub>7</sub>N 391,4150; znalezione 392,1 (M<sup>+</sup>).

**HPLC-MS/MS** znalezione m/z 390,1585 (M - H)<sup>+</sup>.

**Temp. top.** 130-133°C.

#### 4.2.9.4. Synteza diestru metylowego kwasu *N*-mykofenoilo-*L*-glutaminowego 49d

Związek otrzymałam zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.2.9 z wydajnością 68% jako biały, krystaliczny produkt.

Rozdział na płytce TLC: eluent A,  $R_f = 0,72$ .

Charakterystyka produktu **49d**:

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  ppm: 1,80 (s, 3H); 1,9-1,97 (m, 2H); 2,14 (s, 3H); 2,27-2,35 (m, 4H); 2,36-2,42 (m, 2H); 3,38-3,39 (d, 2H,  $J = 6,8$  Hz); 3,66 (s, 3H); 3,73 (s, 3H); 3,76 (s, 3H); 4,6e-4,61 (m, 1H); 5,19 (s, 2H); 5,24-5,26 (t, 1H,  $J = 6,3$  Hz); 6,27 (d, 1H,  $J = 7,3$  Hz).

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$  ppm: 173,54; 173,14; 173,02; 172,61; 163,88; 153,83; 144,30; 134,55; 123,16; 122,28; 116,99; 106,61; 70,28; 61,24; 52,77; 52,10; 51,74; 35,23; 35,13; 30,20; 27,55; 22,82; 16,37; 11,80.

**MS (DHB)**  $m/z$  obliczone dla  $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{O}_9\text{N}$  477,5042; znalezione 478,1 ( $\text{M}^+$ ).

**HPLC-MS/MS** znalezione  $m/z$  476,1956 ( $\text{M} - \text{H}$ ) $^+$ .

$[\alpha]_D^{25} = 12^\circ\text{C}$  ( $c = 1$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

**Temp. top.** 76-79°C.

#### 4.2.9.5. Synteza diestru metylowego kwasu *N*-mykofenoilo-*D*-glutaminowego 49e

Związek otrzymałam zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.2.9 z wydajnością 63% jako biały, krystaliczny produkt.

Rozdział na płytce TLC: eluent A,  $R_f = 0,7$ .

Charakterystyka produktu **49e**:

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  ppm: 1,81 (s, 3H); 1,9-1,98 (m, 2H); 2,15 (s, 3H); 2,27e2,35 (m, 4H); 2,36-2,42 (m, 2H); 3,38-3,395 (d, 2H,  $J = 6,8$  Hz); 3,67 (s, 3H); 3,73 (s, 3H); 3,76 (s, 3H); 4,6-4,60 (m, 1H); 5,20 (s, 2H); 5,25e5,27 (t, 1H,  $J = 6,8$  Hz); 6,27 (d, 1H,  $J = 7,8$  Hz).

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)** δ ppm: 173,51; 173,13; 172,80; 172,63; 163,89; 153,85; 144,28; 134,59; 123,13; 122,29; 116,97; 106,62; 70,27; 61,24; 52,74; 52,07; 51,72; 35,23; 35,17; 30,21; 27,60; 22,83; 16,39; 11,79.

**MS (DHB)** m/z obliczone dla C<sub>24</sub>H<sub>31</sub>O<sub>9</sub>N 477,5042; znalezione 477,9 (M<sup>+</sup>).

**HPLC-MS/MS** znalezione m/z 476,1964 (M - H)<sup>+</sup>.

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -12°C (c = 1, CHCl<sub>3</sub>).

**Temp. top.** 75-78°C.

#### 4.2.9.6. Synteza estru metylowego *N*-mykofenoilo-*L*-waliny **49f**

Związek otrzymałam zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.2.9 z wydajnością 54% % jako biały, krystaliczny produkt.

Rozdział na płycie TLC: eluent A, R<sub>f</sub> = 0,87.

Charakterystyka produktu **49f**:

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)** δ ppm: 0,86 (dd, 6H, J = 6,8 Hz); 1,82 (s, 3H); 2,08-2,12 (m, 1H); 2,15 (s, 3H); 2,30-2,36 (m, 4H); 3,39 (d, 2H, J = 6,8 Hz); 3,72 (s, 3H); 3,76 (s, 3H); 4,53-4,56 (m, 1H); 5,20 (s, 2H); 5,27 (t, 1H, J = 6,8 Hz); 5,95 (d, 1H, J = 8,8 Hz); 7,67 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)** δ ppm: 172,88; 172,59; 172,46; 163,68; 153,63; 144,00; 134,42; 122,77; 122,06; 116,70; 106,36; 70,00; 60,97; 56,83; 52,07; 35,06; 35,06; 31,27; 22,59; 18,84; 17,75; 16,14; 11,53.

**MS (DHB)** m/z obliczone dla C<sub>23</sub>H<sub>31</sub>O<sub>7</sub>N 433,4947; znalezione 434,3 (M<sup>+</sup>).

**HPLC-MS/MS** znalezione m/z 432,2038 (M - H)<sup>+</sup>.

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +10°C (c = 1, CHCl<sub>3</sub>).

**Temp. top.** 135-138°C.

#### 4.2.9.7. Synteza estru metylowego *N*-mykofenoilo-*D*-waliny 49g

Związek otrzymałam zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.2.9 z wydajnością 55% jako biały, krystaliczny produkt.

Rozdział na płytce TLC: eluent A,  $R_f = 0,86$ .

Charakterystyka produktu 49g:

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  ppm: 0,86 (dd, 6H,  $J = 6,8$  Hz); 1,81 (s, 3H); 2,07-2,11 (m, 1H); 2,14 (s, 3H); 2,30-2,35 (m, 4H); 3,38 (d, 2H,  $J = 6,8$  Hz); 3,71 (s, 3H); 3,755 (s, 3H); 4,52-4,56 (m, 1H); 5,19 (s, 2H); 5,26 (t, 1H,  $J = 6,8$  Hz); 5,98 (d, 1H,  $J = 8,7$  Hz); 7,665 (s, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$  ppm: 172,86; 172,58; 172,45; 163,62; 153,55; 143,97; 134,39; 122,71; 122,00; 116,69; 106,30; 70,00; 60,95; 56,77; 52,06; 35,06; 34,99; 31,23; 22,54; 18,82; 17,71; 16,11; 11,52.

**MS (DHB)** m/z obliczone dla  $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{O}_7\text{N}$  433,9497; znalezione 434,1 ( $\text{M}^+$ ).

**HPLC-MS/MS** znalezione m/z 432,2038 ( $\text{M} - \text{H}^+$ ).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +10^\circ\text{C}$  ( $c = 1$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

**Temp. top.** 136-139°C.

#### 4.2.9.8. Synteza estru metylowego *N*-mykofenoilo-*L*-leucyny 49h

Związek otrzymałam zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.2.9 z wydajnością 71% jako biały, krystaliczny produkt.

Rozdział na płytce TLC: eluent B,  $R_f = 0,68$ .

Charakterystyka produktu 49h:

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  ppm: 0,90 (dd, 6H,  $J = 4,4$  Hz); 1,44-1,48 (m, 2H); 1,56-1,62 (m, 1H), 1,80 (s, 3H); 2,14 (s, 3H); 2,31 (s, 3H); 3,38 (d, 2H,  $J = 6,8$  Hz); 3,71 (s, 3H); 3,76 (s, 3H); 4,59-4,63 (m, 1H); 5,19 (s, 2H); 5,25 (t, 1H,  $J = 6,8$  Hz); 5,89 (d, 1H,  $J = 9,3$  Hz); 7,67 (s, 1H).

**$^{13}\text{C}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)**  $\delta$  ppm: 173,89; 173,14; 172,66; 163,90; 153,85; 144,26; 134,74; 123,02; 122,30; 116,98; 106,61; 70,27; 61,25; 52,49; 50,74; 41,94; 35,28; 35,19; 25,07; 23,00; 22,84; 22,17; 16,37; 11,80.

**MS (DHB)** m/z obliczone dla C<sub>24</sub>H<sub>33</sub>O<sub>7</sub>N 447,5213; znalezione 448,0 (M<sup>+</sup>).

**HPLC-MS/MS** znalezione m/z 446,2193 (M - H)<sup>+</sup>.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +2^{\circ}\text{C}$  (c = 1, CHCl<sub>3</sub>).

**Temp. top.** 101-104°C.

#### 4.2.9.9. Synteza estru metylowego *N*-mykofenoilo-*D*-leucyny 49i

Związek otrzymałam zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.2.9 z wydajnością 81% jako biały, krystaliczny produkt.

Rozdział na płycie TLC: eluent B, R<sub>f</sub> = 0,69.

Charakterystyka produktu **49i**:

**$^1\text{H}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)**  $\delta$  ppm: 0,90 (dd, 6H, J = 4,4 Hz); 1,44-1,50 (m, 2H); 1,56-1,63 (m, 1H), 1,80 (s, 3H); 2,14 (s, 3H); 2,31 (s, 3H); 3,38 (d, 2H, J = 6,8 Hz); 3,71 (s, 3H); 3,76 (s, 3H); 4,59-4,63 (m, 1H); 5,19 (s, 2H); 5,25 (t, 1H, J = 6,8 Hz); 5,89 (d, 1H, J = 9,3 Hz); 7,67 (s, br s, 1H).

**$^{13}\text{C}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)**  $\delta$  ppm: 173,90; 173,14; 172,64; 163,90; 153,85; 144,26; 134,75; 123,02; 122,30; 116,98; 106,61; 70,27; 61,25; 52,49; 50,74; 41,94; 35,28; 35,20; 25,08; 23,00; 22,84; 22,17; 16,37; 11,80.

**MS (DHB)** m/z obliczone dla C<sub>24</sub>H<sub>33</sub>O<sub>7</sub>N 447,5213; znalezione 448,0 (M<sup>+</sup>).

**HPLC-MS/MS** znalezione m/z 446,2219 (M - H)<sup>+</sup>.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -2^{\circ}\text{C}$  (c = 1, CHCl<sub>3</sub>).

**Temp. top.** 100-104°C.

#### 4.2.9.10. Synteza estru metylowego *N*-mykofenoilo-*L*-fenyloalaniny 49j

Związek otrzymałam zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.2.9 z wydajnością 64% jako biały, krystaliczny produkt.

Rozdział na płytce TLC: eluent B,  $R_f = 0,82$ .

Charakterystyka produktu 49j:

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  ppm: 1,79 (s, 3H); 2,13 (s, 3H); 2,28 (s, 4H); 2,98-3,07 (m, 2H); 3,37 (d, 2H,  $J = 7,3$  Hz); 3,69 (s, 3H); 3,75 (s, 3H); 4,82-4,86 (m, 1H); 5,14 (s, 2H); 5,24 (t, 1H,  $J = 6,8$  Hz); 5,94 (d, 1H,  $J = 7,3$  Hz); 7,04-7,23 (m, 5H, aromat); 7,67 (s, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$  ppm: 173,14; 172,40; 172,30; 163,88, 153,83; 144,29; 136,11; 134,60; 129,43; 128,77; 127,33; 123,07; 122,27; 116,97; 106,61; 70,26; 61,24; 53,23; 52,52; 38,16; 35,23; 35,11; 22,83; 16,37; 11,80.

**MS (DHB)**  $m/z$  obliczone dla  $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{O}_7\text{N}$  481,5375; znalezione 482,2 ( $\text{M}^+$ ).

**HPLC-MS/MS** znalezione  $m/z$  480,2043 ( $\text{M} - \text{H}$ ) $^+$ .

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +20^\circ\text{C}$  ( $c = 2$ , MeOH).

**Temp. top.** 87-91°C.

#### 4.2.9.11. Synteza estru metylowego *N*-mykofenoilo-*D*-fenyloalaniny 49k

Związek otrzymałam zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.2.9 z wydajnością 69% jako biały, krystaliczny produkt.

Rozdział na płytce TLC: eluent B,  $R_f = 0,80$ .

Charakterystyka produktu 49k:

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  ppm: 1,79 (s, 3H); 2,13 (s, 3H); 2,28 (s, 4H); 2,98-3,07 (m, 2H); 3,37 (d, 2H,  $J = 7,3$  Hz); 3,69 (s, 3H); 3,75 (s, 3H); 4,82-4,86 (m, 1H); 5,14 (s, 2H); 5,24 (t, 1H,  $J = 6,8$  Hz); 5,94 (d, 1H,  $J = 7,3$  Hz); 7,04-7,28 (m, 5H, aromat); 7,67 (s, 1H).

*Część eksperymentalna*

**$^{13}\text{C}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)**  $\delta$  ppm: 173,14; 172,38; 172,29; 163,88; 153,83; 144,30; 136,12; 134,60; 129,43; 128,77; 127,32; 123,07; 122,27; 116,97; 106,61; 70,25; 61,24; 53,24; 52,52; 38,16; 35,23; 35,10; 22,83; 16,37; 11,79.

**MS (DHB)** m/z obliczone dla C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>O<sub>7</sub>N 481,5375; znalezienie 482,2 (M<sup>+</sup>).

**HPLC-MS/MS** znalezienie m/z 480,2026 (M - H)<sup>+</sup>.

**$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$**  = -20°C (c = 2, MeOH).

**Temp. top.** 87-91°C.



### 4.3. Aminokwasowe analogi MPA z wolną grupą karboksylową

0,1 mmola odpowiedniego estru **49a-k** rozpuszczałam w 1 ml metanolu, a następnie dodawałam 0,3 mmola monohydratu LiOH w 1 ml wody (3 eq.), po czym całość mieszałam w temperaturze pokojowej. Przebieg reakcji badałam za pomocą chromatografii TLC (Eluent D). Po zakończonej reakcji mieszaninę reakcyjną zakwaszałam 2N HCl i ekstrahowałam octanem etylu. Po wysuszeniu warstwy organicznej za pomocą bezwodnego siarczanu magnezu rozpuszczalnik oddestylowałam na wyparce rotacyjnej. Jeżeli pozostałość była oleista, dodawałam bezwodnego eteru w celu wytrącenia osadu. Po odsączeniu otrzymałam czysty produkt **50a-k**.

#### 4.3.1. Synteza *N*-mykofenoilo-D-alaniny **50a**

Związek otrzymałam zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.3 z wydajnością 62% jako biały, krystaliczny produkt.

Rozdział na płytce TLC: eluent C,  $R_f = 0,73$ .

Charakterystyka produktu **50a**:

**$^1\text{H}$  NMR (acetone- $d_6$ , 500 MHz)**  $\delta$  ppm: 1,31 (d, 3H,  $J = 7,3$  Hz); 1,81 (s, 3H); 2,05-2,07 (m, 3H); 2,26-2,32 (m, 2H); 3,39 (d, 2H,  $J = 6,8$  Hz); 3,795 (s, 3H); 4,38-4,41 (m, 1H); 5,27 (t, 1H,  $J = 6,8$  Hz); 5,32 (s, 2H); 7,28 (d, 1H,  $J = 6,8$  Hz).

**$^{13}\text{C}$  NMR (acetone- $d_6$ , DMSO, 125 MHz)**  $\delta$  ppm: 174,13; 172,84; 172,68, 164,21; 153,86; 145,61; 135,02; 123,43; 122,51; 117,52; 106,83; 70,48; 61,30; 48,25; 35,87; 35,14; 23,10; 17,89; 16,32; 11,51.

**MS (DHB)** m/z obliczone dla  $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{O}_7\text{N}$  391,4150; znalezione 320,0 ( $\text{M}^+$ ).

**HPLC-MS/MS** znalezione m/z 390,1617 ( $\text{M} - \text{H}$ )<sup>+</sup>.

$[\alpha]_D^{25} = +2^\circ\text{C}$  ( $c = 1$ , aceton).

**Temp. top.** 113-116°C.

#### 4.3.2. Synteza *N*-mykofenoilo-*L*-alaniny 50b

Związek otrzymałam zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.3 z wydajnością 60% jako biały, krystaliczny produkt.

Rozdział na płytce TLC: eluent C,  $R_f = 0,74$ .

Charakterystyka produktu **50b**:

**$^1\text{H}$  NMR (acetone- $d_6$ , 500 MHz)**  $\delta$  ppm: 1,31 (d, 3H,  $J = 7,3$  Hz); 1,81 (s, 3H); 2,05-2,07 (m, 3H); 2,26-2,31 (m, 2H); 3,39 (d, 2H,  $J = 6,8$  Hz); 3,795 (s, 3H); 4,38-4,41 (m, 1H); 5,27 (t, 1H,  $J = 6,8$  Hz); 5,315 (s, 2H); 7,27 (d, 1H,  $J = 6,8$  Hz).

**$^{13}\text{C}$  NMR (acetone- $d_6$ , 125 MHz)**  $\delta$  ppm: 173,62; 172,24; 172,18, 163,69; 153,34; 145,35; 134,61; 123,23; 122,17; 117,06; 106,58; 69,91; 60,74; 47,78; 35,34; 34,54; 22,56; 17,23; 15,65; 10,80.

**MS (DHB)**  $m/z$  obliczone dla  $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{O}_7\text{N}$  391,4150; znalezione 391,9 ( $\text{M}^+$ ).

**HPLC-MS/MS** znalezione  $m/z$  390,1558 ( $\text{M} - \text{H}$ )<sup>+</sup>.

$[\alpha]_D^{25} = -2^\circ\text{C}$  ( $c = 1$ , acetone).

**Temp. top.** 114-117°C.

#### 4.3.3. Synteza *N*-mykofenoiloglicyny 50c

Związek otrzymałam zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.3 z wydajnością 68% jako biały, krystaliczny produkt.

Rozdział na płytce TLC: eluent C,  $R_f = 0,67$ .

Charakterystyka produktu **50c**:

**$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)**  $\delta$  ppm: 1,83 (s, 3H); 2,15 (s, 1H); 2,28-2,34 (m, 3H); 3,31 (s, 3H); 3,39 (d, 2H,  $J = 6,8$  Hz); 3,795 (s, 3H); 5,25 (s, 2H); 5,27 (t, 1H,  $J = 6,8$  Hz).

**$^{13}\text{C}$  NMR (acetone- $d_6$ , 125 MHz)**  $\delta$  ppm: 172,58; 172,20; 170,81; 163,67; 153,40; 145,37; 134,62; 122,98; 122,11; 117,05; 106,64; 69,88; 60,74; 40,66; 35,40; 34,60; 22,57; 15,62; 10,80.

**MS (DHB)** m/z obliczone dla C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>O<sub>7</sub>N 377,3884; znalezione 378,1 (M<sup>+</sup>).

**HPLC-MS/MS** znalezione m/z 378,1511 (M + H)<sup>+</sup>.

**Temp. top.** 114-118°C.

#### **4.3.4. Synteza kwasu *N*-mykofenoilo-*L*-glutaminowego 50d**

Związek otrzymałam zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.3 z wydajnością 70% jako biały, krystaliczny produkt.

Rozdział na płytce TLC: eluent C, R<sub>f</sub> = 0,68.

Charakterystyka produktu **50d**:

**<sup>1</sup>H NMR (acetone-d<sub>6</sub>, 500 MHz)** δ ppm: 1,82 (s, 3H); 1,89-1,95 (m, 2H); 1,97 (s, 1H); 2,06 (s, 1H); 2,17 (s, 3H); 2,19-2,46 (m, 6H, nałożenie multipletów); 3,40 (d, 2H, J = 6,8 Hz); 3,79 (s, 3H); 4,47-4,52 (m, 1H); 5,27-5,30 (t, 1H, J = 6,3 Hz); 5,30 (s, 3H); 7,34 (d, 1H, J = 7,3 Hz).

**<sup>13</sup>C NMR (acetone-d<sub>6</sub>, 125 MHz)** δ ppm: 173,420; 172,70; 172,61; 172,22; 163,66; 153,40; 145,36; 134,60; 122,91; 122,07; 117,06; 106,64; 69,89; 60,76; 51,54; 51,45; 35,35; 34,63; 27,17; 22,56; 15,68; 10,82.

**MS (DHB)** m/z obliczone dla C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>O<sub>9</sub>N 449,4511; znalezione 450,1 (M<sup>+</sup>).

**HPLC-MS/MS** znalezione m/z 448,1653 (M - H)<sup>+</sup>.

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -4°C (c = 1, aceton).

**Temp. top.** 109-113°C.

#### 4.3.5. Synteza kwasu *N*-mykofenoilo-*D*-glutaminowego 50e

Związek otrzymałam zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.3 z wydajnością 65% jako biały, krystaliczny produkt.

Rozdział na płytce TLC: eluent C,  $R_f = 0,66$ .

Charakterystyka produktu **50e**:

**$^1\text{H}$  NMR (aceton- $d_6$ , 500 MHz)**  $\delta$  ppm: 1,82 (s, 3H); 1,89-1,95 (m, 2H); 1,97 (s, 1H); 2,06 (s, 1H); 2,17 (s, 3H); 2,19-2,46 (m, 6H, nałożenie multipletów); 3,40 (d, 2H,  $J = 6,8$  Hz); 3,79 (s, 3H); 4,47-4,52 (m, 1H); 5,27-5,30 (t, 1H,  $J = 6,3$  Hz); 5,30 (s, 3H); 7,34 (d, 1H,  $J = 7,3$  Hz).

**$^{13}\text{C}$  NMR (aceton- $d_6$  + DMSO, 125 MHz)**  $\delta$  ppm: 174,50; 173,76; 173,69; 173,38; 164,72; 154,41; 146,19; 135,55; 123,95; 123,05; 118,06; 70,98; 61,83; 52,57; 52,48; 36,37; 35,68; 28,15; 23,61; 20,99; 16,82; 11,98.

**MS (DHB)**  $m/z$  obliczone dla  $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{O}_9\text{N}$  449,4511; znalezione 450,1 ( $\text{M}^+$ ).

**HPLC-MS/MS** znalezione  $m/z$  448,1659 ( $\text{M} - \text{H}^+$ ).

$[\alpha]_D^{25} = +4^\circ\text{C}$  ( $c = 1$ , aceton).

**Temp. top.** 107-111°C.

#### 4.3.6. Synteza *N*-mykofenoilo-*L*-waliny 50f

Związek otrzymałam zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.3 z wydajnością 64% jako biały, krystaliczny produkt.

Rozdział na płytce TLC: eluent C,  $R_f = 0,78$ .

Charakterystyka produktu **50f**:

**$^1\text{H}$  NMR (aceton- $d_6$ , 500 MHz)**  $\delta$  ppm: 0,91 (dd, 6H,  $J = 6,8$  Hz); 1,81 (s, 3H); 2,15-2,30 (m, 1H); 2,15 (s, 3H); 2,32-2,38 (m, 4H); 3,39 (d, 2H,  $J = 6,8$  Hz); 3,76 (s, 3H); 4,52e-4,54 (m, 1H); 5,20 (s, 3H); 5,27 (t, 1H,  $J = 6,8$  Hz); 6,23 (d, 1H,  $J = 8,8$  Hz); 7,27 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR (CHCl<sub>3</sub>, 125 MHz)** δ ppm: 175,51; 173,68; 173,22; 163,90; 153,86; 144,35; 134,47; 123,32; 122,29; 117,00; 106,62; 70,32; 61,25; 57,28; 35,29; 35,00; 31,15; 22,86; 19,17; 17,88; 16,33; 11,79.

**MS (DHB)** m/z obliczone dla C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>O<sub>7</sub>N 419,4682; znalezione 420,1 (M<sup>+</sup>).

**HPLC-MS/MS** znalezione m/z 418,4682 (M - H)<sup>+</sup>.

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +2°C (c = 1, aceton).

**Temp. top.** 130-133°C

#### **4.3.7. Synteza *N*-mykofenoilo-*D*-waliny 50g**

Związek otrzymałam zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.3 z wydajnością 62% jako biały, krystaliczny produkt.

Rozdział na płytce TLC: eluent C, R<sub>f</sub> = 0,76.

Charakterystyka produktu **50g**:

**<sup>1</sup>H NMR (aceton-d<sub>6</sub>, 500 MHz)** δ ppm: 0,91 (dd, 6H, J = 6,8 Hz); 1,81 (s, 3H); 2,15-2,30 (m, 1H); 2,15 (s, 3H); 2,32-2,38 (m, 4H); 3,39 (d, 2H, J = 6,8 Hz); 3,76 (s, 3H); 4,52-4,54 (m, 1H); 5,20 (s, 3H); 5,27 (t, 1H, J = 6,8 Hz); 6,23 (d, 1H, J = 8,8 Hz); 7,27 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR (CHCl<sub>3</sub>, 125 MHz)** δ ppm: 177,04; 172,60; 172,22; 163,71; 153,34; 145,34; 134,67; 122,78; 122,03; 117,06; 106,62; 69,92; 60,74; 57,02; 35,46; 34,53; 30,71; 22,56; 18,83; 17,49; 15,70; 10,81.

**MS (DHB)** m/z obliczone dla C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>O<sub>7</sub>N 419,4682; znalezione 420,3 (M<sup>+</sup>).

**HPLC-MS/MS** znalezione m/z 418,1941 (M - H)<sup>+</sup>.

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -2°C (c = 1, aceton).

**Temp. top.** 131-135°C.

#### 4.3.8. Synteza *N*-mykofenoilo-*L*-leucyny 50h

Związek otrzymałam zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.3 z wydajnością 69% jako biały, krystaliczny produkt.

Rozdział na płytce TLC: eluent C,  $R_f = 0,68$ .

Charakterystyka produktu **50h**:

**$^1\text{H}$  NMR (acetone- $d_6$ , 500 MHz)**  $\delta$  ppm: 0,91 (dd, 6H,  $J = 6,8$  Hz); 1,56-1,62 (m, 1H); 1,7e1,74 (m, 2H); 1,82 (s, 3H); 2,17 (s, 3H); 2,28e2,33 (m, 4H); 3,39 (d, 2H,  $J = 6,8$  Hz); 3,79 (s, 3H); 4,46-4,51 (m, 1H); 5,26-5,30 (t, 1H,  $J = 6,8$  Hz); 5,31 (s, 2H); 7,23 (d, 1H,  $J = 6,8$  Hz).

**$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CHCl}_3$ , 125 MHz)**  $\delta$  ppm: 174,29; 172,99; 172,84; 164,40; 154,04; 145,95; 135,36; 123,51; 122,70; 117,74; 107,26; 70,63; 61,46; 51,05; 41,64; 36,13; 35,36; 25,53; 23,36; 23,26; 21,91; 16,38; 11,55.

**MS (DHB)**  $m/z$  obliczone dla  $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{O}_7\text{N}$  433,4947; znalezione 434,3 ( $\text{M}^+$ ).

**HPLC-MS/MS** znalezione  $m/z$  432,2094 ( $\text{M} - \text{H}$ ) $^+$ .

$[\alpha]_D^{25} = +8^\circ\text{C}$  ( $c = 1$ , acetone).

**Temp. top.** 97-99°C.

#### 4.3.9. Synteza *N*-mykofenoilo-*D*-leucyny 50i

Związek otrzymałam zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.3 z wydajnością 68% jako biały, krystaliczny produkt.

Rozdział na płytce TLC: eluent C,  $R_f = 0,70$ .

Charakterystyka produktu **50i**:

**$^1\text{H}$  NMR (acetone- $d_6$ , 500 MHz)**  $\delta$  ppm: 0,91 (dd, 6H,  $J = 6,8$  Hz); 1,56-1,62 (m, 1H); 1,7-1,74 (m, 2H); 1,82 (s, 3H); 2,17 (s, 3H); 2,28-2,33 (m, 4H); 3,39 (d, 2H,  $J = 6,8$  Hz); 3,79 (s, 3H); 4,46-4,51 (m, 1H); 5,26e5,30 (t, 1H,  $J = 6,8$  Hz); 5,31 (s, 2H); 7,24 (d, 1H,  $J = 6,8$  Hz).

**<sup>13</sup>C NMR (acetone-d<sub>6</sub> + CHCl<sub>3</sub>, 125 MHz)** δ ppm: 174,17; 173,00; 172,90; 164,24; 153,90; 145,65; 135,14; 123,36; 122,54; 117,55; 107,07; 70,50; 61,33; 50,89; 41,49; 35,99; 35,24; 25,37; 23,29; 32,12; 21,85; 16,32; 11,51.

**MS (DHB)** m/z obliczone dla C<sub>23</sub>H<sub>31</sub>O<sub>7</sub>N 433,4947; znalezione 434,3 (M<sup>+</sup>).

**HPLC-MS/MS** znalezione m/z 432,2094 (M - H)<sup>+</sup>.

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -8°C (c = 1, acetone).

**Temp. top.** 97-100°C.

#### **4.3.10. Synteza N-mykofenoilo-L-fenylalaniny 50j**

Związek otrzymałam zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.3 z wydajnością 59% jako biały, krystaliczny produkt.

Rozdział na płytce TLC: eluent C, R<sub>f</sub> = 0,70.

Charakterystyka produktu **50i**:

**<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)** δ ppm: 1,77 (s, 3H); 2,11 (s, 3H); 2,15-2,27 (dt, 4H); 2,78-3,09 (dq, 2H); 3,35 (d, 2H, J = 7,3 Hz); 3,74 (s, 3H); 4,57-4,6 (m, 1H); 5,12 (s, 2H); 5,22 (t, 1H, J = 6,8 Hz); 7,15-7,26 (m, 5H, aromat).

**<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)** δ ppm: 174,32; 173,45; 172,61; 163,64; 153,50; 145,45; 137,30; 133,95; 129,07; 128,21; 126,57; 123,23; 122,44; 116,64; 106,51; 69,57; 60,38; 53,78; 37,43; 35,32; 34,30; 22,42; 15,03; 10,21.

**MS (DHB)** m/z obliczone dla C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>O<sub>7</sub>N 467,5110; znalezione 468,3 (M<sup>+</sup>).

**HPLC-MS/MS** znalezione m/z 468,2018 (M - H)<sup>+</sup>.

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +2°C (c = 1, MeOH).

**Temp. top.** 61-65°C.

#### **4.3.11. Synteza *N*-mykofenoilo-*D*-fenyloalaniny 50k**

Związek otrzymałam zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.3 z wydajnością 57% jako biały, krystaliczny produkt.

Rozdział na płytce TLC: eluent C,  $R_f = 0,69$ .

Charakterystyka produktu **50k**:

**$^1\text{H}$  NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)**  $\delta$  ppm: 1,77 (s, 3H); 2,12 (s, 3H); 2,16-2,27 (dt, 4H); 2,78-3,09 (dq, 2H); 3,36 (d, 2H,  $J = 7,3$  Hz); 3,75 (s, 3H); 4,57-4,6 (m, 1H); 5,13 (s, 2H); 5,22 (t, 1H,  $J = 6,8$  Hz); 7,15-7,26 (m, 5H, aromat).

**$^{13}\text{C}$  NMR (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)**  $\delta$  ppm: 174,32; 173,47; 172,62; 163,64, 153,50; 145,44; 137,31; 133,95; 129,07; 128,21; 126,56; 123,23; 122,45; 116,64; 106,51; 69,57; 60,38; 53,79; 37,43; 35,32; 34,30; 22,42; 15,02; 10,20.

**MS (DHB)**  $m/z$  obliczone dla C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>O<sub>7</sub>N 467,5110; znalezione 468,2 (M<sup>+</sup>).

**HPLC-MS/MS** znalezione  $m/z$  468,2013 (M - H)<sup>+</sup>.

$[\alpha]_D^{25} = -2^\circ\text{C}$  (c = 1, MeOH).

**Temp. top.** 63-67°C.



## 4.4. Materiały stosowane w badaniach biologicznych

<b>Odczynniki stosowane w pracy</b>		
<b>Skrót</b>	<b>Charakterystyka/ przeznaczenie</b>	<b>Firma</b>
<b>RPMI-1640</b>	pożywka z L-Glutaminą o pojemności 500mL	IMMUNIQ (producent: PAA)
<b>GMP Serum-free Dendritic Cell Medium (DC)</b>	pożywka dla komórek dendrytycznych o pojemności 500mL	CellGenix
<b>FBS</b>	płatowa surowica wołowa pochodzenia australijskiego o pojemności 500mL	Life Technologies
<b>PBS pH7.4 W/O CAMQ USA PLASTIC</b>	Bufor fosforanowy o pojemności 500mL bez endotoksyny	Life Technologies
<b>P/S</b>	Penicillin-Streptomycin Sterile-Filtered o pojemności 100mL	Sigma-Aldrich
<b>MTT</b>	Barwnik do testów kolorymetrycznych	Sigma-Aldrich
<b>THYMIDYNE-[Methyl-3H]</b>	Odczynnik do testów aktywności proliferacyjnej	MPBiomedicals
<b>GRADISOL L</b>	Fikol służący do izolowania limfocytów	Aqua-med
<b>EasYFlasks™ Nunclon™Δ</b>	buteleczki hodowlane o pojemności 25mL	ALAB sp. z o.o. (producent: NUNC/Thermo Scientific)
<b>CYTOSCINT™-ES Liquid Scintillation Cocktail</b>	płyn scyntylicyjny o pojemności 1gal	ABO (producent: MPBiomedicals)
<b>Końcówki do pipet</b>	Końcówki do pipet o pojemnościach 0,5-10μL, 200μL oraz 1000μL	MEDLAB-PRODUCTS Sp. z o.o.
<b>Końcówki do pipet</b>	Końcówki do pipet o pojemności 200μL oraz 1000μL, sterylne, pakowane po 96 sztuk	Eppendorf
<b>eppendorfy</b>	Probówki stożkowe o pojemności 1,5mL	MEDLAB-PRODUCTS Sp. z o.o.
<b>eppendorfy</b>	Probówki stożkowe o pojemności 1,5mL, sterylne, pakowane indywidualnie	Eppendorf
<b>Falcon 96-well plate round bottom</b>	Płytki 96-dółkowe, pakowane indywidualnie, okrągłodenne	BD (Diag-Med)
<b>Falcon 96-well plate flat bottom</b>	Płytki 96-dółkowe, pakowane indywidualnie, płaskodenne	BD (Diag-Med)
<b>Płytki 24-dółkowe</b>	Płytki 24-dółkowe, pakowane indywidualnie	BD (Diag-Med)

<b>Skrobak</b>	Skrobak do zbierania komórek adherentnych	BD (Diag-Med)
<b>Przeciwciała</b>		
<b>Lineage Cocktail 50 tests (lin 1)</b>	Mieszanka przeciwciał: CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 stosowana w testach cytometrycznych	BD (Diag-Med)
<b>HLA-DR PerCP-CY5.5</b>		BD (Diag-Med)
<b>APC CD11c</b>		BD (Diag-Med)
<b>CD123 PE-CY7</b>		BD (Diag-Med)
<b>CD80 PE; CD83 PE; CD86 PE</b>		BD (Diag-Med)
<b>Cytokiny</b>		
<b>Recombinant Human IL-4</b>		R&D (Biokom)
<b>Recombinant Human GM-CSF</b>		R&D (Biokom)
<b>Recombinant Human TNF</b>		R&D (Biokom)
<b>Lipopolisacharyd z Escherichia coli 055:B5</b>		Sigma-Aldrich

#### 4.4.1. Linie komórkowe

Podczas wykonywania testów wykorzystywałam linię komórkową ostrej białaczki limfoblastycznej typu T – Jurkat.

#### 4.4.2. Podłoża hodowlane

Linie komórkowe oraz PBMC hodowałam na podłożu płynnym, w którego skład wchodziły: RPMI-1640, FBS w ilości 10% oraz P/S. Całość rozlewana była w warunkach sterylnych do autoklawowanych, szklanych buteleczek zabezpieczonych jałowym, gumowym korkiem.

Wyizolowane monocyty hodowałam na podłożu płynnym, w którego skład wchodziły: GMP-DC z 5% dodatkiem FBS.

## **4.5. Metody stosowane w badaniach biologicznych**

### **4.5.1. Hodowla linii komórkowej Jurkat**

#### **4.5.1.1. Pasażowanie linii komórkowej**

Stosowana linia komórkowa należy do linii komórek zawieszinowych. Hodowlę prowadziłam w cieplarni w temperaturze 37°C w atmosferze zawierającej 5% CO<sub>2</sub>. Całość znajdowała się w medium hodowlanym (pkt. 4.4.2). Komórki pasażowałam co 2-3 dni rozpipetowując zawartość buteleczki, następnie usuwając większość pożywki wraz z komórkami. Do pozostałości dodawałam nowej pożywki i umieszczałam ponownie w cieplarni.

#### **4.5.1.2. Rozmrażanie linii komórkowej**

Komórki pobierałam, w krioampułkach, z banku komórek w ciekłym azocie i szybko rozmrażałam. Następnie zawiesinę odwirowywałam. Nadsącz zlewałam, a do pozostałości wlewałam pożywki. Całość rozpipetowywałam i przenosiłam do buteleczek hodowlanych i uzupełniałam medium hodowlanym do objętości ok 10mL.

#### **4.5.1.3. Mrożenie linii komórkowej**

Zawiesinę komórek odwirowywałam. Zlewałam nadsącz, a pozostałość zawieszałam w pożywce, dodawałam 10% FBS oraz 10% DMSO (stężenia w końcowej objętości). Tak przygotowane komórki umieszczałam w krioampułkach i mroziłam w -80°C. Następnie całość przenosiłam do banku komórek.

### **4.5.2. Przygotowanie rozcieńczeń analogów MPA**

Stężenia (0,1-0,00001mg/mL) przygotowywane były metodą seryjnych rozcieńczeń. Do naważonych 10mg związku dodawałam 1mL DMSO. Następnie 30μL przenosiłam za pomocą pipety do 270μL medium hodowlanego. W ten sposób otrzymałam 10-krotne rozcieńczenie badanego związku.

### **4.5.3. Hodowla mononuklearnych komórek krwi obwodowej (PBMC)**

Komórki PBMC pozyskiwałam z tzw. kożuszka leukocyтарnego otrzymywanego z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Gdańsku (RCKiK). Dostarczony materiał pochodził od anonimowych dawców.

PBMC otrzymywałam za pomocą wirowania w gradiencie gęstości krwi żyłnej. W corningu umieszczałam ok 20mL krwi i rozcieńczałam buforem PBS (w stosunku 1:1). W drugim corningu przygotowywałam mieszaninę Ficollu-Uropoliny (w stosunku 1:1), na którą następnie nawarstwiałam rozcieńczoną krew. Całość wirowałam 15min z szybkością 2500 obr./min. Wirowanie próbki powoduje separację PBMC na poszczególne frakcje komórek. Na dnie próbki znajdują się erytrocyty i granulocyty. Interesujące nas limfocyty wraz z monocytami tworzą tzw. „kożuszek” na granicy Ficollu i osocza. „Kožuszek” ostrożnie zbierałam i przepłukiwałam dwukrotnie buforem PBS. Komórki zawieszałam w medium hodowlanym w celu otrzymania  $10^6$  komórek w 1mL medium. Następnie komórki wykorzystywałam w testach żywotności oraz proliferacyjnych.

#### **4.5.4. Test kolometryczny MTT**

##### **4.5.4.1. Linia komórkowa Jurkat**

Test wykorzystywany jest w celu określenia żywotności komórek. Komórki z buteleczki hodowlanej zlewałam do corninga i wirowałam 4 minuty z szybkością 1200obr/min. Nadsącz zlewałam, a komórki zawieszałam w medium hodowlanym. Komórki umieszczałam na płytkach 96-dołkowych, płaskodennych w ilości  $10^5$  komórek w 100mL pożywki na dołek. Do każdego dołka dodałam 100 $\mu$ L roztworu odpowiedniego analogu MPA (rozpuszczonego w pożywce oraz DMSO) przygotowanego w stężeniach 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001; 0,00001 mg/mL. Płytki inkubowałam 48h w cieplarni (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Po tym czasie do każdego dołka dodawałam 20 $\mu$ L roztworu MTT (5mg/ml H<sub>2</sub>O). Całość inkubowałam kolejne 3h. Kolejno dodawałam 100 $\mu$ L kwaśnego izopropanolu (dodatek 0,4M HCl). Płytki wytrząsałam przez 15 min. Test kolorymetryczny (odczyt gęstości optycznej) wykonywałam z wykorzystaniem fali długości 570nm.

Za pomocą powyższego testu wyselekcjonowałam trzy stężenia wykorzystywane w oznaczaniu aktywności antyproliferacyjnej (0,01; 0,001; 0,0001mg/mL).

##### **4.5.4.2. PBMC**

Komórki izolowałam zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 4.5.3. i umieszczałam na płaskodennej 96-dołkowej płytce w ilości  $1 \times 10^5$ /dołek w 100 $\mu$ L pożywki. Do każdego dołka dodałam 100 $\mu$ L roztworu odpowiedniego analogu MPA (rozpuszczonego w pożywce oraz DMSO) przygotowanego w stężeniach 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001; 0,00001 mg/mL oraz

monoklonalnych przeciwciał anti-CD3/anti-CD-28 w ilości 1 $\mu$ L/dołek. Płytki inkubowałam 72h w cieplarni (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Po tym czasie do każdego dołka dodawałam 20 $\mu$ L roztworu MTT (5mg/ml H<sub>2</sub>O). Całość inkubowałam kolejne 3h. Kolejno dodawałam 100 $\mu$ L kwaśnego izopropanolu (dodatek 0,4M HCl). Płytki wytrząsałam przez 15 min. Test kolorymetryczny (odczyt gęstości optycznej) wykonywałam z wykorzystaniem fali długości 570nm.

#### **4.5.5. Test proliferacyjny**

##### **4.5.5.1. Linia komórkowa Jurkat oraz PBMC**

Płytki przygotowywałam w sposób analogiczny do przedstawionego w pkt. 4.5.4.1. Płytki inkubowałam 72h w cieplarni (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Po tym czasie dodawałam roztwór TdR-3H (aktywność 2.0Ci/mmol, 74Gbq/mmol) w pożywce (1950 $\mu$ L pożywki + 50 $\mu$ L TdR-3H) w ilości 20 $\mu$ L/dołek i pozostawiałam na kolejne 18h. Komórki zbierałam na filtry celulozowe wykorzystując harvester komórek firmy Skatron, umieszczałam w naczyniach do pomiaru scyntylicyjnego, a następnie filtry pozostawiałam na kilka godzin do wysuszenia. Po wyschnięciu dodawałam płynu scyntylicyjnego CITOSCINT, aż do całkowitego zakrycia „bibulek”. Próbki poddawałam pomiarowi radioaktywności z użyciem czytnika scyntylicyjnego z promieniowaniem  $\beta$  (2min/próbka).

#### **4.6. Test LAL**

Test wykonywałam zgodnie z opisem umieszczonym przez producenta (Lonza) Wykonanie testu składa się z następujących etapów:

- I. Preinkubacja płytki 96-ciodółkowej płaskodennej w temperaturze 37°C. W międzyczasie ostrożnie umieszczam po 50 $\mu$ l próbki/dołek. Każda próba wykonana została w dwukrotnym powtórzeniu.

blank	50 $\mu$ l LAL Reagent Water
standard	0,1-1,0 EU/ml
<b>6</b>	0,019mg/ml
DMSO	0,02mg/ml
<b>49j</b>	0,02mg/ml
<b>50e</b>	0,015mg/ml
<b>50h</b>	0,017mg/ml

- II. Dodanie po 50µl LAL i inkubacja przez 10 minut.
- III. Po 10 minutach dodałam roztwór substratu, wcześniej poddanego ogrzaniu do temperatury 37°C i następnie inkubacja przez 16 minut.
- IV. Dodanie 100µl reagenta zatrzymującego proces.
- V. Odczytanie absorbancji przy  $\lambda=405\text{nm}$ .

#### **4.7. Izolacja monocytów**

Wcześniej wyizolowane komórki PBMC zawieszano w pożywce hodowlanej (RPMI1640/ 10%FBS/ P/S) i nakładałam na płytki Petriego –  $1 \times 10^8$  komórek/10ml. Inkubowałam je w cieplarni (37°C, 5%CO<sub>2</sub>, 98% H<sub>2</sub>O) przez całą 2h pozwalając komórkom przylegającym (głównie monocyty) na przyklejenie się do dna naczynia hodowlanego. Następnie dekantowałam komórki nieprzylegające i dodatkowo przepłukiwałam płytki ciepłym buforem PBS. Następnie butelki te zalewałam zimnym PBS i inkubowałam na lodzie 30 minut. Niska temperatura sprzyjała odklejaniu się komórek od dna naczynia buforem bez wpływu na właściwości tych komórek. Po tym czasie, używając drapaczki, ściągałam komórki przylegające z dna płytek, przepłukując je jednocześnie zimnym buforem PBS. Następnie komórki wirowałam i zawieszałam w pożywce do hodowli (GMP-DC). W wyniku izolacji wyżej opisaną metodą otrzymywałam populację komórek adherentnych, tzn. wzbogaconą w monocyty, która stanowiła populację wyjściową do ekspansji komórek dendrytycznych.

Komórki, zawieszane w pożywce GMC-DC, umieszczałam na płytkach 24-dołkowych w ilości 10<sup>6</sup>/1ml/dołek. Następnie przeprowadzałam ekspansję komórek dendrytycznych.

#### **4.8. Ekspansja monocytarnych komórek dendrytycznych**

Do komórek umieszczonych na płytkach 24-dołkowych dodawałam cytokiny: IL-4 oraz GM-CSF. Przygotowano rozcieńczenia w postaci stocków: IL-4 – 1µg/0,5ml oraz GM-CSF – 1µg/0,5ml. IL-4 dodawałam w ilości 50µl i stężenie końcowe IL-4 wynosiło 100ng/ml/dołek, zaś GM-CSF w ilości 25µl i stężenie końcowe wynosiło 50ng/ml/dołek. Pozostałe stocki przechowuję w temperaturze -80°C.

Hodowlę prowadziłam w cieplarni (37°C, 5%CO<sub>2</sub>, 98% H<sub>2</sub>O) przez 10 dni według schematu przedstawionego poniżej (Rys. 24).

Dni hodowli

1	Izolacja komórek mononuklearnych krwi obwodowej, nastawienie ekspansji DC
2	
3	
4	Pasaż DC
5	
6	
7	
8	Stymulacja DC przez dodanie LPS + pasaż DC + badane związki
9	
10	Zakończenie hodowli, analiza właściwości DC

**Rys. 24.** Schemat ekspansji komórek DC z prekursorów monocytarnych ludzkiej krwi obwodowej.

W czasie pasażowania usuwałam 200µl nadsącza i uzupełniałam pożywką GMP-DC. Ósmego dnia również wykonałam pasaż komórek DC, przy czym dołki uzupełniałam pożywką GMP-DC (kontrola) bądź pożywką GMP-DC, stymulatorem (LPS) w stężeniu końcowym 100ng/ml/dolek oraz badanymi związkami (dodane pierwszego, bądź siódmego dnia) o stężeniu końcowym wyliczonym wcześniej. Stężenia określają aktywność proliferacyjną wyznaczoną metodą inkorporacji TdR-3H wobec komórek PBMC.

Następnie komórki inkubowałam 48 godzin i po tym czasie hodowla była zamykana.

#### 4.9. Badania cytometryczne

Płytkę z komórkami inkubowałam 30 minut na lodzie. Po tym czasie zbierałam wszystkie komórki z każdego dołka. Pod wpływem niskiej temperatury komórki przylegające w większości odklejały się i przechodziły do nadsącza. W próbkach umieszczałam po

200µl nadsączu (wraz z komórkami) i dodawałam po 4µl odpowiednich przeciwciał (Lineage cocktail 1 (lin 1) - CD3, CD14, CD16, CD19, CD20; HLA-DR PerCP-CY5.5; APC CD11c; CD123 PE-CY7; CD80 PE; CD83 PE; CD86 PE) i pozostawiałam na 25-30 minut. Następnie dodawałam po 2 ml PBS i wirowałam z prędkością 1700obr/min przez 5 minut. Zlewałam nadsącz, probówkę uzupełniałam 200µl PBS i poddawałam badaniu cytometrycznemu. Identyfikacja sygnału pozytywnego odbywała się poprzez zastosowanie kontroli izotypowych dla każdego z przeciwciał.

#### **4.10. Test funkcjonalny**

Przygotowane DC zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.7 odwirowywałam oraz zliczałam. Następnie ze świeżego kożuszka leukocyтарnego izolowałam limfocyty zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.5.3. Następnie na płytce 96-cio dołkowej umieszczałam  $10^5$  komórek/dołek i dodawałam DC w stosunku 2:1, 1:1, 0,5:1, 0,25:1, 0,125:1. Całkowita objętość w dołku wynosiła 200µl. Całość inkubowałam 72h. Po tym czasie dodawałam TdR-3H w ilości 20µL/dołek i pozostawiałam na kolejne 18h. Komórki zbierałam na filtry celulozowe wykorzystując harvester komórek firmy Skatron, umieszczałam w naczyniach do pomiaru scyntylicyjnego, a następnie filtry pozostawiałam na kilka godzin do wysuszenia. Po wyschnięciu dodawałam płynu scyntylicyjnego CITOSCINT, aż do całkowitego zakrycia „bibulek”. Próbki poddawałam pomiarowi radioaktywności z użyciem czytnika scyntylicyjnego z promieniowaniem  $\beta$  (2min/próbka).



## 5. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Celem mojej rozprawy doktorskiej była synteza i badania biologiczne *in vitro* aminokwasowych analogów kwasu mykofenolowego w postaci estrów metyloowych oraz z wolną grupą karboksylową jako potencjalnych leków immunosupresyjnych.

Zaprojektowałam i zsyntetyzowałam 22 nowe analogi MPA w wyniku utworzenia wiązania amidowego pomiędzy grupą karboksylową w cząsteczce MPA, a odpowiednimi aminokwasami (L- i D-enancjomery) w postaci estrów metyloowych, które następnie poddałam deprotekcji w celu otrzymania wolnej grupy karboksylowej. Otrzymane analogi badałam *in vitro* stosując testy cytotoksyczności oraz proliferacyjne w celu wyselekcjonowania związków o najkorzystniejszych właściwościach do badań *in vivo*.

Do tworzenia wiązania amidowego pomiędzy MPA, a estrami aminokwasów przetestowałam różne odczynniki kondensujące (DPPA, EEDQ, HBTU, TBTU, BOP, DCC, CCMT, EDCI) i na tej podstawie wybrałam te, które dały najczystsze produkty z dobrą wydajnością. Najbardziej obiecującą okazała się procedura wykorzystująca EDCI w obecności DMAP dająca analogi z dobrymi wydajnościami. Żądany produkt izolowałam stosując ekstrakcję octanem etylu, a dodatkowo oczyszczała na płytkach TLC lub kolumnie chromatograficznej. Strukturę związków końcowych potwierdziłam za pomocą  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, MS oraz MS-HPLC, określiłam także ich temp. top. i skręcalność właściwą.

Następnie otrzymane analogi w postaci estrów poddałam hydrolizie za pomocą LiOHaq/MeOH otrzymując związki z wolną grupą karboksylową. Pozwoliło to na selektywną deprotekcję grupy estrowej w łagodnych warunkach w obecności pozostałych grup funkcyjnych obecnych w cząsteczce.

Zbadałam wpływ wielkości podstawnika i konfiguracji w części aminokwasowej na aktywność immunosupresyjną.

Przeprowadzone badania biologiczne *in vitro* pozwoliły mi na sformułowanie następujących wniosków:

- a) Komórki Jurkat okazały się wrażliwe na badane związki zarówno w teście MTT, jak i TdR-3H. Ze względu na osobnicze różnice, testy te wykonałam na czterech różnych kożuszkach leukocytarnych, zaś wynik jest średnią otrzymaną z wszystkich czterech testów.
- b) Badane związki wykazały w teście MTT mniejszą bądź porównywalną cytotoksyczność w stosunku do komórek Jurkat niż MPA ( $\text{IC}_{50}=28,21\mu\text{M}$ ). Dla większości analogów różnice te były statystycznie istotne. Najniższą

cytotoksycznością charakteryzowały się analogi **49a** ( $IC_{50}=65,70\mu M$ ) i **49c** ( $IC_{50}=65,28\mu M$ ) oraz **50i** ( $IC_{50}=41,8\mu M$ ).

- c) Aktywność estrów w teście MTT zależy od konfiguracji w części aminokwasowej. Dla analogów zawierających alaninę, walinę i leucynę w postaci D-enancjomerów toksyczność była niższa niż dla ich L-enancjomerów. W przypadku fenyloalaniny możemy zauważyć sytuację odwrotną. Jedynie enancjomery kwasu glutaminowego wykazały porównywalną aktywność.
- d) Nie stwierdziłam istotnego wpływu wielkości podstawnika na aktywność badanych związków.
- e) Najwyższą cytotoxycznością charakteryzował się związek **49h**, dla którego wartości  $IC_{50}$  są znacznie niższe niż dla MPA zarówno w stosunku do komórek Jurkat ( $IC_{50}=6,5\mu M$ ), jak i aktywowanych limfocytów PBMC ( $IC_{50}<0,0002\mu M$ ).
- f) Deprotekcja grupy estrowej spowodowała zmianę aktywności badanych związków w teście MTT. Większość analogów okazała się bardziej toksyczna wobec komórek Jurkat niż związki wyjściowe. Odwrotną sytuację możemy zaobserwować dla związku **50e** ( $IC_{50}>111,5\mu M$ ) dla którego nastąpił znaczny spadek toksyczności w stosunku do komórek PBMC.
- g) Dzięki testom proliferacyjnym sprawdziłam skuteczność działania otrzymanych analogów jako potencjalnych leków immunosupresyjnych. Estry (**49a-k**) odznaczały się wyższą wartością  $EC_{50}$  niż MPA ( $EC_{50}=0,00006\mu M$ ) wobec PBMC. Związki **49b** ( $EC_{50}=5,68\mu M$ ), **49h** ( $EC_{50}=6,27\mu M$ ), **49i** ( $EC_{50}=8,29\mu M$ ), **49j** ( $EC_{50}=6,66\mu M$ ) oraz **49k** ( $EC_{50}=7,9\mu M$ ) wykazały wyższą aktywność wobec komórek Jurkat w porównaniu do MPA ( $EC_{50}=9,45\mu M$ ). Wszystkie otrzymane wartości są istotne statystycznie ( $p<0,05$ ).
- h) Wykonanie testów MTT oraz TdR-3H umożliwiło wybór związków o możliwie wysokiej aktywności proliferacyjnej przy jednocześnie najniższej toksyczności. Na tej podstawie wyselekcjonowałam trzy związki: **49j** ( $SI=2871,429$ ), **50e** ( $SI=33787,88$ ) i **50h** ( $SI=7166,667$ ) w przypadku komórek PBMC do dalszych badań.
- i) Badania proliferacyjne aminokwasowych analogów MPA poprzez dodatek  $50\mu M$  GMP umożliwiły stwierdzenie, że związki **49a-k**, **50a-k** i MPA **6** są inhibitorami IMPDH.
- j) W wyniku przeprowadzonych badań biologicznych wybrałam trzy analogi MPA: ester metylowy *N*-mykofenoilo-L-fenyloalaniny **49j**, kwas *N*-mykofenoilo-D-

glutaminowy **50e** i *N*-mykofenoilo-L-leucynę **50h**, które poddałam dalszym badaniom na komórkach DC.

- k) Wszystkie badane analogi wpływały na ekspansję i dojrzewanie komórek dendrytycznych. Badania cytometryczne wykazały jedynie niewielkie ich oddziaływanie na dojrzewanie DC. Również testy funkcjonalne potwierdziły niewielki wpływ badanych związków na dojrzewanie komórek DC. Jednocześnie pochodne **50e** oraz **50h** wykazują nieznacznie wyższy wpływ hamujący na komórki DC niż MPA.
- l) Pomimo informacji podanych w literaturze o działaniu hamującym MPA na DC, nie udało mi się tego potwierdzić. W obu przeprowadzonych testach MPA powodował dojrzewanie DC na poziomie komórek traktowanych LPS.
- m) DC traktowane każdym z trzech związków **49j**, **50e** i **50h** w proporcjach DC:limfocytów zbliżonych do fizjologii (0.25:1 i 0.125:1) stymulowały proliferację limfocytów w mniejszym stopniu niż MPA, a także mniejszym niż limfocyty traktowane niedojrzałymi DC (K – bez LPS).
- n) Ze względu na wrażliwość DC na obecność LPS wykonałam również test na obecność endotoksyn w badanych analogach. Analiza ta potwierdziła czystość mikrobiologiczną badanych związków.

## 6. SUMMARY

Immunosuppression is a process of inhibiting the immune response. It plays a crucial role in transplantation and in the treatment of autoimmune diseases. Using immunosuppressive drugs include mycophenolic acid **6** (MPA), mycophenolate mofetil **7** (MMF) or mycophenolate sodium **8** (EC-MPS) (Fig. 2) prevent not only acute but also chronic transplant rejection. MPA is metabolized to inactive 7-*O*-glucuronide, so it has to be used in high doses. This causes a number of side effects (symptoms from the gastrointestinal tract, urogenital tract or nervous system) so we still looking for new analogues with improved pharmacological properties.

Continuing the search for less toxic, more selective and safer immunosuppressants we designed new amino acid analogs of mycophenolic acid (MPA), *via* formation of their methyl esters **49a-k** (Scheme 8) and analogs possessing free carboxyl group **50a-k** (Scheme 9).

Synthesis of amino acids analogs as a methyl esters (Gly and Ala, Val, Glu, Leu, Phe as a L- and D-enantiomers) was conducted in solution using suitable condensing agents and reaction conditions (HBTU/NMM, BOP/HOBt, DCC/NMM, TBTU/HOBt, DPPA/TEA, EEDQ/Py, EDCI/DMAP, CCMT/DMAP) and the method of mixed anhydride with isobutyl chloroformate and NMM. The best yield of the reaction and the purest products I received with EDCI in the presence of DMAP in anhydrous DMF at 0°C. I synthesized **11** ester derivatives (**49a-k**), which were then deprotected with LiOH/MeOH to give the amino acid analogs with free with carboxyl group (**50a-k**).

I characterized all synthesized compounds by using spectroscopic (<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, MS) and analytical methods (TLC, HPLC-MS), melting point and specific rotation.

I examined all obtained compounds (**49a-k**, **50a-k**) and MPA **6** in biological tests *in vitro* on lymphoid cell line Jurkat and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy donors. Biological tests included: MTT viability assays examining the toxicity of the compounds (**49a-k**, **50a-k**, **6**) to determine the IC<sub>50</sub>; proliferative activity assays using <sup>3</sup>H-TdR incorporation in order to determine EC<sub>50</sub>; then the activity of analogues (**49a-k**, **50a-k**) was compared with MPA by selectivity index; selectivity tests performed the effect of the compounds (**49a-k**, **50a-k**, **6**) to IMPDH by proliferative activity using <sup>3</sup>H-TdR incorporation method to Jurkat cell line with the addition of GMP. Based on the results, I chose the most favorable parameters of compounds for *in vivo* tests.

Selected compounds were additionally tested. I described the effect of selected compounds on the expansion and maturation of dendritic cells (DC) using phenotyping

## *Summary*

antibodies: Lineage cocktail 1 (lin 1 - CD3, CD14, CD16, CD19, CD20; HLA-DR) PerCP-CY5.5; APC CD11c; CD123 PE-CY7; CD80 PE; CD83 PE; CD86 PE. Then, I examined the effect of dendritic cells with the test compounds on the activity of allogeneic T cell proliferation by TdR-3H incorporation. At the same time selected compounds were researched at the presence of endotoxin.

## 7. DOROBEK NAUKOWY

### Publikacje oryginalne:

- Iwaszkiewicz-Grześ D., Cholewiński G., Kot-Wasik A., Dzierzbicka K., Trzonkowski P., *Synthesis and biological activity of mycophenolic acid-amino acid derivatives*, Eur. J. Med. Chem., **2013**, 69, 863-871.
- Cholewiński G., Iwaszkiewicz-Grześ D., Trzonkowski P., Dzierzbicka K., *Synthesis and antiproliferative activity of ester conjugates of mycophenolic acid and acridines/acridones*, Eur. J. Med. Chem., wysłane do recenzji

### Publikacje monograficzne:

- Dzierzbicka K., Cholewiński G., Iwaszkiewicz-Grześ D., Trzonkowski P., *Poszukiwanie nowych leków immunosupresyjnych (Quest for new immunosuppressive drugs)*, Wiad. Chem., **2011**, 65, 59-92.

### Udział w sympozjach i konferencjach naukowych:

- Iwaszkiewicz-Grześ D., Cholewiński G., Dzierzbicka K., *Synteza aminokwasowych pochodnych MPA*, V Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, 16-18.06.2011, Toruń, Polska
- Iwaszkiewicz-Grześ D., Cholewiński G., Dzierzbicka K., *Amino acid derivatives of mycophenolic acid*, 21<sup>th</sup> Polish Peptide Symposium, 04-08.09.2011, Supraśl, Polska
- Iwaszkiewicz-Grześ D., Cholewiński G., Dzierzbicka K., Trzonkowski P., *Biological activity amino acid derivatives of mycophenolic acid as immunosuppressants*, Frontiers in Medicinal Chemistry, 17-20.03.2013, Monachium, Niemcy
- Kukowska M., Dzierzbicka K., Iwaszkiewicz-Grześ D., *Studies on antibacterial activity of Gly-His-Lys analogues and their modification with fatty acids*, Frontiers in Medicinal Chemistry, 17-20.03.2013, Monachium, Niemcy
- Iwaszkiewicz-Grześ D., Cholewiński G., Dzierzbicka K., Trzonkowski P., *New potent IMPDH inhibitors*, 15th International Congress of Immunology – ICI, 22-27.08.2013, Mediolan, Włochy

- Samsel M., Iwaszkiewicz-Grześ D., Dzierzbicka K., Trzonkowski P., *Immunomodulatory properties of new conjugates muramyldipeptides derivatives with adenosine*,  
15th International Congress of Immunology – ICI, 22-27.08.2013, Mediolan, Włochy
- Iwaszkiewicz-Grześ D., Cholewiński G., Dzierzbicka K., Trzonkowski P., *New amino acid derivatives of mycophenolic acid selected for in vivo tests*,  
22<sup>nd</sup> Polish Peptide Symposium, 01-05.09.2013, Kudowa Zdrój, Polska
- Kukowska M., Dzierzbicka K., Iwaszkiewicz-Grześ D., *Design, synthesis and characterization of C-, N-substituted Gly-His-Lys derivatives*,  
22<sup>nd</sup> Polish Peptide Symposium, 01-05.09.2013, Kudowa Zdrój, Polska
- Iwaszkiewicz-Grześ D., Cholewiński G., Trzonkowski P., Dzierzbicka K., *Influence of selected amino acids analogs of mycophenolic acid to dendritic cells*,  
5thEuCheMS Chemistry Congress, 31.08.-04.09.2014, Istanbul, Turcja
- Cholewiński G., Iwaszkiewicz-Grześ D., Trzonkowski P., Dzierzbicka K., *Synthesis of New Inosine-5'-Monophosphate Dehydrogenase (IMPDH) Inhibitors on the Basis of Conjugates of Mycophenolic Acid and Acridones or Acridines*,  
5thEuCheMS Chemistry Congress, 31.08.-04.09.2014, Istanbul, Turcja

#### Zgłoszenia patentowe:

- G. Cholewinski, D. Iwaszkiewicz-Grześ, K. Dzierzbicka, P. Trzonkowski „*Nowe amidowe pochodne kwasu mykofenolowego, sposób otrzymywania amidowych pochodnych kwasu mykofenolowego, i zastosowanie nowych pochodnych kwasu mykofenolowego do wytwarzania leku immunosupresyjnego zwłaszcza zmniejszającego ryzyko odrzucenia przeszczepów*”  
Numer zgłoszenia: [P.402374]  
Data: 07.01.2013
- G. Cholewinski, K. Dzierzbicka, D. Iwaszkiewicz-Grześ, P. Trzonkowski „*Estrowe koniugaty kwasu mykofenolowego i pochodnych akrydonów, estrowe koniugaty kwasu mykofenolowego i pochodnych akrydyn, sposób ich otrzymywania oraz zastosowanie jako immunosupresanty, zwłaszcza do stosowania w zapobieganiu odrzucaniu*”

*przeszczepów”*

Numer zgłoszenia: [P.407332]

Data: 28.02.2014

**Wyjazdy stażowe:**

- Termin odbycia stażu: 01.05.2013-31.07.2013

Staż odbyty w ramach projektu *"Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii"*

Tytuł projektu: *"Synthesis of highly functionalized pyrrole derivatives with a broad spectrum of biological activities by multicomponent reaction"*

Kierownik projektu: Prof. Wim Dehaen

Miejsce odbycia stażu: Wydział Chemiczny K. U. Leuven, Belgia



## 8. 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*. Human Immunol, **2012**, 73, 1275-1281.
2. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500003593.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003593.pdf), data odwiedzenia witryny 06.04.2014
3. 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, 1149-1156.
4. Moia LJ, Matsui H, de Barros GA, Tomizawa K, Miyamoto K, Kuwata Y, Tokuda M, Itano T, Hatase O. *Immunosuppressants and calcineurin inhibitors, cyclosporine A and FK506, reversibly inhibit epileptogenesis in amygdaloid kindled rat*. Brain Res, **1994**, 648, 337-341.
5. Suthanthiran M, Morris RE, Strom TB. *Immunosuppressants: cellular and molecular mechanisms of action*. Am J Kidney Dis, **1996**, 28, 159-172.
6. Stucker F, Ackermann D. *Immunosuppressive drugs – how they work, their side effects and interactions*. Ther Umsch, **2011**, 68, 679-686.
7. 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.
8. Aktas S, Colak T, Baskin E, Sevmis S, Ozdemir H, Moray G, Karakatali H, Haberal M. *Comparison of basiliximab and daclizumab with triple immunosuppression in renal transplantation*. Transplant Proc, **2011**, 43, 453-457.
9. De Santo LS, Della Corte A, Romano G, Amarelli C, Onorati F, Torella M, De Feo M, Marra C, Maiello C, Giannolo B, Casilo 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, 631-637.

## Literatura

10. 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.* Transplant Immunol, **2011**, 25, 104-111.
11. Rowiński W, Durlik M. *Zalecenia dotyczące leczenia immunosupresyjnego po przeszczepach narządów unaczynionych.* Wyd. Fundacja Zjednoczeni dla Transplantacji, Warszawa, **2006**, 9.
12. Smak Gregoor PJH, van Gelder T, Weimar W. *Mycophenolate mofetil, CellCept®, a new immunosuppressive drug with great potential in internal medicine.* Neth J Med, **2000**, 57, 233-246.
13. Murray JE. *The first successful organ transplants in man.* J Am Coll Surg, **2005**, 200 (1), 5-9.
14. Nielubowicz J. *Krótką historia pierwszych przeszczepów nerek. W: Przeszczepianie nerek.* Red. Orłowski T. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa **1995**, 9–14
15. Herman Z. *Hormony. Witaminy. Leki: przeciwnowotworowe, immunosupresyjne. Autakoidy.* Wydawnictwo Lekarskie PZWL, **2010**, 181-187.
16. Dzierzbicka K, Cholewiński G, Iwaszkiewicz-Grześ D, Trzonkowski P. *Poszukiwanie nowych leków immunosupresyjnych.* Wiad Chem, **2011**, 65, 59-92.
17. Ruzicka T, Assmann T, Homey B. *Tacrolimus, the drug for the turn of the millennium?*, Arch. Dermatol., **1999**, 135, 574-580.
18. Morelon E, Mamzer-Bruneel MF, Peraldi MN, Kreis H. *Sirolimus: a new promising immunosuppressive drug. Towards a rationale for its use in renal transplantation.*, Nephrol Dial Transplant, **2001**, 16, 18-20.
19. Koch M. *Everolimus in liver and lung transplantation.*, Drugs of Today, **2009**, 45, 11-20.
20. Woodroffe R, Yao GL, Meads C, Bayliss S, Ready A, Raftery J, Taylor RS. *Clinical and cost-effectiveness of newer immunosuppressive regimens in renal transplantation: a systematic review and modelling study.*, Health Tech. Assessment, **2005**, 9, 21.
21. Gosio B, *Rivista d'Igiene e Sabita publica Ann.*, **1896**, 7, 825.

## Literatura

22. Ardestani F, Fatemi SS, Yakhchali B, Hosseyni SM, Najafpour G. *Evaluation of Mycophenolic Acid Production by Penicillium berricompactum MUCL 19011 in Batch and Continuous Submerged Cultures.*, Biochem Engineering J, **2010**, 50, 99-103.
23. Clutterbuck PW, Raistick H. *Studies in the biochemistry of micro-organisms: The molecular constitution of the metabolic products of Penicillium brevi-compactum Dierckx and related species. II. Mycophenolic acid.* J Biochem, **1933**, 27, 654-667.
24. Jones DF, Moore RH, Crawley GC. *Microbial Modification of Mycophenolic Acid.*, J Chem Soc C, **1970**, 12, 1725-1737.
25. Covarrubias-Zúñiga A, Gonzalez-Lucas A, Domínguez MM. *Total synthesis of mycophenolic acid.*, Tetrahedron, **2003**, 59, 1989-1994.
26. Kaplan B. *Mycophenolic acid trough level monitoring in solid organ transplant recipients treated with mycophenolate mofetil: Association with clinical outcomes.*, Curr Med Res Opin., **2006**, 22, 2355-2364.
27. Ghio L, Ferraresso M, Zacchello G, Murere L, Ginevrid F, Belingheria M, Peruzzie L, Zanon F, Perfumod F, Berardinelli L, Tirelling S, Strologoh LD, Fontanai I, Valentei U, Cardilloj M, Edefontia A. *Longitudinal evaluation of mycophenolic acid pharmacokinetics in pediatric kidney transplant recipients. The role of post-transplant clinical and therapeutic variables.*, Clin Transplant, **2009**, 23, 264-270.
28. Jablecki J, Kaczmarzyk L, Patrzalek D, Domanasiewicz A, Boratyńska Z. *First Polish forearm transplantation: report after 17 months.*, Transplant Proc, **2009**, 41, 549-553.
29. Orvis AK, Wesson SK, Breza TS, Church AA, Mitchell CL, Watkins SW. *Mycophenolate mofetil in dermatology.*, J Am Acad Dermatol, **2009**, 60, 183-199.
30. Kaufmann DB, Shapiro R, Lucey MR, Cherikh WS, Bustami RT, Dyke DB. *Immunosuppression: practice and trends.* Am J Transplant., **2004**, 4, 38-53.
31. Franklin TJ. *Pharmaceutical compositions.* U.K. Patent Specifications, **1970**, GB1203328.

## Literatura

32. Sintchak MD, Nimmesgern E. *The structure of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and the design of novel inhibitors.*, Immunopharmacol, **2000**, *47*, 163-184.
33. Hedstrom L. *IMP Dehydrogenase: structure, mechanism and inhibition.*, Chem Rev, **2009**, *109*, 2903–2928.
34. Digitis JA, Hedstrom L. *Species-Specific Inhibition of Inosine 5'-monophosphate Dehydrogenase by Mycophenolic Acid.* Biochemistry, **1999**, *38*, 15388-15397.
35. Prémaud A, Rousseau A, Johnson G, Canivet C, Gandia P, Muscari F, Peron JM, Rostain L, Marquet P, Kamar N. *Inhibition of T-cell activation and proliferation by mycophenolic acid in patients awaiting liver transplantation: PK/PD relationships.*, Pharm Res, **2011**, *63*, 432-438.
36. Hea X, Smeets RL, Koenen HJPM., Vink PM, Wagenaars J, Boots AMH, Joosten I. *Mycophenolic Acid-Mediated Suppression of Human CD4+ T Cells: More Than Mere Guanine Nucleotide Deprivation.*, Am J Transplant, **2011**, *11*, 439-449.
37. Burlingham WJ, Grailer AP, Hullet DA, Sollinger HW. *Inhibition of both MLC and in vitro Ig memory response to tetanus toxoid by RS-61443.*, Transplantation, **1991**, *51*, 545-547.
38. Faugaret D, Lemoine R, Baron C, Lebranchu Y, Velge-Roussel F. *Mycophenolic acid differentially affects dendritic cell maturation induced by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide through a different modulation of MAPK signaling.*, Mol Immunol, **2010**, *47*, 1848-1859.
39. von Vietinghoff S, Ouyang H, Ley K. *Mycophenolic acid suppresses granulopoiesis by inhibition of interleukin-17 production.*, Kidney International, **2010**, *78*, 79-88.
40. Chen L, Petrelli R, Gao G, Bonnac L, Yu JS, Bennett EM, Pankiewicz KW. *Nicotinamide adenine dinucleotide based therapeutics.* Curr Med Chem, **2008**, *15*, 650-670.
41. Floryk D, Hubermann E. *Mycophenolic acid-induced replication arrest, differentiation markers and cell death of androgen-independent prostate cancer cells DU-145.* Cancer Lett, **2006**, *231*, 20-29.

## Literatura

42. Floryk D, Tollaksen SL, Giometti CS, Huberman E. *Differentiation of human prostate cancer PC-3 cells induced by inhibitors of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase*. *Cancer Res*, **2004**, *64*, 9049-9056.
43. Messina E, Gazzaniga P, Micheli V, Barile L, Lupi F, Agliano AM, Giacomello A. *Low levels of mycophenolic acid induce differentiation of human neuroblastoma cell lines*. *Int J Cancer*, **2004**, *112*, 352-354.
44. Messina E, Micheli V, Giacomello A. *Guanine nucleotide depletion induces differentiation and aberrant neurite outgrowth in human dopaminergic neuroblastoma lines: a model for basal ganglia dysfunction in Lesch-Nyhan disease*. *Neurosci Lett*, **2005**, *375*, 97-100.
45. Bacus SS, Kiguchi K, Chin D, King CR, Huberman E. *Differentiation of cultured human breast cancer cells (AU-565 and MCF-7) associated with loss of cell surface HER-2/neu antigen*. *Mol Carcinog*, **1990**, *3*, 350-362.
46. Yu J, Lemas V, Page T, Connor JD, Yu AL. *Induction of erythroid differentiation in K562 cells by inhibitors of inosine monophosphate dehydrogenase*. *Cancer Res*, **1989**, *49*, 5555-5560.
47. Kiguchi K, Collart RF, Henning-Chubb, Huberman E. *Induction of cell differentiation in melanoma cells by inhibitors of IMP dehydrogenase: altered patterns of IMP dehydrogenase expression and activity*. *Cell Growth Differ*, **1990**, *1*, 259-270.
48. Krötz F, Keller M, Derflinger S, Schmid H, Gloe T, Bassermann F, Duyster J, Cohen CD, Schuhmann C, Klauss V, Pohl U, Stempfle HU, Sohn HY. *Mycophenolate acid inhibits endothelial NAD(P)H oxidase activity and superoxide formation by a Rac1-dependent mechanism*. *Hypertension*, **2007**, *49*, 201-208.
49. Lassègue B, Griendling KK. *Mycophenolic Acid is a New Nox2 Inhibitor*. *Hypertension*, **2007**, *49*, 25-26.
50. Ubukata M, Takamori H, Ohashi M, Mitsuhashi S, Yamashita K, Asada T, Nakajima N, Matsuura N, Tsuruga M, Taki K, Magae J. *Mycophenolic acid is as a latent agonist of PPAR $\gamma$* . *Bioorg Med Chem Lett*, **2007**, *17*, 4767-4770.
51. Birtch AJ, Wright JJ. *A total synthesis of mycophenolic acid*. *Chem Commun*, **1969**, 788-789.

## Literatura

52. Patterson JW. The synthesis of mycophenolic acid. *Tetrahedron*, **1993**, *49*, 4789-4798.
53. Patterson JW, Huang GT. *The orthoester claisen rearrangement in the synthesis of mycophenolic acid*. *J Chem Soc Commun*, **1991**, 1579-1580.
54. Patterson JW. *The synthesis of mycophenolic acid from 2,4-dihydroxybenzoic acid*. *J Org Chem*, **1995**, *60*, 4542-4548.
55. de la Cruz RA, Talamas FX, Vazquez A, Muchowski JM. Total synthesis of mycophenolic acid. *Can J Chem*, **1997**, *75*, 641-645.
56. Danheiser RL, Gee SK, Perez JJ. *Total synthesis of mycophenolic acid*. *J Am Chem Soc*, **1986**, *108*, 806-810.
57. Covarrubias-Zúñiga A, Gonzalez-Lucas A. *A total synthesis of mycophenolic acid*. *Tetrahedron Lett*, **1998**, *39*, 2881-2882.
58. Covarrubias-Zúñiga A, Diaz-Dominguez J, Olguin-Urbe JS. *Synthesis of 6-allyl-7-hydroxy-5-methoxy-4-methylphthalide, a key intermediate in the synthesis of mycophenolic acid*. *Synth Commun*, **2001**, *31*, 1373-1381.
59. Covarrubias-Zúñiga A, Gonzalez-Lucas A, Domingez MM. *Total synthesis of mycophenolic acid*. *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 1989-1994.
60. Canonica L, Rindone B, Santaniello E, Scolastico C. *A total synthesis of mycophenolic acid, some analogues and some biogenetic intermediates*. *Tetrahedron*, **1972**, *28*, 4395-4404.
61. Plé PA, Hamon A, Jones G. *A convergent synthesis of mycophenolic acid*. *Tetrahedron*, **1997**, *53*, 3395-3400.
62. Nelson PH, Carr SF, Devens BH, Eugui EM, Franco F, Gonzalez C, Havley RC, Loughhead, DG, Milan DJ, Papp E, Patterson JW, Rouhafza S, Sjogren EB, Smith DB, Stephenson RA, Talamas FX, Waltos AN, Weikert RJ, Wu JC. *Structure-activity relationships for inhibition of inosine monophosphatedehydrogenase by nuclear variants of mycophenolic acid.*, *J Med Chem*, **1996**, *39*, 4181-4196.
63. Nelson PH, Eugui E, Wang CC, Allison AC. *Synthesis and immunosuppressive activity of some side-chain variants of mycophenolic acid.*, *J Med Chem*, **1990**, *33*, 833-838.

## Literatura

64. Chen L, Wilson D, Jayaram HN, Pankiewicz KW. *Dual inhibitors of IMP-dehydrogenase and histone deacetylases for cancer treatment.*, J Med Chem, **2007**, 50, 6685-6691.
65. Batovska DI, Kim DH, Mitsuhashi S, Cho YS, Kwon HJ, Ubukata M. *Hydroxamic acid derivatives of Mycophenolic Acid Inhibit Histone Deacetylase at the Cellular Level.* Biosci Biotechnol Biochem, **2008**, 72, 2623-2631.
66. Lesiak K, Watanabe KA, Majumdar A, Powell J, Seidman M, Vanderveen K, Goldstein BM, Pankiewicz KW. *Synthesis of a Methylenebis(phosphonate) Analogue of Mycophenolic Adenine Dinucleotide: A Glucuronidation-Resistant MAD Analogue of NAD.*, J Med Chem, **1998**, 41, 618-622.
67. Pankiewicz KW, Lesiak-Watanabe KB, Watanabe KA, Patterson SE, Jayaram HN, Yalowitz JA, Miller MD, Seidman M, Majumdar A, Prehna G, Goldstein BM. *Novel Mycophenolic Adenine Bis(phosphonate) Analogues As Potential Differentiation Agents against Human Leukemia.*, J Med Chem, **2002**, 45, 703-712.
68. Chen L, Petrelli R, Olesiak M, Wilson DJ, Labello NP, Pankiewicz KW. *Bis(sulfonamide) isosters of mycophenolic adenine dinucleotide analogues: Inhibition of inosine monophosphate dehydrogenase.*, Bioorg Med Chem, **2008**, 16, 7462-7469.
69. Chen L, Wilson DJ, Xu Y, Aldrich CC, Felczak K, Sham YY, Pankiewicz KW. *Triazole-Linked Inhibitors of Inosine Monophosphate Dehydrogenase from Human and Mycobacterium tuberculosis.*, J Med Chem, **2010**, 53, 4768-4778.
70. Sandor M, Csaba S, Kovaesne-Mezei A, Tivadar T, Hajko J, Aronhime J. Patent EP 1908756, **2008**.
71. Abdurrazzaque M, Rudolf K. Patent US 2008300404, **2008**.
72. Mattheus P, De R, De Erik VB, Neeraj T, Nana G B, Patent WO 2009003878, **2009**.
73. [http://www.gene.com/download/pdf/cellcept\\_prescribing.pdf](http://www.gene.com/download/pdf/cellcept_prescribing.pdf), data odwiedzenia witryny: 05.04.2014.
74. Vial Y, Tod M, Hornecker M, Urien S, Conti F, Dauphin A, Calmus Y, Blanchet B. *In vitro influence of fatty acids and bilirubin on binding of mycophenolic acid to human serum albumin.* J Pharm Biomed Anal, **2011**, 54, 607-609.

## Literatura

75. Van Gelder T. *Mycophenolate Blood Level Monitoring: Recent Progress*. Am J Transpl, **2009**, 9, 1495-1499.
76. Bruchet NK, Ensom MH. *Limited sampling strategies for mycophenolic acid in solid organ transplantation: a systematic review*. Expert Opinion Drug Metab Toxicol, **2009**, 5, 1079-1097.
77. Lampon N, Tutor-Crespo MJ, Romero R, Tutor JC. *Diagnostic efficiency of truncated area under the curve from 0 to 2 h ( $AUC_{0-2}$ ) of mycophenolic acid in kidney transplant recipients receiving mycophenolate mofetil and concomitant tacrolimus*. Clin Chem Lab Med, **2011**, 49, 1167-1170.
78. Wu TY, Fridley BL, Jenkins GD, Batzler A, Wang L, Weinshilboum RM. *Mycophenolic acid response biomarkers: A cell line model system-based genome-wide screen.*, Int Immunopharmacol, **2011**, 11, 1057-1064.
79. Halloran P, Mathew T, Tomlanovich S, Groth C, Hooftman L, Barker C. *Mycophenolate mofetil in renal allograft recipients: a pooled efficacy analysis of three randomized, double-blind, clinical studies in prevention of rejection. The international Mycophenolate Mofetil Renal Transplant Study Groups.*, Transplantation, **1997**, 63, 39-47.
80. Smak Gregoor PJH, Hesse CJ, van Gelder T. *Relation of mycophenolic acid through levels and adverse events in kidney allograft recipients*. Transplant Proc, **1998**, 30, 1192-1193.
81. Alani F, Grove JA, Anderson WA, Moo-Young M. *Mycophenolic acid production in solid-state fermentation using a packed-bed bioreactor*. Biochem Eng J, **2009**, 44, 106-110.
82. Mattheus P, De R, De Erik VB, Neeraj T, Nana GB. *Method for the preparation of mycophenolate mofetil*. Patent WO2009003878, **2009**.
83. Knox M, Donegan G, Smith DA. *Direct esterification of mycophenolic acid*. Patent US5247083, **1993**.
84. Chudlik M, Husek A. *Method of mycophenolate mofetil preparation*. Patent WO02100855, **2002**.



## Literatura

85. Sircar A, Khedkar A, Kulkarni M, Suryanarayan SY, Sridharan M, Acharaya P, Sarnvasivam G. *Methods of producing esters of mycophenolate*. Patent WO0034503, **2000**.
86. Laftavi MR, Hai F, Laftavi H, Feng L, Said M, Patel S, Kohli R, Alnimri M, Dayton M, Pankewycz O. *Mycophenolic Acid Dose Reductions Result in Poor Long-Term renal Allograft Survival: Comparison Between Mycophenolate Sodium and Mycophenolate Mofetil.*, *Transplant Proc*, **2011**, 43, 478-481.
87. Salvadori M, Holzer H, Civati G, Sollinger H, Lien B, Tomlanovich S, Bertoni E, Seifu Y, Marrast, AC, ERL B301 Study Group. *Long-term administration of enteric-coated mycophenolate sodium (EC-MPS; myfortic) is safe in kidney transplant patients.*, *Clin Nephrol*, **2006**, 66, 112-119.
88. Calvo N, Sanchez-Fructuoso AI, Conesa J, Moreno A, Barrientos A. *Renal Transplant Patients With Gastrointestinal Intolerability to Mycophenolate Mofetil: Conversion to Enteric-Coated Mycophenolate Sodium.*, *Transplant Proc*, **2006**, 38, 2396-2397.
89. Sanchez-Fructuoso A, Ruiz JC, Rengel M, Andres A, Morales JM, Beneyto I, Guirado LI, Cantarell C. *Use of Mycophenolate Sodium in Stable Renal Transplant Recipients in Spain: Preliminary Results of the MIDATA Study.*, *Transplant Proc*, **2009**, 41, 2309-2312.
90. Salvadori M, Bertoni E, Budde K, Holzer H, Civati G, Lien B, Arns W. *Superior efficacy of enteric-coated mycophenolate vs mycophenolate mofetil in de novo transplant recipients: pooled analysis.*, *Transplant Proc*, **2010**, 42, 1325-1328.
91. <http://www.pharma.us.novartis.com/product/pi/pdf/myfortic.pdf>, data odwiedzenia witryny 05.04.2014.
92. Colby TD, Vanderveen K, Strickler MD, Markham GD, Goldstein BM, *Crystal structure of human type II inosine monophosphate dehydrogenase: Implications for ligand binding and drug design.*, *Proc Natl Acad*, **1999**, 96, 3531-3536.
93. Pimkin M, Markham GD. *Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase.*, *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, **2009**, 76, 1-53.
94. Mitsuhashi S, Takenaka J, Iwamori K, Nakajima N, Ubukata M. *Structure-activity relationships for inhibition of inosine monophosphate dehydrogenase and*

## Literatura

- differentiation induction of K562 cells among the mycophenolic acid derivatives.*, Bioorg Med Chem Lett, **2010**, 18, 8106-8111.
95. Bentley R. *Mycophenolic Acid: a one hundred year odyssey from antibiotic to immunosuppressant.*, Chem Rev, **2000**, 100, 3801-3825.
96. Liu Y, Bohn SA, Sherley JL. *Inosine-5'-Monophosphate Dehydrogenase Is a Rate-determining Factor for p53-dependent Growth Regulation.* Mol Biol Cell, **1998**, 9, 15-28.
97. Sherley JL. *Guanine nucleotide biosynthesis is regulated by the cellular p53 concentration.* J Biol Chem, **1991**, 266, 24815-24828.
98. Natsumeda Y, Ohno S, Kawasaki H, Konno Y, Weber G, Suzuki K. *Two Distinct cDNAs From Human IMP Dehydrogenase.*, J Biol Chem, **1990**, 265, 5292-5295.
99. Collart FR, Huberman E. *Cloning and sequence analysis of the human and Chinese hamster inosine-5'-monophosphate dehydrogenase cDNAs.* J Biol Chem, **1988**, 263, 15769-15772.
100. Jain J, Almquist SJ, Ford PJ, Shlyakhter D, Wand Y, Nimmesgern E, Germann UA. *Regulation of inosine monophosphate dehydrogenase type I and type II isoforms in human lymphocytes.* Biochem Pharmacol, **2004**, 67, 767-776.
101. Nagai M, Natsumeda Y, Weber G. *Selective Up-Regulation of Type II Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase Messenger RNA Expression in Human Leukemias.* Cancer Res, **1992**, 52, 258-261.
102. Konno Y, Natsumeda Y, Nagai M, Yamaji Y, Ohno S, Suzuki K, Weber G. *Expression of human IMP dehydrogenase types I and II in Escherichia coli and distribution in human normal lymphocytes and leukemic cell lines.* J Biol Chem, **1991**, 266, 506-509.
103. Jackson RC, Weber G, Morris HP. *IMP dehydrogenase, an enzyme linked with proliferation and malignancy.* Nature, **1975**, 256, 331-333.
104. Ratcliffe AJ. *Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase inhibitors for the treatment of autoimmune diseases.* Curr Opin Drug Discovery Devel, **2006**, 9, 595-605.
105. Chen L, Pankiewicz KW. *Recent development of IMP dehydrogenase inhibitors for the treatment of cancer.* Curr Opin Drug Discovery Devel, **2007**, 10, 403-412.

## Literatura

106. Olah E, Kokeny S, Papp J, Bozsik A, Keszei M. *Modulation of cancer pathways by inhibitors of guanylate metabolism*. Adv Enzyme Regul, **2006**, 46, 176-190.
107. Nair V, Shu Q. *Inosine Monophosphate Dehydrogenase (IMPDH) as a Probe in Antiviral Drug Discovery*. Antiviral Chem Chemother, **2007**, 18, 245-258.
108. Chong CR, Qian DZ, Pan F, Wei Y, Pili R, Sullivan DJ Jr, Liu JO. *Identification of type I Inosine Monophosphate Dehydrogenase as an Antiangiogenic Drug Target.*, J Med Chem, **2006**, 49, 2677-2680.
109. Shahabadi N, Kalar ZM, Moghadam NH. *DNA interaction studies of a Platinum (II) complex containing an antiviral drug, ribavirin: The effect of metal on DNA binding*. Spectrochim Acta Part A: Molecul Biomolecul Spectroscopy, **2012**, 96, 723-728.
110. [http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB6426440.html](http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB6426440.html), data odwiedzenia strony 06.04.2014.
111. Wingard JR, Hess AD, Stuart RK, Saral R, Bums WH. *Effect of several antiviral agents on human lymphocyte functions and marrow progenitor cell proliferation.*, Antimicrob Agents Chemother, **1983**, 23, 593-597.
112. Sidwell RW, Robins RK, Hillyard IW. *Ribavirin: an antiviral agent.*, Pharmacol Ther, **1979**, 6, 123-146.
113. Wyde PR. *Respiratory syncytial virus (RSV) disease and prospects for its control.*, Antiviral Res, **1998**, 39, 63-79.
114. Fernandez-Larson R, Patterson JL. *Ribavirin is an inhibitor of human immunodeficiency virus reverse transcriptase.*, Mol Pharmacol, **1990**, 36, 766-770.
115. Main J, McCarron B, Thomas HC. *Treatment of chronic viral hepatitis.*, Antiviral Chem Chemother, **1998**, 9, 449-460.
116. Kawasaki Y. *Mizoribine: A New Approach in the Treatment of Renal Disease.*, Clin Develop Imm, **2009**, 2009, 1-10.
117. Petrelli R, Vita P, Torquati I, Felczak K, Wilson DJ, Franchetti P, Cappellacci L. *Novel inhibitors of inosine monophosphate dehydrogenase in patent literature of the last decade.*, Recent Pat Anticancer Drug Discov, **2013**, 8, 103-125.

118. Yang N, Wang Q, Wang W, Wang J, Li F, Tan S, Cheng M. *The design, synthesis and in vitro immunosuppressive evaluation of novel isobenzofuran derivatives.*, Bioorg Med Chem Lett, **2012**, 22, 53-56.
119. Cholewinski G, Malachowska-Ugarte M, Dzierzbicka K. *The Chemistry of Mycophenolic Acid – Synthesis and Modifications Towards Desired Biological Activity.* Curr Med Chem, **2010**, 17, 1926-1941.
120. Malachowska-Ugarte M, Cholewinski G, Dzierzbicka K, Trzonkowski P. *Synthesis and biological activity of novel mycophenolic acid conjugates containing nitro-acridine/acridone derivatives.* Eur J Med Chem, **2012**, 54, 197-201.
121. Felczak K, Vince R, Pankiewicz KW. *NAD-based inhibitors with anticancer potential.* Bioorg Med Chem Lett, **2014**, 24, 332-336.
122. Sunohara K, Mitsuhashi S, Shigetomi K, Ubukata M. *Discovery of N-(2,3,5-triazoyl)mycophenolic amide and mycophenolic epoxyketone as novel inhibitors of human IMPDH.* Bioorg Med Chem Lett, **2013**, 23, 5140-5144.
123. Wu H, Pagadala J, Yates ChR, Miller DD, Mahato RI. *Synthesis and characterization of an anti-apoptotic immunosuppressive compound for improving the outcome of islet transplantation.* Bioconjugate Chem, **2013**, 24, 2036-2044.
124. Chen Z, Zheng Z, Huang H, Song Y, Zhang X, Ma J, Wang B, Zhang Ch, Ju J. *Penicacids A-C, three new mycophenolic acid derivatives and immunosuppressive activities from the marine-derived fungus Penicillium sp. SOF07.* Bioorg Med Chem Lett, **2012**, 22, 3332-3335
125. Elbarbry FA, Fawzy A, Shoker AS. *Therapeutic drug measurement of mycophenolic acid derivatives in transplant patients.*, Clinical Biochem, **2007**, 40, 752-764.
126. Halverstam CP, Lebwohl M. *Nonstandard and off-label therapies for psoriasis.* Clin Dermatol, **2008**, 26, 546-553.
127. Baudouin V, Alberti C, Lapeyraque AL, Bensman A, André JL, Broux F, Vailliez M, Decramer S, Niaudet P, Deschénes G, Jacqz-Aigrain E, Loirat Ch. *Mycophenolate mofetil for steroid-dependent nephrotic syndrome: a phase II Bayesian trial.* Pediatr Nephrol, **2012**, 27, 389-396.

128. Saint-Marcoux F, Guignonis V, Decramer S, Gandia P, Ranchin B, Parant F, Bessenay L, Libert F, Harambat J, Bouchet S, Broux F, Compagnon P, Marquet P. *Development of a Bayesian estimator for the therapeutic drug monitoring of mycophenolate mofetil in children with idiopathic nephrotic syndrome*. Pharmacol Res, **2011**, *63*, 423-431.
129. Gargah TTG, Lakhoua MR. *Mycophenolate mofetil in treatment of childhood steroid-resistant nephrotic syndrome*. J Nephrol, **2011**, *24*, 203-207.
130. Zeher M, Doria A, Lan J, Aroca G, Jayne D, Boletis I, Kiepe F, Prestele H, Bernhardt P, Amoura Z. *Efficacy and safety of enteric-coated mycophenolate sodium in combination with two glucocorticoid regimens for the treatment of active lupus nephritis*. Lupus, **2011**, *20*, 1484-1493.
131. Takebe N, Cheng X, Wu S, Bauer K, Goloubeva OG, Fenton RG, Heyman M, Rapoport AP, Badros A, Shaughnessy J, Ross D, Meisenberg B, Tricot G. *Phase I clinical trial of inosine monophosphate dehydrogenase inhibitor mycophenolate mofetil (cellcept) in advanced multiple myeloma patients*. Clin Cancer Res, **2004**, *10*, 8301-8308.
132. Chen L, Wilson DJ, Labello NP, Jayaram HM, Pankiewicz KW. *Mycophenolic acid analogs with a modified metabolic profile*. Bioorg Med Chem, **2008**, *16*, 9340-9345.
133. Lai G, Anderson WK. *Synthesis of Novel Indole Analogues of Mycophenolic Acid as Potential Antineoplastic Agents*. Tetrahedron, **2000**, *56*, 2583-2590.
134. El-Araby ME, Bernacki RJ, Makara GM, Pera PJ, Anderson WK. *Synthesis, molecular modeling, and evaluation of nonphenolic indole analogs of mycophenolic acid*. Bioorg Med Chem, **2004**, *12*, 2867-2879.
135. Watkins WJ, Chen JM, Cho A, Chong L, Collins N, Fardis M, Huang W, Hung M, Kirschberg T, Lee WA, Liu X, Thomas W, Xu J, Zeynaqlzadegan A, Zhang J. *Phosphonic acid-containing analogues of mycophenolic acid as inhibitors IMPDH*. Bioorg Med Chem Lett, **2006**, *16*, 3479-3483.
136. Małachowska M, Cholewiński G, Dzierzbicka K, Wardowska A, Trzonkowski P. *Kwas mykofenolowy i jego analogi. Synteza i aktywność biologiczna*. Wiad Chem, **2009**, *63*, 309-332.
137. Anuszevska E. L., *Gazeta Farmaceutyczna*, **2010**, *5*, 36-38.

138. Browne SM, Al.-Rubeai M. *Defining viability in mammalian cell cultures*. Biotech Lett, **2011**, 33, 1745-1749.
139. Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A, *A practical note on the use of cytotoxicity assays*. Int J Pharm, **2005**, 288, 369-376.
140. 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, 145-152.
141. Duque K, 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.
142. 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.
143. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. *Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction*. Biotechnol Annu rev, **2005**, 11, 127-152.
144. Denizot F, Lang R. *Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability*. J Immunol Methods, **1986**, 83, 271-277.
145. Mosmann T. *Rapidly colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, **1983**, 65, 55-63.
146. Krzystoń-Russjan J, Książek I, Anuszevska E. *Porównanie użyteczności testów MTT i EZAU stosowanych do oceny cytotoksyczności ksenobiotyków*. Farm Pol, **2009**, 65, 395-402.
147. Collier AC, Pritsos ChA. *The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT assay*. Biochem Pharmacol, **2003**, 66, 281-287.
148. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJM, Liu YJ, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB. *Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood*. Blood, **2010**, 116, e74-e80.

149. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. *Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cell.*, *Annu Rev Immunol*, **2009**, *27*, 669-692.
150. Zhou L, Somasundaram R, Nederhof RF, Dijkstra G, Faber KN, Peppelenbosch MP, Fuhler GM. *Impact of Human Granulocyte and Monocyte Isolation Procedures on Functional studies.* *Clin and Vac Immunol*, **2012**, *19(7)*, 1065-1074.
151. Randolph GJ, Jakubzick C, Qu C. *Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells.* *Curr Opin Immunol*, **2008**, *20*, 52-60.
152. Qu C, Brinck-Jensen NS, Zang M, Chen K. *Monocyte-derived dendritic cells: targets as potent antigen-presenting cells for the design of vaccines against infectious diseases.* *Intern J Infect Diseases*, **2014**, *19*, 1-5.
153. Rossol M, Kraus S, Pierer M, Baerwald C, Wagner U. *The CD14(bright) CD16+ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population.* *Arthritis Rheum*, **2012**, *64*, 671–677.
154. Ingersoll MA, Spanbroek R, Lottaz C, Gautier EL, Frankenberger M, Hoffmann R, Lang R, Haniffa M, Collin M, Tacke F, Habenicht AJ, Ziegler-Heitbrock L, Randolph GJ. *Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets.* *Blood*, **2010**, *115*, e10–19.
155. Ghosh HS, Cisse B, Bunin A, Lewis KL, Reizis B. *Continuous expression of the transcription factor e2-2 maintains the cell fate of mature plasmacytoid dendritic cells.* *Immunity*, **2010**, *33*, 905–916.
156. Liu K, Victora GD, Schwickert TA, Guermonprez P, Meredith MM, Yao K, Chu FF, Randolph GJ, Rudensky AY, Nussenzweig M. *In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis.* *Science*, **2009**, *324*, 392–397.
157. Belz GT, Nutt SL. *Transcriptional programming of the dendritic cell network.* *Nat Rev Immunol*, **2012**, *12*, 101–113.
158. Randolph GJ, Inaba K, Robbiani DF, Steinman RM, Muller WA. *Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo.* *Immunity*, **1999**, *11*, 753–761.

## Literatura

159. Geissmann F, Jung S, Littman DR. *Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties*. Immunity, **2003**, *19*, 71-82.
160. Serbina NV, Pamer EG. *Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2*. Nat Immunol, **2006**, *7*, 311–317.
161. Varol C, Landsman L, Fogg DK, Greenshtein L, Gildor B, Margalit R, Kalchenko V, Geissmann F, Jung S. *Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells*. J Exp Med, **2007**, *204*, 171–180.
162. Waskow C, Liu K, Darrasse-Jeze G, Guermonprez P, Ginhoux F, Merad M, Shengelia T, Yao K, Nussenzweig M. *The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues*. Nat Immunol, **2008**, *9*, 676-683.
163. Sallusto F, Lanzavecchia A. *Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha*. J Exp Med, **1994**, *179*, 1109-1118.
164. Romani N, Gruner S, Brang D, Kämpgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G. *Proliferating dendritic cell progenitors in human blood*. J Exp Med, **1994**, *180*, 83-93.
165. Jakubzick C, Bogunovic M, Bonito AJ, Kuan EL, Merad M, Randolph GJ. *Lymph-migrating, tissue-derived dendritic cells are minor constituents within steady state lymph nodes*. J Exp Med, **2008**, *205*, 2839-2850.
166. Schoenborn JR, Wilson CB. *Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses*. Adv Immunol, **2007**, *96*, 41-101.
167. Pacheco R, Prado CE, Barrientos MJ, Bernales S. *Role of dopamine in the physiology of T-cells and dendritic cells*. J Neuroimmuno, **2009**, *216*, 8-19.
168. Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, Heath WR. *Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signaling*. Nature, **1998**, *393*, 478-480.

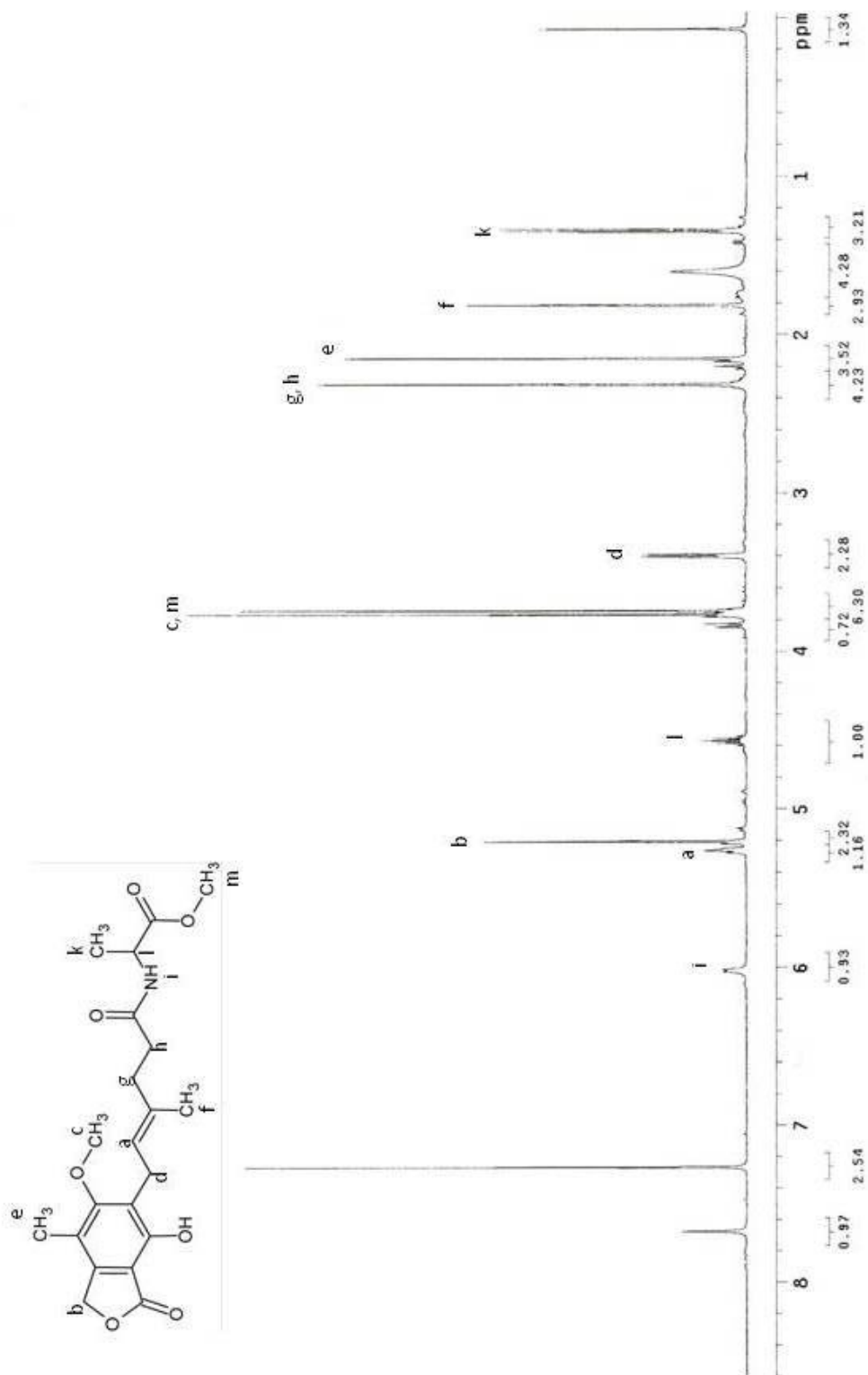


## Literatura

169. Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. *A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell.* Nature, **1998**, 393, 474-478.
170. Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ. *T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions.* Nature, **1998**, 393, 480-483.
171. Banchereau J, Steinman RM. *Dendritic cells and the control of immunity.* Nature, **1998**, 392, 245-252.
172. Lanzavecchia A, Sallusto F. *Regulation of t cell immunity by dendritic cells.* Cell, **2001**, 106, 263-266.
173. McGeachy MJ, Cua DJ. *Th17 cell differentiation: the long and winding road.* Immunity, **2008**, 28, 445-453.
174. Nouri-Shirazi M, Banchereau J, Fay J, Palucka K. *Dendritic cell based tumor vaccines.* Immunol Lett, **2000**, 74, 5-10.
175. Cosentino M, Fietta AMM, Ferrari M, Rasini E, Bombelli R, Carcano E, Saporiti F, Meloni F, Marino F, Lecchini S. *Human CD4+CD25+ regulatory T cells selectively express tyrosine hydroxylase and contain endogenous catecholamines subserving an autocrine/paracrine inhibitory functional loop.* Blood, **2007**, 109, 632-642.
176. Arendt A, Kołodziejczyk A, Sokołowska T. *Ćwiczenia laboratoryjne z chemii organicznej.* Politechnika Gdańska, **1980**, 131-140.

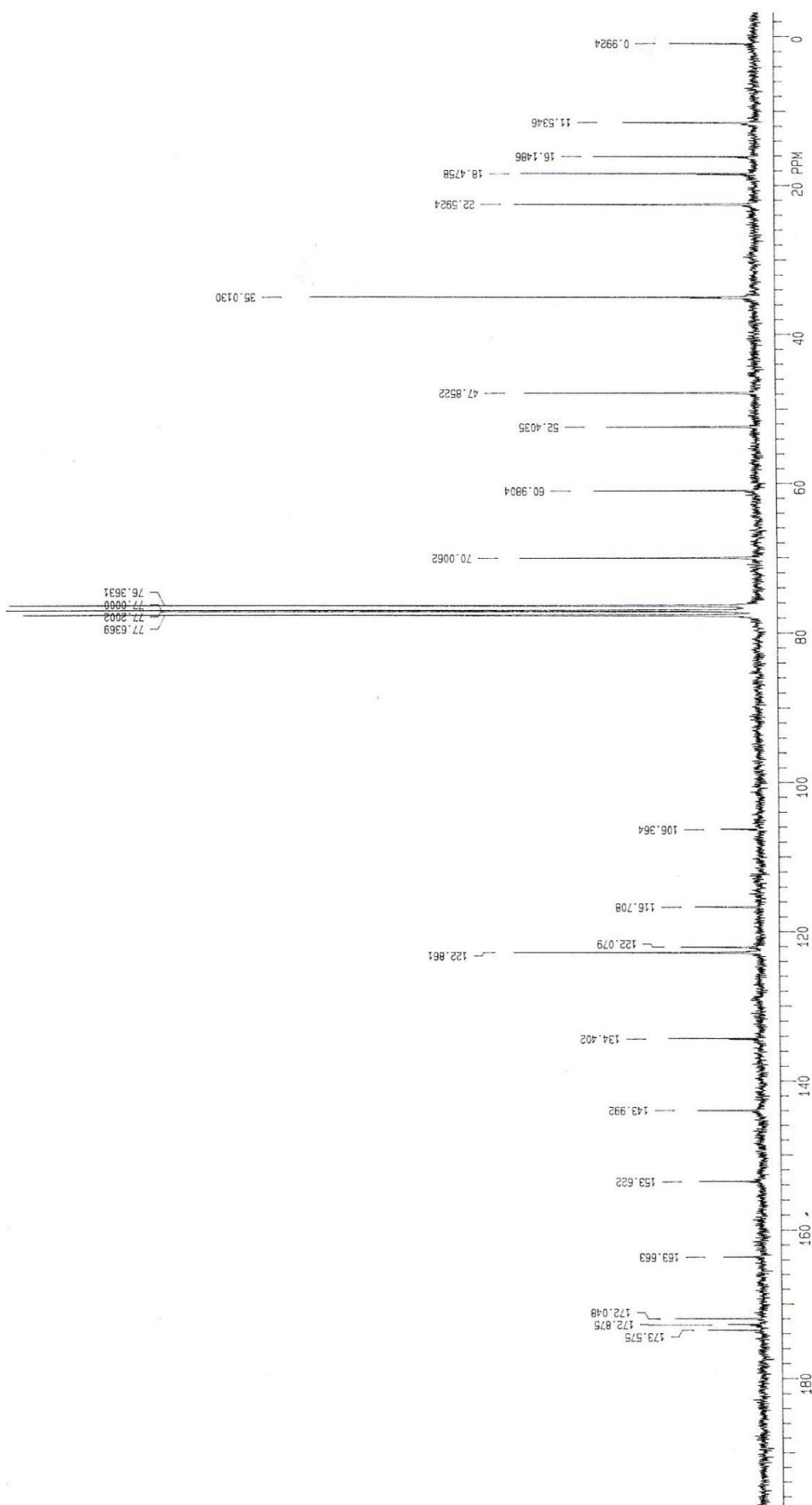
9. WIDMA  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR I MS PRZYKŁADOWYCH ZWIĄZKÓW

$^1\text{H}$  NMR - ester metylowy *N*-mykofenoilo-L-alaniny 49b



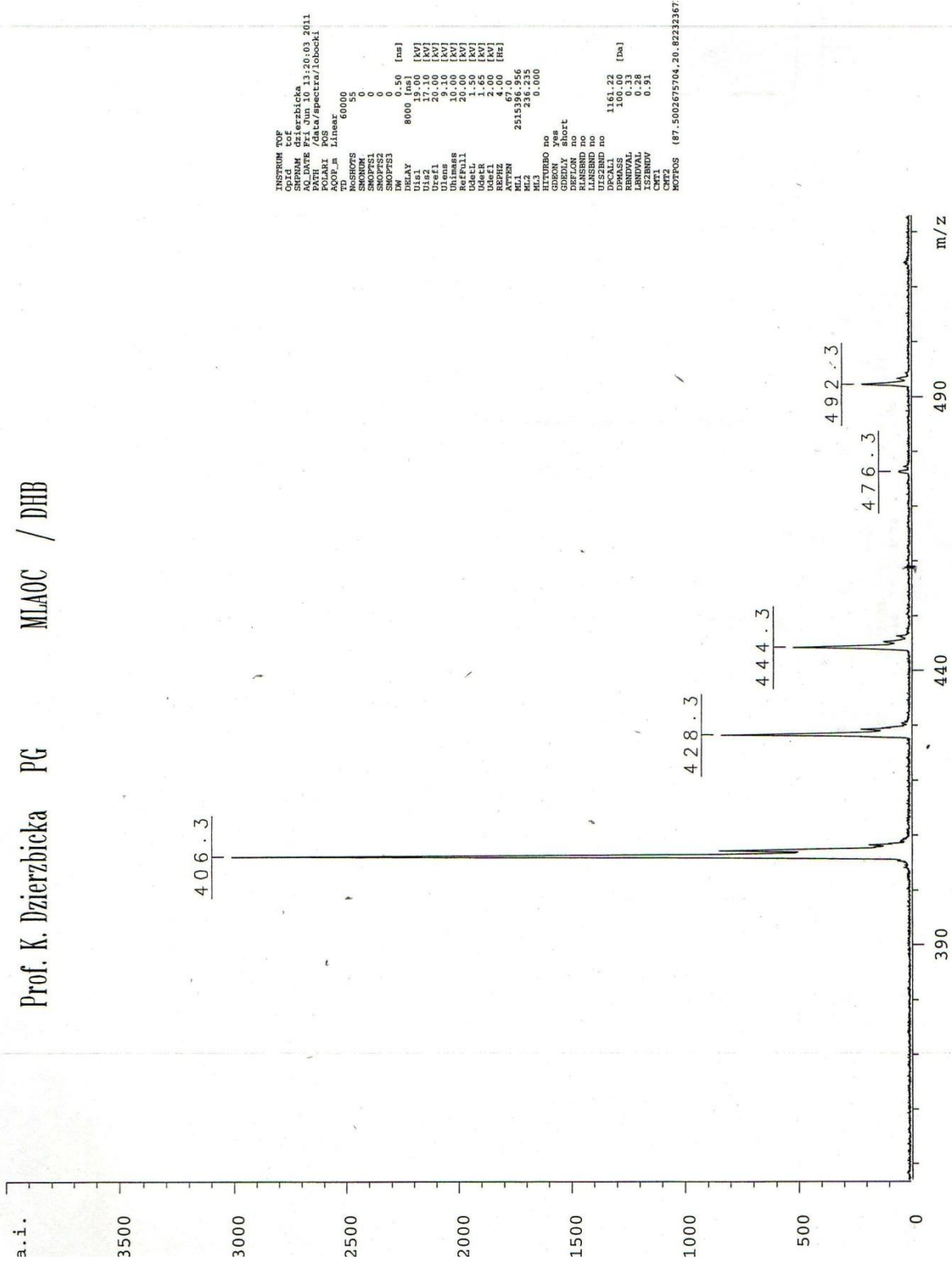
Widma przykładowych związków

<sup>13</sup>C NMR - ester metylowy *N*-mykofenoilo-*L*-alaniny 49b



MS - ester metylowy N-mykofenoilo-L-alaniny 49b

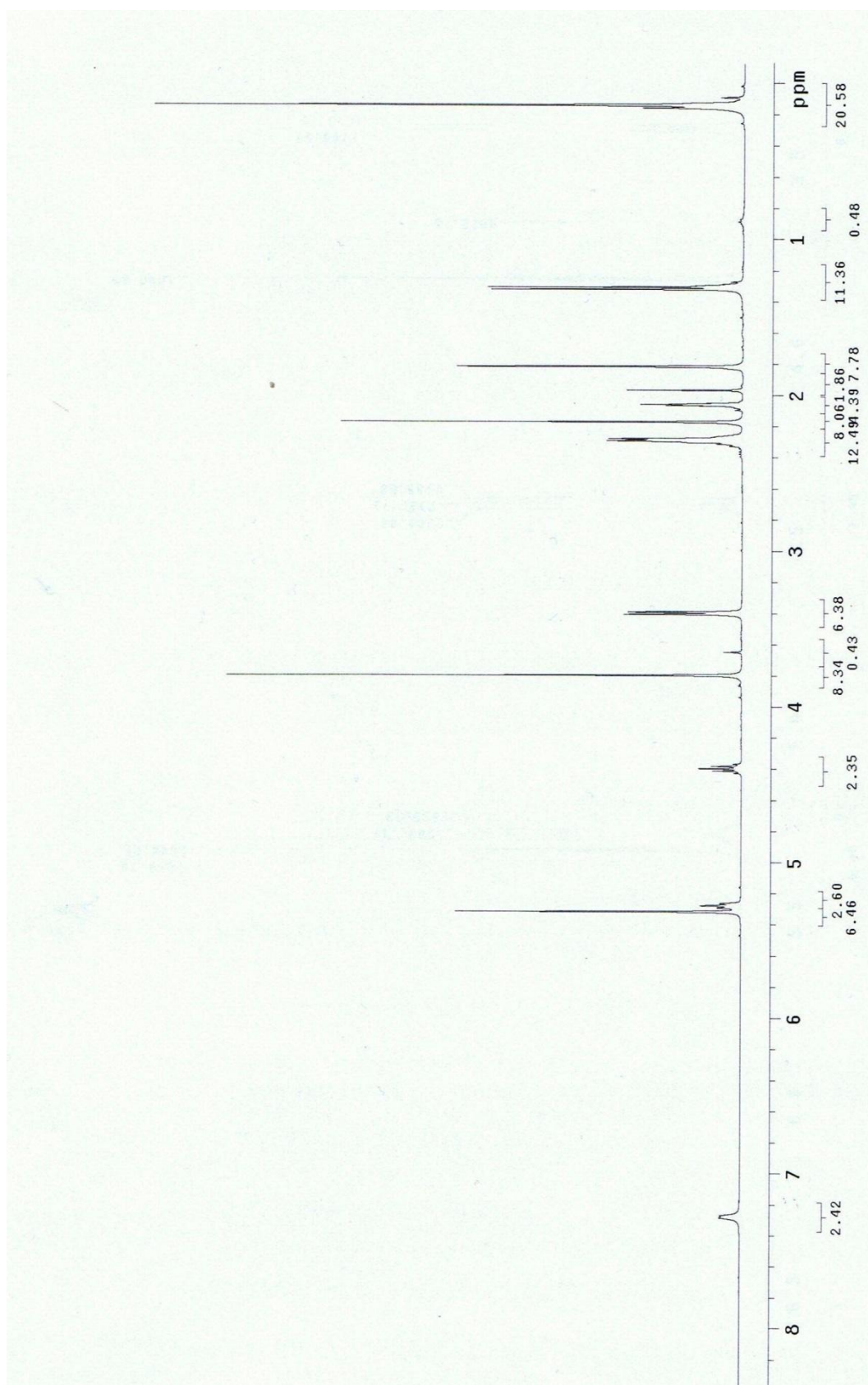
Prof. K. Dzierzbicka PG MLAOC / DHB



INSTRUM TOF  
Opis tof  
Człd DMB  
dzierzbicka  
AQ\_DATE Fri Jun 10 13:20:03 2011  
PATH /data/spectra/lobocki  
MS  
Acq\_M Linear  
TO 60000  
NSHOWS 55  
SNOWFS1 0  
SNOWFS2 0  
SNOWFS3 0  
IM 0.50 [ns]  
DELAY 8000 [ns]  
U1s1 17.00 [KV]  
U1s2 17.00 [KV]  
Uref1 20.00 [KV]  
U1ens 9.10 [KV]  
RefFull 20.00 [KV]  
UdelL 1.50 [KV]  
UdelR 1.50 [KV]  
UdelT 2.00 [KV]  
REPHZ 4.00 [Hz]  
ATTEN 25153.67  
ML1 236.235  
ML2 236.235  
ML3 0.000  
GDEON yes  
GDELY short  
DEFLOW no  
LANSRD no  
USZBRD no  
SPRVAL 1161.25  
DPMAS 100.00 [Da]  
RENTVAL 0.33  
LBNVAL 0.28  
LBNWV 0.31  
CMT2  
NOTES (87.5002675704.20.82232367)

/data/spectra/lobocki/dzierzbicka/0\_P19\_1SLin/pdata/1 tof Fri Jun 10 13:21:08 2011

$^1\text{H}$  NMR - *N*-mykofenoilo-L-alanina 50b



$^{13}\text{C}$  NMR - *N*-mykofenoilo-L-alanina 50b

