



Imię i nazwisko autora rozprawy: mgr inż. Michał Prejs

Dyscyplina naukowa: Nauki Chemiczne, Chemia

## ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim: „**Synteza i badania biologiczne nowych analogów kwasu mykofenolowego z pochodnymi adenozyiny jako potencjalnych leków immunosupresyjnych**”

Tytuł rozprawy w języku angielskim: „**Synthesis and biological activity of new analogues of mycophenolic acid with adenosine derivatives as potential immunosuppressive drugs**”

Promotor  <i>podpis</i>	Drugi promotor  <i>podpis</i>
Prof. dr hab. inż. Krystyna Dzierzbicka	<Tytuł, stopień, imię i nazwisko>
Promotor pomocniczy  <i>podpis</i>	Kopromotor  <i>podpis</i>
Dr inż. Grzegorz Cholewiński	<Tytuł, stopień, imię i nazwisko>

*Składam serdeczne podziękowania*

*Moim Promotorom:*

*prof. Krystynie Dzierzbickiej*

*i dr inż. Grzegorzowi Cholewińskiemu*

*za opiekę merytoryczną, poświęcony czas  
oraz pomoc podczas powstawania niniejszej pracy.*

*Prof. Piotrowi Trzonkowskiemu*

*za wsparcie naukowe oraz wszelką udzieloną pomoc*

*Pani mgr Anicie Dobyszyk*

*za nieocenioną pomoc laboratoryjną oraz współpracę*

*Rodzicom*

*za pomoc oraz ogromne wsparcie.*

## SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW I SYMBOLI.....	6
STRESZCZENIE.....	9
WSTĘP.....	11
1. CZĘŚĆ LITERATUROWA.....	12
1.1. Immunologia transplantacyjna.....	12
1.2. Adenozyzna.....	16
1.2.1. Budowa chemiczna, funkcja, metabolizm i transport.....	16
1.2.2. Receptory adenozyzny.....	17
1.2.3. Charakterystyka biologiczna adenozyzny.....	19
1.2.4. Adenozyzna a układ immunologiczny.....	20
1.2.5. Wybrane analogi adenozyzny i ich aktywność biologiczna.....	21
1.3. Kwas mykofenolowy (MPA).....	28
1.3.1. Mechanizm działania.....	29
1.3.2. Charakterystyka biologiczna MPA na przykładzie MMF i MPS.....	30
1.3.3. Synteza MPA.....	32
1.3.4. Klinicznie stosowane analogi MPA.....	36
1.3.5. Wybrane analogi MPA i ich aktywność biologiczna.....	37
2. CEL I ZAKRES PRACY.....	46
3. OMÓWIENIE WYNIKÓW PRACY.....	49
3.1. Prace syntetyczne.....	49
3.1.1. Synteza aminoalkilowych pochodnych adenozyzny.....	49
3.1.2. Synteza aminoalkilowych pochodnych adenozyzny z MPA.....	50
3.1.3. Synteza aminokwasowych analogów adenozyzny.....	52
3.1.4. Deprotekcja osłony Fmoc z aminokwasowych pochodnych adenozyzny.....	54
3.1.5. Synteza aminokwasowych pochodnych adenozyzny z MPA.....	55
3.1.6. Deprotekcja osłony izopropylidenu z koniugatów MPA zawierających aminokwasowe pochodne adenozyzny.....	56
3.2. Omówienie wyników badań biologicznych.....	57
3.2.1. Analiza przeżywalności komórek testem MTT.....	58
3.2.2. Oznaczenie aktywności cytotoksycznej metodą MTT aminoalkilowych pochodnych adenozyzny oraz ich koniugatów z MPA wobec linii komórkowej Jurkat i aktywowanych limfocytów (PBMC).....	59
3.2.3. Analiza aktywności proliferacyjnej metodą inkorporacji TdR-3H.....	64
3.2.4. Wybór analogów MPA o najkorzystniejszych parametrach biologicznych.....	68
3.2.5. Oznaczenie stabilności analogów przez komórki Jurkat na przykładzie związków z wykorzystaniem chromatografii HPLC-MS.....	71
4. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA.....	75
4.1. Materiały / odczynniki zastosowane podczas prac syntetycznych pochodnych aminoalkilowych, aminokwasowych oraz ich koniugatów z MPA.....	76
4.2. Synteza aminoalkilowych pochodnych adenozyzny.....	77
4.2.1. Synteza $N^6$ -(2-aminoetylo)adenozyzny <b>97a</b> .....	77
4.2.2. Synteza $N^6$ -(3-aminopropylo)adenozyzny <b>97b</b> .....	77
4.2.3. Synteza $N^6$ -(4-aminobutylo)adenozyzny <b>97c</b> .....	78
4.2.4. Synteza $N^6$ -(5-aminopentylo)adenozyzny <b>97d</b> .....	78
4.2.5. Synteza $N^6$ -(6-aminoheksylo)adenozyzny <b>97e</b> .....	78
4.2.6. Synteza $N^6$ -(8-aminooktylo)adenozyzny <b>97f</b> .....	79
4.2.7. Synteza $N^6$ -(10-aminodecylo)adenozyzny <b>97g</b> .....	79
4.2.8. Synteza $N^6$ -(12-aminododecylo)adenozyzny <b>97h</b> .....	80
4.3. Synteza koniugatów MPA z pochodnymi adenozyzny.....	80

4.3.1. Synteza <i>N</i> -mykofenoilo- <i>N</i> <sup>6</sup> -(2-aminoetylo)adenozyny <b>98a</b> .....	80
4.3.2. Synteza <i>N</i> -mykofenoilo- <i>N</i> <sup>6</sup> -(3-aminopropylo)adenozyny <b>98b</b> .....	81
4.3.3. Synteza <i>N</i> -mykofenoilo- <i>N</i> <sup>6</sup> -(4-aminobutylo)adenozyny <b>98c</b> .....	81
4.3.4. Synteza <i>N</i> -mykofenoilo- <i>N</i> <sup>6</sup> -(5-aminopentylo)adenozyny <b>98d</b> .....	82
4.3.5. Synteza <i>N</i> -mykofenoilo- <i>N</i> <sup>6</sup> -(6-aminoheksylo)adenozyny <b>98e</b> .....	82
4.3.6. Synteza <i>N</i> -mykofenoilo- <i>N</i> <sup>6</sup> -(8-aminooktylo)adenozyny <b>98f</b> .....	83
4.3.7. Synteza <i>N</i> -mykofenoilo- <i>N</i> <sup>6</sup> -(10-aminodecylo)adenozyny <b>98g</b> .....	83
4.3.8. Synteza <i>N</i> -mykofenoilo- <i>N</i> <sup>6</sup> -(12-aminododecylo)adenozyny <b>98h</b> .....	84
4.4. Synteza chronionych aminokwasowych pochodnych adenozyne.....	84
4.4.1. Synteza estru 2',3'- <i>O</i> -izopropylidenoadozylo-5'-wego kwasu <i>N</i> -(fluorenylometyloksykarbonylo)-3-aminopropionowego <b>104a</b> .....	84
4.4.2. Synteza estru 2',3'- <i>O</i> -izopropylidenoadozylo-5'-wego kwasu <i>N</i> -(fluorenylometyloksykarbonylo)-6-aminoheksanowego <b>104b</b> .....	85
4.4.3. Synteza estru 2',3'- <i>O</i> -izopropylidenoadozylo-5'-wego kwasu <i>N</i> -(fluorenylometyloksykarbonylo)-7-aminoheptanowego <b>104c</b> .....	85
4.4.4. Synteza estru 2',3'- <i>O</i> -izopropylidenoadozylo-5'-wego kwasu <i>N</i> -(fluorenylometyloksykarbonylo)-8-aminooktanowego <b>104d</b> .....	86
4.4.5. Synteza estru 2',3'- <i>O</i> -izopropylidenoadozylo-5'-wego kwasu <i>N</i> -(fluorenylometyloksykarbonylo)-11-aminoundekanowego <b>104e</b> .....	86
4.5. Deprotekcja Fmoc chronionych aminokwasowych pochodnych adenozyne.....	86
4.5.1. Synteza estru 2',3'- <i>O</i> -izopropylidenoadozylo-5'-wego kwasu 3-aminopropionowego <b>105a</b> .....	87
4.5.2. Synteza estru 2',3'- <i>O</i> -izopropylidenoadozylo-5'-wego kwasu 6-aminoheksanowego <b>105b</b> .....	87
4.5.3. Synteza estru 2',3'- <i>O</i> -izopropylidenoadozylo-5'-wego kwasu 7-aminoheptanowego <b>105c</b> .....	87
4.5.4. Synteza estru 2',3'- <i>O</i> -izopropylidenoadozylo-5'-wego kwasu 8-aminooktanowego <b>105d</b> .....	87
4.5.5. Synteza estru 2',3'- <i>O</i> -izopropylidenoadozylo-5'-wego kwasu 11-aminoundekanowego <b>105e</b> .....	87
4.6. Synteza koniugatów MPA z aminokwasowymi pochodnymi adenozyne.....	87
4.6.1. Synteza estru 2',3'- <i>O</i> -izopropylidenoadozylo-5'-wego kwasu <i>N</i> -mykofenoilo-3-aminopropionowego <b>99a</b> .....	88
4.6.2. Synteza estru 2',3'- <i>O</i> -izopropylidenoadozylo-5'-wego kwasu <i>N</i> -mykofenoilo-6-aminoheksanowego <b>99b</b> .....	88
4.6.3. Synteza estru 2',3'- <i>O</i> -izopropylidenoadozylo-5'-wego kwasu <i>N</i> -mykofenoilo-7-aminoheptanowego <b>99c</b> .....	89
4.6.4. Synteza estru 2',3'- <i>O</i> -izopropylidenoadozylo-5'-wego kwasu <i>N</i> -mykofenoilo-8-aminooktanowego <b>99d</b> .....	89
4.6.5. Synteza estru 2',3'- <i>O</i> -izopropylidenoadozylo-5'-wego kwasu <i>N</i> -mykofenoilo-11-aminoundekanowego <b>99e</b> .....	90
4.7. Deprotekcja koniugatów MPA z aminokwasowymi pochodnymi adenozyne .....	90
4.7.1. Ester adenozylo-5'-owy kwasu <i>N</i> -mykofenoilo-3-aminopropionowego <b>100a</b> .....	90
4.7.2. Ester adenozylo-5'-owy kwasu <i>N</i> -mykofenoilo-6-aminoheksanowego <b>100b</b> .....	91
4.7.3. Ester adenozylo-5'-owy kwasu <i>N</i> -mykofenoilo-7-aminoheptanowego <b>100c</b> .....	91
4.7.4. Ester adenozylo-5'-owy kwasu <i>N</i> -mykofenoilo-8-aminooktanowego <b>100d</b> .....	92
4.7.5. Ester adenozylo-5'-owy kwasu <i>N</i> -mykofenoilo-11-aminoundekanowego <b>100e</b> .....	92
4.8. Materiały stosowane w badaniach biologicznych.....	92
4.8.1. Linie komórkowe.....	93
4.8.2. Podłoża hodowlane.....	94
4.9. Metody stosowane w badaniach biologicznych.....	94

4.9.1. Hodowla linii komórkowej Jurkat.....	94
4.9.1.1. Pasażowanie linii komórkowej.....	94
4.9.1.2. Rozmrażanie linii komórkowej.....	94
4.9.1.3. Mrożenie linii komórkowej.....	94
4.9.2. Przygotowanie rozcieńczeń pochodnych adenozyiny i koniugatów MPA.....	95
4.9.3. Uzyskiwanie mononuklearnych komórek krwi obwodowej (PBMC).....	95
4.9.4. Test kolometryczny MTT.....	96
4.9.4.1. Linia komórkowa Jurkat.....	96
4.9.4.2. PBMC.....	96
4.9.5. Test inkorporacji tymidyny znakowanej trytem.....	97
5. PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....	98
6. SUMMARY.....	101
7. DOROBEK NAUKOWY.....	102
8. LITERATURA.....	103
9. Widma $^1\text{H}$ NMR, $^{13}\text{C}$ NMR i MS przykładowych związków.....	111

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW I SYMBOLI

$^1\text{H}$ NMR	–	protonowy magnetyczny rezonans jądrowy
AcMPAG	–	acylowany glukuronid kwasu mykofenolowego
ADO	–	adenozyna
AMP	–	adenozyno-5'-monofosforan
ATG	–	przeciwciała przeciwko tyreoglobulinie
ATP	–	adenozyno-5`-trifosforan
BTEA-NO <sub>2</sub>	–	bromek benzylotrimetyloamoniowy
CD39	–	enzym 1-hydrolazytrifosforanonukleotydu
CD73	–	enzym ekto-5`-nukleotydyazy
CDI	–	karbonylodiimidazol
CPM	–	liczba zliczeń na minutę (ang. <i>counts per minute</i> )
CsA	–	cyklosporyna
DCC	–	<i>N,N'</i> -dicykloheksylokarbodiimid
dGTP	–	deoksyguanozynotrifosforan
DIBAL	–	wodorek diizobutyloglinowy
DIC	–	1,3-diizopropylokarbodiimid
DIPEA	–	<i>N,N</i> -diizopropyloetyloamina (zasada Hüniga)
DIPT	–	diizopropylotryptamina
DMAP	–	4-dimetyloaminopirydyna
DMF	–	<i>N,N</i> -dimetyloformamid
DMSO	–	dimetylosulfotlenek
DNA	–	kwas dezoksyrybonukleinowy
DPPA	–	azydek difenylofosforu
EC <sub>50</sub>	–	stężenie 50 % dawki skutecznej
EC-MPS	–	sól sodowa kwasu mykofenolowego w postaci tabletek dojelitowych
EDCI	–	chlorowodorek 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropylo)karbodiimidu
F	–	test Fishera
FBS	–	płodowa surowica wołowa (ang. <i>fetal bovine serum</i> )
Fmoc	–	grupa fluorenylo-9-metoksykarbonylowa
GMP	–	guanozynomonofosforan
GTP	–	guanozynotrifosforan
HLA	–	ludzkie antygeny leukocytarne (ang. <i>human leukocyte antigens</i> )

HOBt	–	<i>N</i> -hydroksybenzotriazol
HPLC	–	wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. <i>high-performace liquid chromatography</i> )
HPLC-MS	–	chromatografia cieczowa ze spektrometrem masowym
IC <sub>50</sub>	–	stężenie hamujące proliferację komórek w 50 % w stosunku do komórek kontrolnych
		funkcje biologiczne i biochemiczne organizmów)
in.	–	inni
IMPDH	–	dehydrogenaza inozyno-5'-monofosforanu
iNOS	–	syntaza tlenu azotu
MMF	–	mykofenolan mofetylu
MPA	–	kwasy mykofenolowy
MPAG	–	glukuronid kwasu mykofenolowego
MPS	–	mykofenolan sodu
MS	–	spektrometria mas (ang. <i>mass spectrometry</i> )
MTT	–	bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowy
NAD	–	dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
NBS	–	<i>N</i> -bromosukcynoimid
NCS	–	<i>N</i> -chlorosukcynoimid
NMM	–	<i>N</i> -metylomorfolina
NMR	–	spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. <i>nuclear magnetic resonance</i> )
PBMC	–	komórki jednojądrowe krwi obwodowej (ang. <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PBS	–	buforowany fosforanem roztwór soli fizjologicznej (0,9 % NaCl, pH 7,2)
Ph	–	fenyl
Py	–	pirydyna
PyBOP	–	heksafluorofosforan (benzotriazol-1-ilo)butylofosfoniowy
RNA	–	kwasy rybonukleinowy
RPMI	–	podłoże hodowlane (ang. <i>roswell park memorial institute medium</i> )
SAM	–	( <i>S</i> )-adenozylometionina
SI	–	współczynnik selektywności
SPE	–	ekstrakcja do fazy stałej (ang. <i>solid phase extraction</i> )

T3P	–	bezwodnik propylofosforanowy (ang. <i>propylphosphonic anhydride</i> )
TBTU	–	<i>O</i> -(benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametyluronian tetrafluoroboranu
TdR-3H	–	metyl-[ <sup>3</sup> H]-tymidyny
TEA	–	trietyloamina
temp. pok.	–	temperatura pokojowa
temp. top.	–	temperatura topnienia
TFA	–	kwas trifluorooctowy
THF	–	tetrahydrofuran
TK	–	takrolimus
TLC	–	chromatografia cienkowarstwowa (ang. <i>thin layer chromatography</i> )
TMSCl	–	chlorek trimetylosililu
TNF	–	czynnik martwicy nowotworów (ang. <i>tumor necrosis factor</i> )
wyd.	–	wydajność



## STRESZCZENIE

Co roku przeprowadza się na całym świecie ponad 100 000 przeszczepów narządów. Leczenie immunosupresyjne zapobiega odrzutom poprzez zahamowanie lub zmniejszenie odpowiedzi immunologicznej biorcy na antygeny przeszczepu [1]. Podawane na tym etapie leki muszą być nie tylko efektywne, ale także jak najmniej toksyczne, zwłaszcza, iż leczenie trwa do końca życia. Jednymi z najważniejszych substancji aktywnych są pochodne kwasu mykofenolowego (MPA): mykofenolan mofetylu (MMF) oraz mykofenolan sodu (EC-MPS) [2]. Istotnym ograniczeniem terapeutycznym w leczeniu immunosupresyjnym przy użyciu MPA jest jego metabolizm do nieaktywnego biologicznie 7-*O*-glukuronidu. Celem ograniczenia efektów ubocznych występujących podczas terapii poszukuje się związków mniej toksycznych, bardziej selektywnych oraz mniej podatnych na glukoronidyzację. Właśnie w tą tematykę badawczą wpisuje się moja praca doktorska.

Zakres niniejszej pracy obejmował syntezę koniugatów MPA z pochodnymi adenozyiny oraz wykonanie testów aktywności biologicznej nowych analogów jako potencjalnych związków immunosupresyjnych.

Część chemiczna pracy obejmowała otrzymywanie zaprojektowanych pochodnych adenozyiny opartych o proste struktury łańcuchowe diamin alifatycznych i aminokwasów oraz utworzenie przy ich pomocy nowych koniugatów z MPA. W tym celu pochodne adenozyiny zsyntezowałem wykorzystując odpowiednio metodę opisaną przez Bressi i in. [3] opartą o substytucję nukleofilową diamin (oraz *N*-Boc-diaminami) do 6-chloropuryny. Po deprotekcji przy pomocy TFA poszczególnych produktów wykorzystałem określone odczynniki kondensujące w odpowiednich warunkach reakcji (EDCI/DMAP, CDI, T3P, DPPA/TEA, DCC/NMM, TBTU/HOBt) w celu utworzenia wiązania amidowego z MPA. W ten sposób uzyskałem pochodne adenozyiny oraz odpowiadające im koniugaty MPA.

Drugą grupą związków były pochodne adenozyiny zawierające reszty aminokwasowe, które otrzymałem za pomocą reakcji Fmoc chronionych aminokwasów z 2',3'-*O*-izopropylidenoadenozyną wykorzystując reakcję estryfikacji Yamaguchi oraz metodę DCC. Następnie poddałem je deprotekcji w roztworze dietyloaminy w chlorku metylenu (1:1 v/v), po czym użyłem do kondensacji z MPA posługując się metodą mieszanych bezwodników oraz różnymi odczynnikiem kondensującymi (EDCI/HOBt, T3P, EEDQ/Py, PyBOP). W ten sposób otrzymałem nowe koniugaty MPA, z których usunąłem grupę izopropylidenową przy pomocy TFA, otrzymując końcowe analogi MPA. Wszystkie związki otrzymałem z dobrą

wydajnością i scharakteryzowałem za pomocą technik spektroskopowych ( $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR) jak również analitycznych (TLC, HPLC-MS).

Część biologiczna pracy obejmowała zbadanie wszystkich otrzymanych związków *in vitro* wykorzystując limfoidalną linię komórkową Jurkat oraz mononuklearne komórki krwi obwodowej (PBMC) pochodzące od zdrowych dawców. W celu wyznaczenia parametru cytotoksyczności  $\text{IC}_{50}$  określiłem na podstawie testu żywotności MTT, z kolei aktywność antyproliferacyjną  $\text{EC}_{50}$  ustaliłem metodą inkorporacji TdR-3H. Otrzymane wyniki dla obu grup związków zestawiałem odpowiednio z adenozyną i kwasem mykofenolowym, zarówno w postaci pochodnej 2',3'-*O*-izopropylidenowej, jak i wolnej. Następnie wyznaczyłem współczynniki selektywności, zdefiniowane jako  $\text{SI}=\text{IC}_{50}/\text{EC}_{50}$ .

Aminowe pochodne adenozyiny wykazywały większą aktywność w porównaniu do adenozyiny w badaniach z udziałem obydwu linii komórkowych. Analogi MPA z pochodnymi aminoalkilowymi adenozyiny były aktywne w porównaniu do MPA wobec linii komórkowej Jurkat. Natomiast wyniki biologiczne dla koniugatów MPA zawierających aminokwasowe pochodne adenozyiny wykazały aktywność podobną do MPA oraz estrowych koniugatów kwasu mykofenolowego i adenozyiny (**69**) i (**69a**) opisanych w literaturze [85]. Zauważalna była korelacja pomiędzy długością łańcucha aminokwasowego a aktywnością biologiczną w koniugatach MPA posiadających aminokwasowe pochodne adenozyiny.

Praca została sfinansowana z grantu Narodowego Centrum Nauki (NCN)

Nr 2013/11/B/NZ7/04838.

## WSTĘP

Jedynym skutecznym sposobem leczenia niewydolności narządów jest przeszczep allogeniczny wraz z terapią immunosupresyjną zapobiegającą odrzuceniu. Celem immunosupresji klinicznej jest całkowite zahamowanie lub częściowe zmniejszenie odpowiedzi immunologicznej biorcy na antygeny przeszczepu. W tym celu stosuje się leczenie skojarzone oparte na aplikacji zestawu leków o różnym mechanizmie działania, których podstawową aktywnością jest zahamowanie odpowiedzi immunologicznej, zapobieganie ostremu odrzuceniu przeszczepu i tym samym wydłużeniu przeżywalności po operacji. Jednym z powszechnie używanych immunosupresantów w leczeniu transplantologicznym jest kwas mykofenolowy w połączeniu np: z cyklosporyną.

Kwas mykofenolowy odgrywa ważną rolę w leczeniu immunosupresyjnym jak również w chorobach autoimmunologicznych jako niekompetycyjny inhibitor IMPDH, niezbędnego enzymu pośredniczącego w syntezie puryny w komórkach T i B. Powoduje również obniżenie poziomu czynników przeciwapoptotycznych takich jak: białka z rodziny Bcl-2, Bcl-xL w chłoniakach B-komórkowych oraz akumulację pro-apoptycznych mediatorów (kaspazy 3) poprzez aktywację szlaku apoptotycznego, powodującego zaburzenia wysepek trzustkowych [4]. W celu polepszenia efektywności oraz biodostępności MPA, bada się jego połączenia ze związkami aktywnymi biologicznie, które są dla organizmu rozpoznawalne, przez co łatwiej przyswajalne. Do tej grupy związków należy adenozyina.

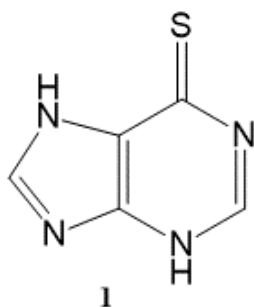
Adenozyina jest nukleozydem zbudowanym z adeniny połączonej z rybozą przez łącznik  $\beta$ -N<sup>9</sup>-glikozydowy. W organizmie ludzkim jest ważnym endogenicznym hormonem (ochronnym tkanek) występującym w prawie wszystkich komórkach w obszarach zwiększonego metabolizmu tkanki, jak również zwalcza dysfunkcję narządów w szeregu stanach patologicznych. Adenozyina indukuje apoptozę wielu typów komórek rakowych w dwóch odrębnych ścieżkach. Pierwsza, zewnętrzna, polega na wiązaniu się z czterema receptorami sprzężonymi z białkiem G o nazwie A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>, A<sub>3</sub>. Druga droga, wewnętrzna, charakteryzuje się wnikaniem adenozyiny do komórek poprzez transportery i przekształcenie w AMP [5, 6]. Do tej pory otrzymano i opisano wiele analogów adenozyiny wykazujących działanie przeciwartymiczne, przeciwzapalne czy przeciwnowotworowe. W rezultacie na rynku pojawiły się leki takie jak: Adenocard czy Adenoscan, które pomagają w leczeniu chorób mięśnia sercowego.



# 1. CZĘŚĆ LITERATUROWA

## 1.1. Immunologia transplantacyjna

Transplantologia jako dziedzina nauki zajmująca się przeszczepianiem tkanek oraz narządów zaistniała już w XIX wieku. Pierwszą potwierdzoną przez Departament Zdrowia i Opieki Społecznej Stanów Zjednoczonych transplantację skóry wykonano w 1869 roku. Od tamtego czasu transplantolodzy starali się rozwiązać dwa problemy. Pierwszym było ukrwienie przeszczepianego organu, co wymagało opracowania metody wykonywania zespolenia chirurgicznego naczyń krwionośnych. Drugim zaś, trudniejszym było kontrolowanie odpowiedzi immunologicznej pacjenta w celu zapobiegnięcia odrzutu przeszczepu od innego dawcy. Już na początku 1900 roku Alexis Carrel przezwyciężył pierwszy problem, wykazując wykonalność zszycia naczyń krwionośnych, co pozwoliło na późniejszy rozwój metod transplantacji narządów unaczynionych takich jak nerka i serce, za co w 1912 roku otrzymał Nagrodę Nobla. Druga przeszkoda ujawniająca się jedynie w czasie przeszczepu pomiędzy członkami danej populacji, została zbadana dopiero w 1940 roku w pracach Petera Madewara. Kilkanaście lat później, w 1954 roku Joseph E. Murray przeprowadził pierwszą udaną transplantację nerki. Jednak sukces był połowiczny, gdyż przeszczep wykonano pomiędzy bliźniętami jednojajowymi co spowodowało brak odpowiedzi immunologicznej z powodu identyczności genetycznej. Pięć lat później Murray dokonuje udanej transplantacji pomiędzy braćmi nieidentycznymi genetycznie. Te badania przyczyniły się do zaproponowania przez Roberta Schwartza i Williama Samasheka leku immunosupresyjnego jakim jest 6-merkaptopuryna (**1**) (Rys. 1), którego metylnitroimidazolową pochodną (**2**) Murray użył w 1962 roku podczas przeszczepu nerki odnotowując sukces dłuższego przeżycia pacjenta. To odkrycie doprowadziło do przyznania jemu i E. Donnall Thomasowi w 1990 roku Nagrody Nobla [7, 8]. W roku 1950 wykonano pierwszy udany przeszczep całego organu i od tego czasu takie operacje są wykonywane niemal rutynowo. Jednak ta ratująca i poprawiająca jakość życia metoda leczenia wiąże się z koniecznością stosowania do końca życia leków immunosupresyjnych.

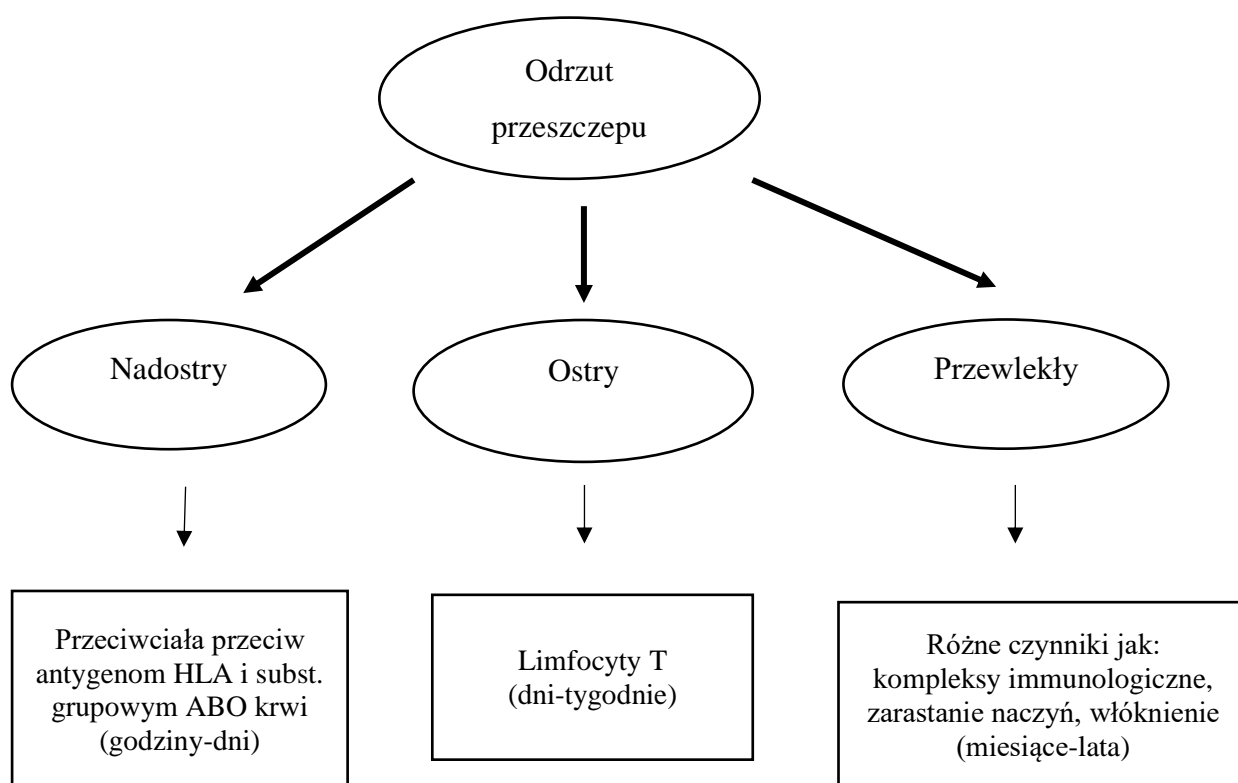


Rys. 1. Jeden z pierwszych prekursorów dzisiejszych leków immunosupresyjnych 6-merkaptopuryna (**1**).

Immunosupresja jest terminem określającym hamowanie procesu wytwarzania przeciwciał i komórek odpornościowych (czyli reaktywności układu immunologicznego) przez różne czynniki zwane immunosupresorami. Obecnie wykorzystuje się wiele związków immunosupresyjnych o różnej budowie i mechanizmie działania. Są one stosowane przy przeszczepach narządów (np. wątroby, nerek, serca, płuc itd.) i mają na celu ograniczyć lub zahamować odpowiedź immunologiczną. W tej grupie można wyróżnić kilka typów leków immunosupresyjnych stosowanych w praktyce medycznej:

- leki cytostaticzne,
- leki działające na immunofiliny (ewerolimus, cyklosporyna itp.),
- leki antyproliferacyjne (np. MMF, MPA),
- przeciwciała monoklonalne,
- glikokortykosteroidy,
- leki nieklasyfikowane (białko wiążące TNF, interferony).

Podczas stosowania leków immunosupresyjnych, trzeba również pamiętać o skutkach ubocznych obniżonej odporności, które mogą stanowić przyczynę nowotworów złośliwych, infekcji bakteryjnych, wirusowych, uszkodzenia wątroby, serca czy płuc. Dlatego poszukuje się coraz to lepszych leków immunosupresyjnych lub udoskonala się już istniejące poprzez ich modyfikacje w celu eliminacji lub częściowego ograniczenia odrzucania przeszczepu (Schemat 1) [9].

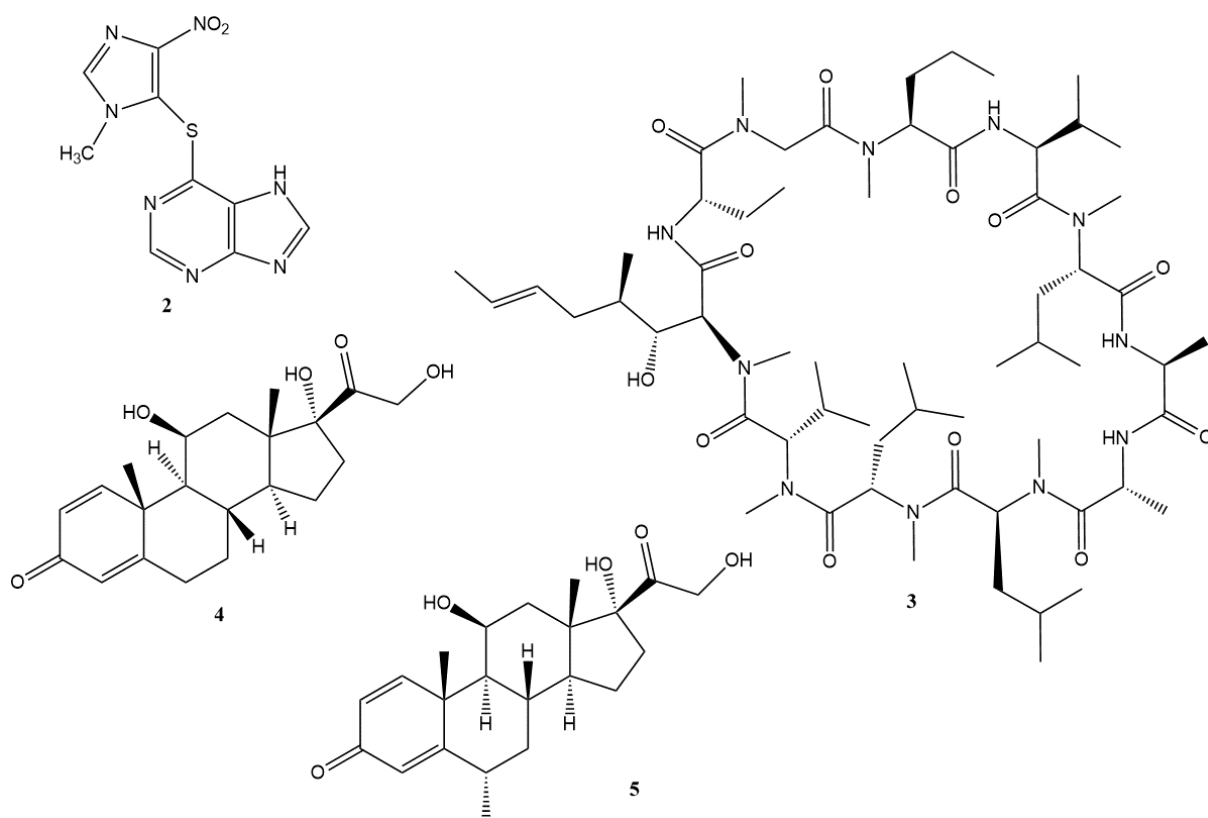


Schemat 1. Podział odrzutów przeszczepów [9].

Terapię immunosupresyjną u pacjentów zaczyna się już przed przeszczepem i kontynuuje do końca życia biorcy. Mechanizm działania leków immunosupresyjnych zależy od grupy do której one przynależą, jednak ich priorytetowym celem jest zapobieganie aktywacji limfocytów, ich proliferacji lub zmniejszeniu ich mechanizmów efektorowych (komórkowej odpowiedzi immunologicznej). Podczas terapii zazwyczaj podaje się mieszaninę trzech leków. Pierwszy hamuje produkcję cytokin (glikokortykosteroidy), drugi jest inhibitorem kalcyneuryny, zaś trzeci inhibitorem proliferacji limfocytów [10]. Poza terapią ustną lekami immunosupresyjnymi, stosuje się terapię dożylną przeciwciałami (np. ATG, bazyliksymab). Stopień immunosupresji zależy od rodzaju przeszczepionego narządu, klinicznego znaczenia niewydolności przeszczepu, indywidualnego ryzyka immunologicznego biorcy, wieku pacjenta oraz konsekwencji nadmiernej immunosupresji.

Jednym z pierwszych zastosowanych leków immunosupresyjnych była pochodna 6-merkaptopuryny (Rys. 2) czyli azatiopryna (**2**). Należy ona do leków antyproliferacyjnych, hamuje proliferację limfocytów T, jak i w mniejszym stopniu limfocytów B. Po

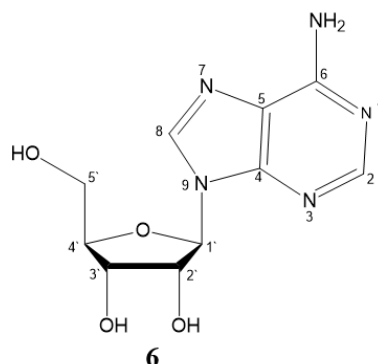
biotransformacji w wątrobie do 6-merkaptopuryny powoduje zaburzenia w syntezie DNA w limfocytach stymulowanych antygenem. Jednak produktem ubocznym biotransformacji jest metylnitroimidazol, który wykazuje działanie szkodliwe, objawiające się zwiększeniem ryzyka raka skóry. Kolejną często stosowaną substancją jest cyklosporyna (**3**). Przeciwdziała ona transkrypcji interleukiny 2 i aktywuje limfocyty T. Jednak wykazuje ona kilka efektów niepożądanych: nefrotoksyczność, nadciśnienie tętnicze, cukrzycę, hiper-cholesterolemię oraz hirsutyzm (występowanie nadmiernego owłosienia). Bazyliksymab oraz alemtuzumab należą do antylimfocytarnych przeciwciał monoklonalnych. Pierwszy zapobiega aktywacji limfocytów T, zaś drugi powoduje rozpad zarówno limfocytów T i B. Obydwa preparaty wykazują łagodne efekty uboczne. Do grupy leków glikokortykosteroidów należą prednizolon (**4**) oraz metyloprednizolon (**5**). Ich działanie jest tylko objawowe, jednak wywierają wiele efektów np. hamowanie syntezy cytokin i adhezję komórek do śródbłonka, blokują wydzielanie histaminy i leukotrienów oraz wiele innych. Powodują między innymi: nadciśnienie tętnicze, cukrzycę osteoporozę, krwawienie z przewodu pokarmowego i zmiany nastroju [11].



Rys. 2. Struktury stosowanych leków immunosupresyjnych (**2**)-(5).

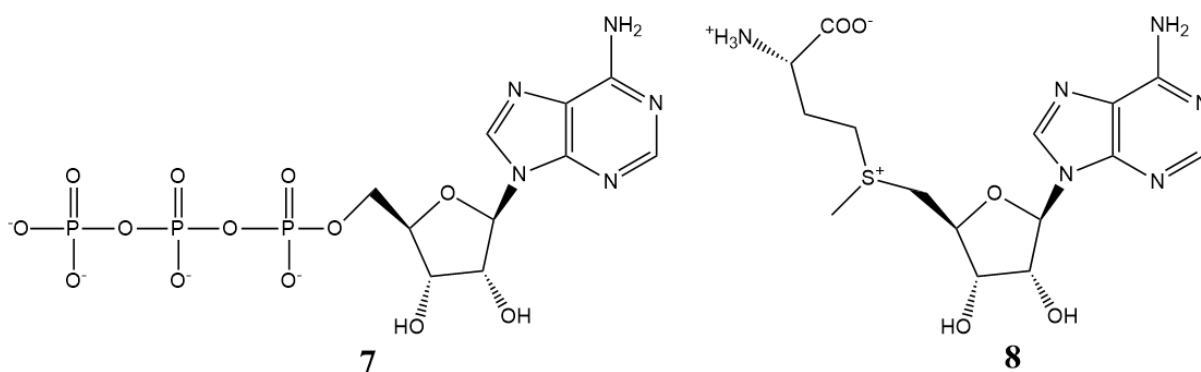
## 1.2. Adenozyna

### 1.2.1. Budowa chemiczna, funkcja, metabolizm i transport



Rys. 3. Struktura chemiczna adenozyny (6).

Adenozyna (6) (Rys. 3) zbudowana jest z adeniny i rybozy połączonej wiązaniem *N*-glikozydowym. Jest fragmentem wielu różnych biologicznie czynnych związków. Jednym z nich są kwasy nukleinowe (DNA i RNA) stanowiące materiał genetyczny. Niektóre koenzymy zawierające adenozynę odgrywają wiele istotnych funkcji w biologii komórki. Najważniejszym z nich jest ATP (7) (Rys. 4) biorący udział w transporcie energii wewnątrzkomórkowej oraz będący donorem reszty fosforanowej w reakcji fosforylacji katalizowanej przez kinazy. Natomiast (*S*)-adenozylometionina (8) (Rys. 4) jest koenzymem zawierającym adenozynę substratem (donorem grupy metylowej) w procesach metylacji. Znanych jest prawie 20 różnych zewnątrzkomórkowych receptorów błonowych oraz duża aktywność ektoenzymów, które oddziałują ze związkami zawierającymi adenozynę w swojej strukturze [12].



Rys. 4. Naturalne koenzymy zawierające adenozynę ATP (7) i SAM (8) [12].

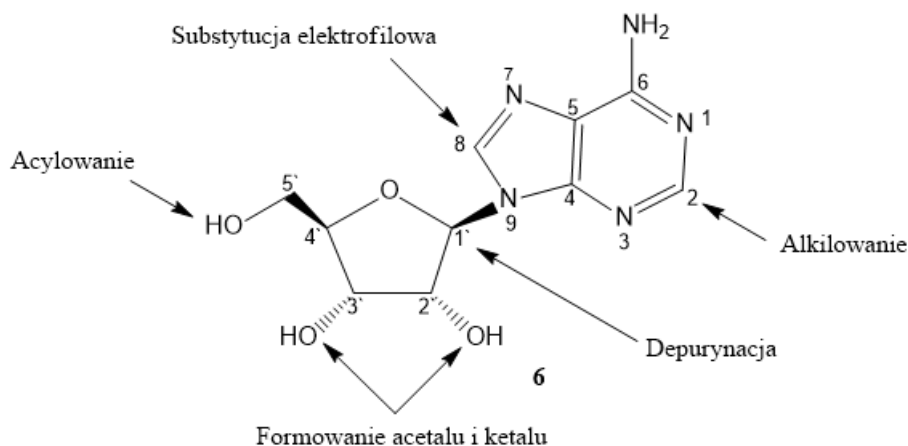


Adenozyna (**6**) odgrywa również rolę w układzie nerwowym. Wywiera bezpośredni wpływ na wiele procesów synaptycznych, szlaków sygnałowych oraz reguluje wydzielanie kilku neuroprzekaźników w ośrodkowym układzie nerwowym (hamuje wydzielanie acetylocholiny, dopaminy, noradrenaliny, serotoniny). W przeciwieństwie do klasycznego neuroprzekaźnika, nie występuje ona w pęcherzykach synaptycznych oraz nie działa wyłącznie na synapsy. Jej uwolnienie i absorpcja jest pośrednio regulowana przez dwukierunkowe transportery nukleozydowe gdzie kierunek zależy od gradientu stężenia pomiędzy cytoplazmą i przestrzenią pozakomórkową. Dlatego też, adenozyna jest uważana za neuromodulator mający wpływ na aktywność neuronalną, poprzez wiele mechanizmów uwalniania neuroprzekaźnika [12].

W warunkach stresu komórkowego, którego przyczyną może być niedotlenienie, niedokrwienie lub też stan zapalny (bodźce zewnętrzne), stężenie wewnątrzkomórkowe adenozyny znacznie wzrasta. Następuje transport adenozyny do przestrzeni pozakomórkowej, w celu ochrony narządów przed uszkodzeniem tkanek i wspomaganie ich naprawy.

### **1.2.2. Receptory adenozyny**

Burnstock i in. [13] opisali receptory purynergiczne. To właśnie przez nie puryny (adenozyna, ADP, ATP) oraz pirymidyny (UDP, UTP) wywierają pośrednio efekt biologiczny. Zaproponowano podział purynoreceptorów na dwa podtypy: P1 i P2. Podtyp P1 jest odpowiedzialny za receptory selektywne w stosunku do adenozyny oraz AMP, a podtyp P2 za receptory ATP i ADP. Dalsze podziały purynoreceptora P1 doprowadziły w końcu do indentyfikacji czterech receptorów aktywowanych przez adenozynę: A<sub>1</sub>, A<sub>2a</sub>, A<sub>2b</sub>, A<sub>3</sub>. W ostatnich latach receptory adenozynowe zostały scharakteryzowane, co pozwoliło na określenie dokładnej sekwencji głównych białek receptora. Jest to podstawa do badania struktury, funkcji i regulacji receptora na poziomie molekularnym.



Rys. 5. Chemiczne właściwości adenozyzny (6) [12].

Właściwości chemiczne adenozyzny (Rys. 5) są bardzo ważne, biorąc pod uwagę projektowanie jej analogów. Najbardziej nukleofilową grupą w cząsteczce adenozyzny jest grupa OH na węglu C5'. Może ona być acylowana selektywnie lub ze wszystkimi pozostałymi grupami OH w jednym etapie. Jeżeli chcemy acylować grupę aminową na węglu C6 musimy użyć silnego nukleofilowego katalizatora np. DMAP. Dzieje się tak za sprawą silnego rezonansu pierścienia aromatycznego oraz efektu dezaktywacji przez atomy azotu w purynie. Atom węgla C8 w pierścieniu podatny jest na reakcję substytucji elektrofilowej, najczęściej np: bromowanie. W celu wprowadzenia reszty alkilowej do grupy aminowej na węglu C6 adeniny należy użyć rybozydu 6-chloropuryny oraz odpowiedniej aminy. Istnieje również możliwość utlenienia grupy hydroksylowej na węglu C5', należy jednak pamiętać o zabezpieczeniu grup hydroksylowych na węglach C2' oraz C3'. Najbardziej powszechnym sposobem jest utworzenie acetalu i wprowadzenie grupy izopropylidenu, którą można usunąć w środowisku kwaśnym.

Właściwości terapeutyczne adenozyzny były znane już w latach trzydziestych XX wieku. Opisane do tej pory związki wykazują działanie nie tylko przeciwartmyczne, przeciwbólowe, przeciw cukrzycowe, przeciwzapalne czy przeciwnowotworowe, ale również wpływają na przebieg wielu chorób o podłożu immunologicznym, np. zapalenie stawów, zapalenie nerek, zapalenie błony naczyniowej oka czy szoku wywołanego endotoksynami. Niektóre z nich jak Adenocard® oraz Adenoscan® zostały zatwierdzone do klinicznego stosowania. Opracowuje się kolejne związki będące selektywnymi agonistami, antagonistami receptów adenozyzny. Tabela 1 przedstawia ich potencjalne zastosowanie terapeutyczne w medycynie [14].

Tabela 1. Receptory adenozyiny i ich możliwe zastosowanie terapeutyczne [14].

<b>Efekt</b>	<b>Receptory adenozyiny</b>	<b>Zastosowanie terapeutyczne</b>
Agoniści	A <sub>1</sub>	blok węzła przedsionkowo-komorowego i częstoskurcz nadkomorowy,
	A <sub>2A</sub>	zaburzenia układu oddechowego, posocznica, zespół poreperfuzyjny, zakrzepica, nadciśnienie tętnicze, choroby zapalne
	A <sub>2B</sub>	reakcje alergiczne,
	A <sub>3</sub>	niedokrwienie serca, zaburzenia rytmu serca
Antagoniści	A <sub>1</sub>	bradykardia związana z zawałem mięśnia sercowego, nagłe zatrzymanie krążenia, odrzucenie przeszczepu serca
	A <sub>2A</sub>	choroba Parkinsona, neurodegeneracja
	A <sub>2B</sub>	astma, zapalenie płuc
	A <sub>3</sub>	jaskra, astma

### 1.2.3. Charakterystyka biologiczna adenozyiny

Organizm ludzki reaguje na ciało obce (np. przeszczep) stanem zapalnym, w wyniku czego namnażają się populacje limfocytów T i B [15]. W reakcji na zaistniałe warunki patologiczne stężenie adenozyiny rośnie. Dzieje się to poprzez dwa możliwe mechanizmy: (i) wewnątrzkomórkowe tworzenie i eksport poprzez transportery nukleotydowe; (ii) pozakomórkową degradację nukleotydów adeniny (ATP i/lub ADP) uwalnianą z kilku komórek. Wewnątrzkomórkowe generowanie adenozyiny jest regulowane przez enzym cytoplazmy hydrolazy (*S*)-adenozyinohomocysteinę, która konwertuje (*S*)-adenozyinohomocysteinę do adenozyiny. Tak otrzymana adenozyina może być dostarczana do środowiska zewnątrzkomórkowego przy pomocy transporterów nukleotydowych. Alternatywną drogą jest deaminacja wewnątrzkomórkowej adenozyiny poprzez deaminazę adenozyiny lub wejście do puli nukleotydów purynowych przez aktywność kinazy adenozyiny. Z drugiej strony podczas warunków patofizjologicznych zwiększa się uwalnianie ATP z komórki przez transport i drogi wydzielnicze (np. kanały jonowe, koneksyny), uszkodzenie komórek oraz lizę. Uwolnione ATP przekształca się w adenozyinę poprzez skoordynowaną aktywność enzymów CD39 i CD73. CD39 katalizuje degradację ATP do AMP, zaś CD73 hydrolizuje AMP do adenozyiny. Tak uwolniona adenozyina wywiera swoje działanie, w zależności od stężenia osiągniętego w biofazie poprzez stymulowanie specyficznych receptorów G-proteinowych (A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>, A<sub>3</sub>) [16]. Tak zbudowany system adenozyiny odgrywa kluczową rolę w regulacji homeostazy odpornościowej. Komórki odpornościowe wyposażone są w czułe receptory adenozyiny, których głównym zadaniem jest nadzór immunologiczny i

obrona organizmu człowieka. Z drugiej strony w zależności od ekspresji receptorów, adenozyne może mieć działanie stymulujące (poprzez receptory  $A_1$ ) oraz hamujące ( $A_{2A}$  i  $A_3$ ). I tak podczas ochrony komórki przed nadmiernym uszkodzeniem oraz inicjowaniu naprawy komórki po uszkodzeniu, adenozyne pośredniczy w regresji odpornościowej przez co zapobiega rozwojowi nowotworów oraz promuje odpowiedź immunologiczną wobec komórek rakowych [16].

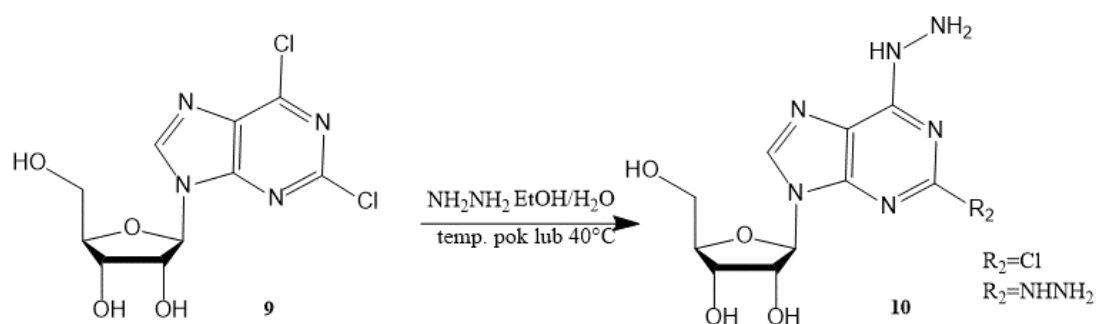
#### **1.2.4. Adenozyne a układ immunologiczny**

Od dawna wiadomo, że adenozyne jest zewnątrzkomórkową cząsteczką sygnałową, która może regulować prawie wszystkie aspekty funkcjonowania tkanek. Ostatnie badania dowiodły, że spełnia ona kluczową rolę w dostarczaniu informacji na temat regulacji różnych aspektów wewnątrz i zewnątrzkomórkowych procesu rozwoju nowotworu. Stężenie nukleozydu jest obecne fizjologicznie w małych ilościach w komórkach zdrowych, jednak może wzrosnąć w odpowiedzi na patofizjologiczny ich stan podczas np. niedotlenienia, niedokrwienia, stanu zapalnego itp. Po wyjściu z przestrzeni wewnątrzkomórkowej do pozakomórkowej adenozyne zachowują się jak substancja sygnałowa. Proces ten aktywuje receptory adenozyne skierowane w stronę komórki, co generuje rozmaite odpowiedzi komórkowe, które dążą do przywrócenia homeostazy tkanek. Akumulacja zewnątrzkomórkowej adenozyne, która objawia się podczas ostrego urazu, pokazuje ochronne działanie, które chroni komórki i tkanki przed nadmiernym zapaleniem i immunologicznym uszkodzeniem, a także wspiera samoograniczającą odpowiedź immunologiczną, która ma na celu promowanie procesu uzdrowienia. Jednak badania ukazały, że narastające stężenie adenozyne może powodować immunosupresję oraz promować bezustanny proces gojenia się ran co prowadzić może do zwłóknienia remodelującego. Przewlekły proces gromadzenia się adenozyne w środowisku nowotworu jest związany z wytworzeniem immunosupresji co sprzyja powstawaniu nowotworu. W tym wypadku adenozyne uczestniczy w tworzeniu immunologicznej odpowiedzi tolerującej mikrośrodowisko nowotworu poprzez regulowanie funkcji immunologicznej i zapaleniu komórek takich jak makrofagi, komórki dendrytyczne, supresorowe komórki z szpiku kostnego, komórki T i komórek NK. Z drugiej strony adenozyne reguluje również wzrost i rozprzestrzenianie się komórek rakowych przez zakłócanie ich proliferacji, apoptozy i angiogenezy działając poprzez receptory adenozyne, które ulegają ekspresji w komórkach nowotworowych i komórkach śródbłonna. Na przykład w przypadku guzów litych, które charakteryzują się wysokim poziomem enzymów CD39 i CD73, powodując regulację proliferacji komórek rakowych poprzez generowanie adenozyne

wewnątrz nowotworu. W dodatku deaminaza ekto-adenozyny i jego kofaktora CD26 są obniżane co prowadzi do redukcji adenozyliny i następuje wzrost sygnalizacji adenozyliny w środowisku nowotworowym. Zatem adenozylina reguluje zarówno apoptozę komórek nowotworowych jak również ich proliferację. Stąd daje się zauważyć, iż leżące u podstaw mechanizmy, które wykazują pozornie sprzeczne efekty, nie są w pełni zrozumiałe. Jednak jest prawdopodobne, że mogą one być wywołane przez działanie różnych receptorów adenozyliny w poszczególnych typach nowotworów [17-20].

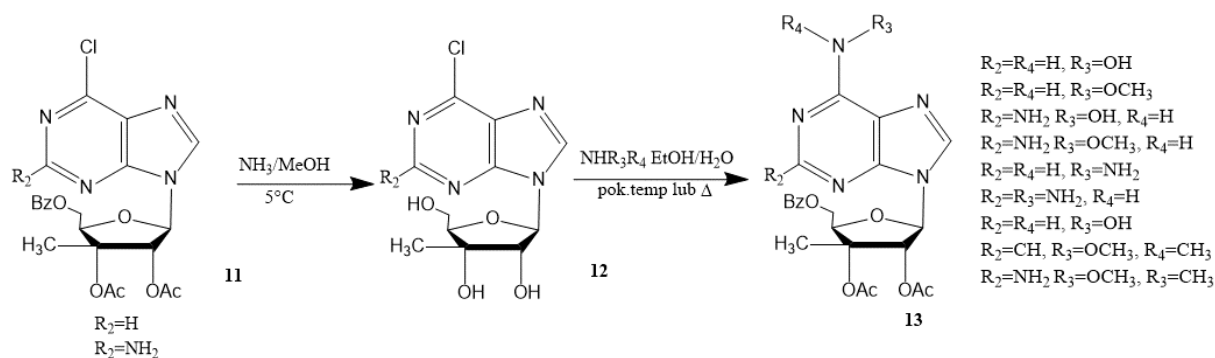
### 1.2.5. Wybrane analogi adenozyliny i ich aktywność biologiczna

Cappellacci i in. [21] otrzymali nowe przeciwnowotworowe analogi adenozyliny wykorzystując jako substrat rybozyd 2,6-dichloropuryny (**9**) (Schemat 3). Badania były oparte na modyfikacji pierścienia adeniny w pozycji C8, grupy aminowej na węglu C6 oraz na węglu C3' pierścienia rybozy. W reakcji aromatycznej substytucji nukleofilowej rybozydu 2,6-dichloropuryny (**9**) z hydrazyną otrzymano docelowe pochodne (**10**).



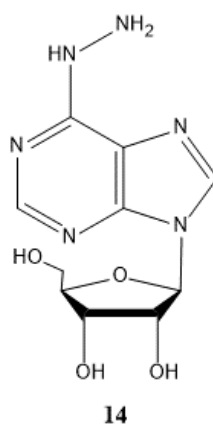
Schemat 3. Synteza *N*<sup>6</sup>-podstawionych analogów adenozyliny (**10**) [21].

W kolejnym etapie prac deprotekcja grup hydroksylowych związku (**11**) przy użyciu NH<sub>3</sub> oraz reakcja substytucji nukleofilowej w układzie aromatycznym (**12**) z odpowiednimi aminami pozwoliły otrzymać analogi rybonukleozydowe (**13**) (Schemat 4) [21].



Schemat 4. Synteza *N*<sup>6</sup>-podstawionych analogów adenozyiny (**13**) [21].

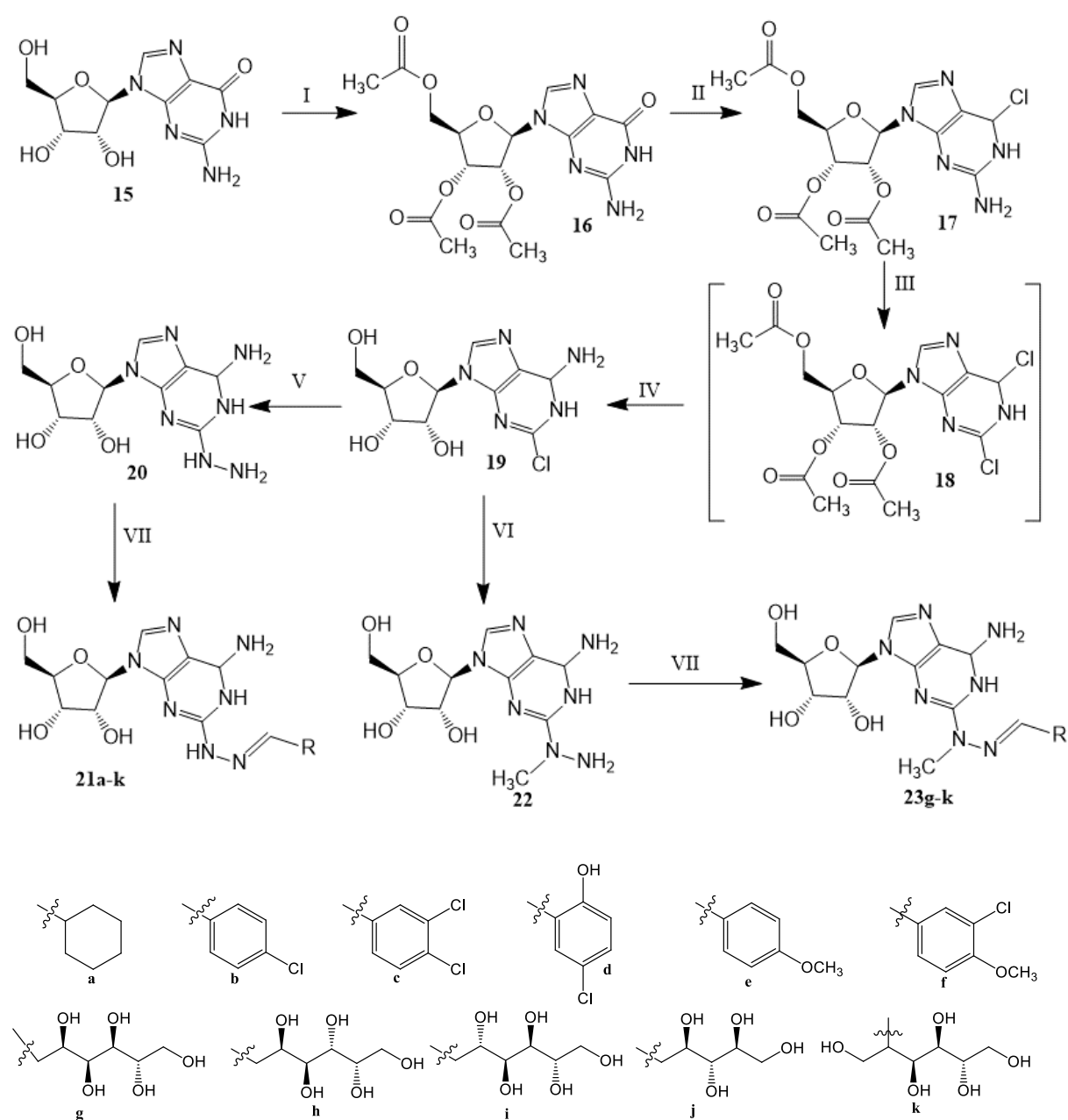
Wszystkie otrzymane związki zostały zbadane pod kątem aktywności antyproliferacyjnej na linii komórek ludzkiej białaczki szpikowej (K562), linii ludzkich komórek nowotworu szyjki macicy (HeLa), linii komórek okrężnicy (Caco-2, HT-29) oraz linii komórkowej raka piersi (MCF-7). Najbardziej aktywnym okazał się związek (**14**) pokazany na Rys. 6. Według naukowców mechanizm oddziaływania związku jest częściowo oparty o efekt inhibicji zarówno na ludzkim rekombinacie M2-M1 oraz podjednostce p53R2-M1 reduktazy rybonukleotydowej. Dzięki swojej charakterystyce o szerokim spektrum funkcjonowania posiada zdolność do hamowania wzrostu komórek również poprzez działania mutagenne.



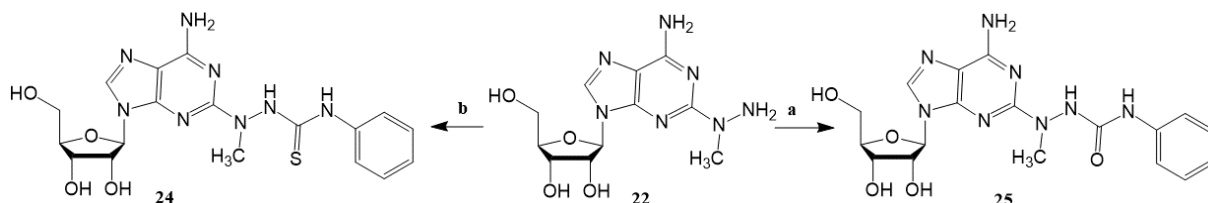
Rys. 6. *N*<sup>6</sup>-podstawiony analog adenozyiny **14** [21].

El-Tayeb i in. [22] w 2013 roku opisali pochodne 2-hydrazynoadenozyiny. Ich celem było uzyskanie związków, które wykazywałyby powinowactwo do receptorów adenozyiny i były selektywnymi agonistami. Przedstawiono również zależność pomiędzy strukturą a

aktywnością otrzymanych związków. W toku syntez przedstawionych na Schematach 5 i 6 autorzy otrzymali związki, które następnie poddali analizom radioizotopowym. W pierwszym etapie guanozynę (**15**) poddano acylowaniu do związku (**16**), następnie w reakcji chlorowania otrzymano 6-chloro-2',3',5'-acetyloguanozynę (**17**). Pochodną (**17**) przekształcono w procesie deaminacji w pochodną dichlorową (**18**). W następnych dwóch etapach wprowadzono grupę aminową w reakcji podstawienia nukleofilowego w układzie aromatycznym. Tak otrzymane związki (**19**) i (**20**) poddano addycji nukleofilowej w celu otrzymania związków (**21a-k**) oraz (**23g-k**).



Schemat 5. Synteza nukleozydów (**21a-k**) i (**23g-k**). Reagenty i warunki prowadzenia reakcji: (I) bezwodnik octowy, 4-dimetyloaminopirydyna, *N,N*-dimetyloetyloamina, acetonitryl, 1h, temp. pok.; (II) POCl<sub>3</sub>, chlorek tetraetyloammonu, *N,N*-dimetyloanilina 15-30 min, 100°C; (III) BTEA-NO<sub>2</sub>, chlorek acetylu, dichlorometan, 1h, 0°C; (IV) amoniakalny roztwór etanolu, 3 dni, temp. pok.; (V) hydrat hydrazyny, temp. pok. 10h; (VI) metylohydrazyna, temp. pok. 7h; (VII) R-CHO (**19**) lub R-HC=O (**24**), metanol, deflegmator, 3-12h [22].

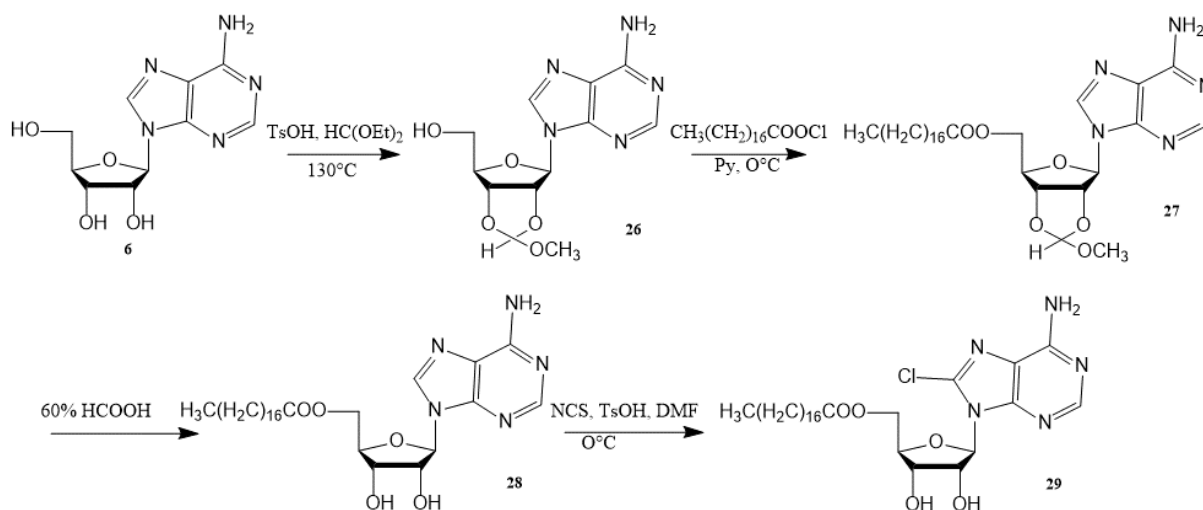


Schemat 6. Synteza nukleozydów (**24**), (**25**). Reagenty i warunki prowadzenia reakcji: (a) fenyloizocyjanian, metanol, 2h, temp. pok.; (b) fenyloizotiocyanian, metanol, 2h, temp. pok. [22].

Związek (**22**), poddano addycji nukleofilowej z fenyloizotiocyanianem do tiomocznika (**24**) oraz z fenyloizocyjanianem do mocznika (**25**). Tak otrzymane modyfikacje 2-hydrazynylo-adenozyny (**22**) zbadano względem wiązania receptora A<sub>1</sub>AR, A<sub>2A</sub>AR i A<sub>3</sub>AR przy użyciu radioligandów (odpowiednio: [<sup>3</sup>H]CCPA, na membranie kory mózgowej szczurów, [<sup>3</sup>H]CGS21680) na prążkowie mózgu szczurów oraz [<sup>3</sup>H]NECA na przygotowanej membranie ludzkiego rekombinatu wprowadzonego do komórek jajników chomika chińskiego. Najbardziej aktywnymi pochodnymi względem receptora A<sub>2A</sub>AR okazały się analogi (**21b**), (**21c**) i (**21d**).

Jiao i in. [23] opisali syntezę analogu 8-chloroadenozyny (**29**), która wykazuje obiecujące działanie na nowotwory lite i hematologiczne, a obecnie znajduje się w I fazie badań klinicznych (Schemat 7). Kolejne etapy syntezy obejmują protekcję grup hydroksylowych w pozycji 2',3' w adenozyne (**6**) otrzymując acetal (**26**). Następnie zastosowano acylowanie pierwszorzędowej grupy hydroksylowej do estru **27**, a w wyniku hydrolizy acetalu otrzymano ester (**28**). Końcowy produkt (**29**) uzyskano poprzez chlorowanie związku (**28**).

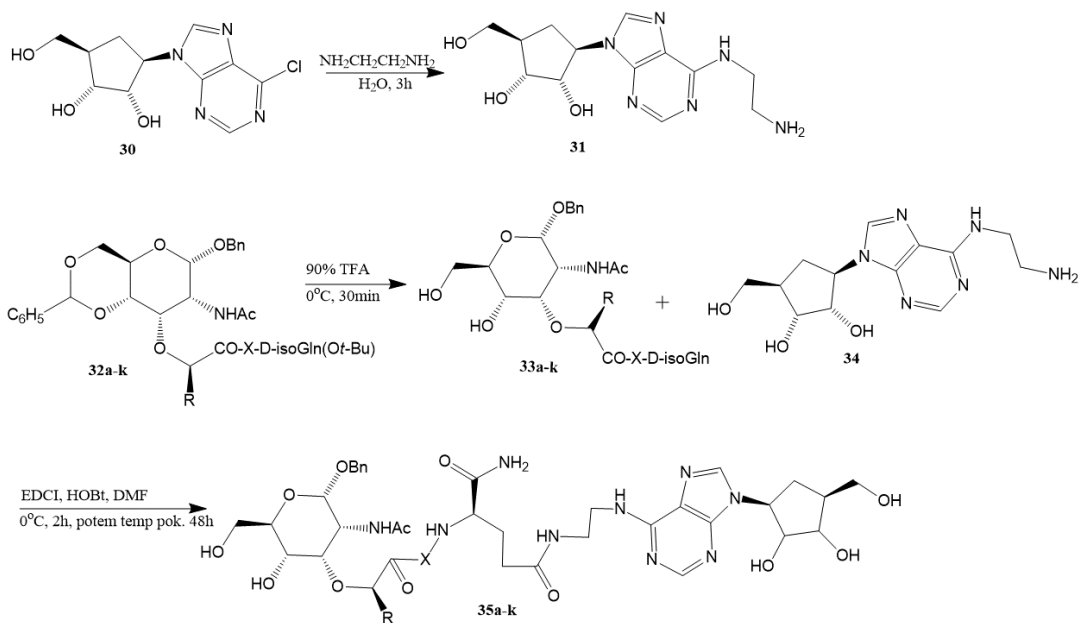




Schemat 7. Synteza 8-chloroadenosyno-5`-stearynianu (**29**) [23].

Otrzymany związek 8-chloroadenosyno-5`-stearynian (**29**) umieszczono w liposomach zbudowanych z fosfolipidów. Przygotowane w ten sposób trzy związki: 8-chloroadenosynę, 8-chloroadenosyno-5`-stearynian oraz 8-chloroadenosyno-5`-stearynian badano wobec linii komórek raka piersi (MCF-7) na myszach. Wyniki badań udowodniły, że dzięki przeprowadzonym modyfikacjom nastąpiło wydłużenie biologicznego okresu półtrwania związków w organizmie.

Samsel i in. [24] zaprezentowali koniugaty adenosyny z muramylodipeptydami zawierającymi D-aminokwasy. Synteza nowej serii związków polegała na otrzymaniu pochodnych muramylodipeptydów (MDP) i nor-muramylodipeptydów (nor-MDP) i połączeniu ich poprzez łącznik 2-aminoetylowy lub kwas 6-aminoheksanowy z adenosyną przy użyciu EDCI/HOBt lub DPPA, TEA zgodnie z Schematem 8 i 9. Wychodząc z rybozydu 6-chloropuryny (**30**) w reakcji substytucji nukleofilowej w układzie aromatycznym otrzymano *N*<sup>6</sup>-(2-aminoetylo)adenosynę (**31**), którą łączono z chronionymi MDP (**32a-e,k**) oraz nor-MDP (**32f-j**). Po hydrolizie acetalu TFA, otrzymano produkty (**33a-k**), które następnie za pomocą odczynnika kondensującego EDCI przekształcono w analogi (**35a-k**). Tak otrzymane nowe substancje zostały zbadane pod kątem aktywności antyproliferacyjnej na komórkach L1210, Jurkat oraz PBMC wywodzących się od zdrowych dawców.

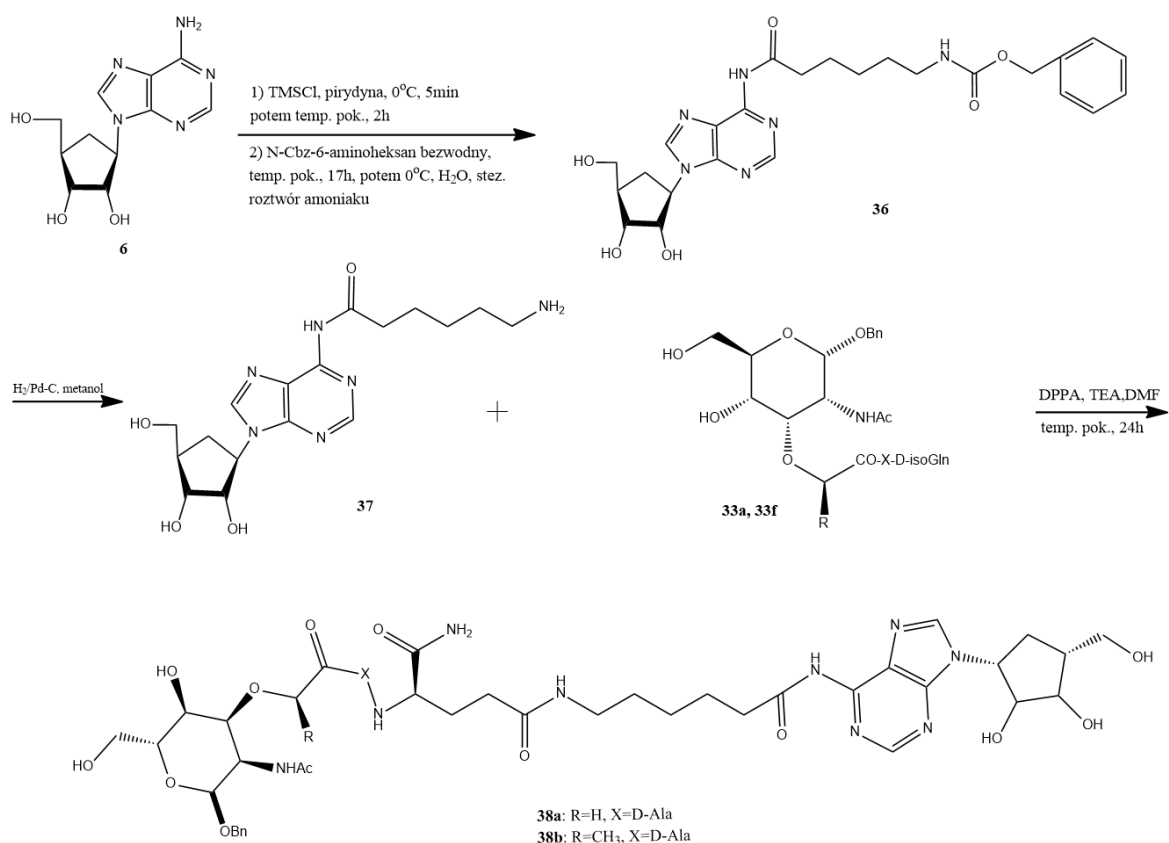


**a:** R=CH<sub>3</sub>; X=D-Ala  
**b:** R=CH<sub>3</sub>; X=D-2-ABA  
**c:** R=CH<sub>3</sub>; X=D-Pro  
**d:** R=CH<sub>3</sub>; X=D-Ser  
**e:** R=CH<sub>3</sub>; X=D-Val  
**f:** R=H; X=D-Ala  
**g:** R=H; X=D-2-ABA

**h:** R=H; X=D-Pro  
**i:** R=H; X=D-Ser  
**j:** R=H; X=D-Val  
**k:** R=CH<sub>3</sub>; X=Val

Schemat 8. Synteza *N*<sup>6</sup>-(2-aminoetylo)adenozyny i jej koniugatów [24].

Pierwszy etap syntezy koniugatów (**38a,b**) polegał na acylowaniu adenozyzny do amidu *N*<sup>6</sup>-(*N*-Boc-6-aminoheksanoilo)adenozyzny (**36**), który w wyniku katalicznego uwodornienia ulega deprotekcji do aminy (**37**). Następnie w wyniku kondensacji aminy (**37**) z (**33a**) i (**33f**) przy pomocy DPPA uzyskano amidowe koniugaty (**38a,b**).

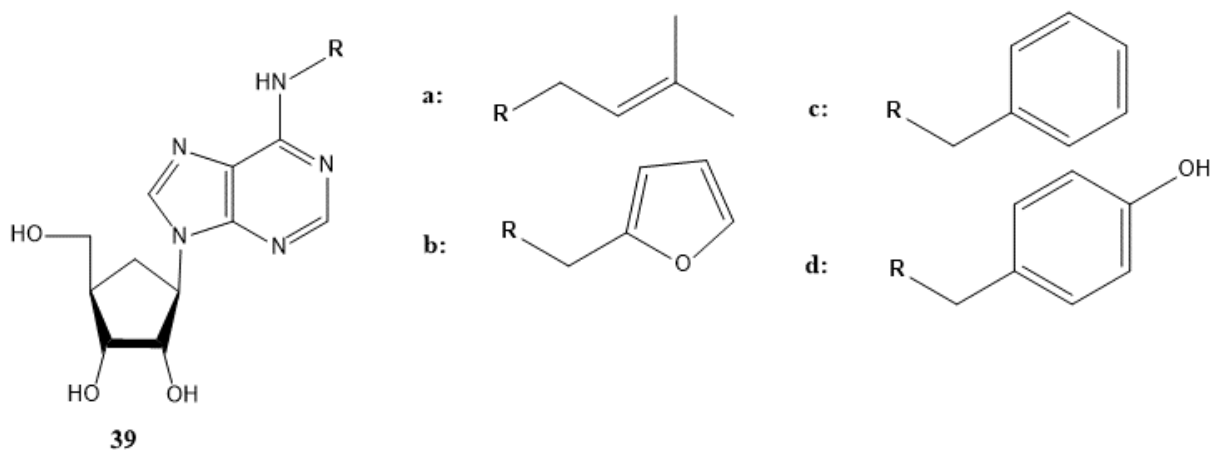


Schemat 9. Synteza koniugatów adenozyzny (**38a,b**) [24].

Badania biologiczne pokazały, że związki (**32a-k**) oraz (**33e,f,j**) były aktywne względem komórek L1210. Związki desmuramylopeptydowe wykazały lepsze właściwości antyproliferacyjne, zaś koniugaty (**35b,f,g**) wyższe współczynniki selektywności. Komórki L1210/Jurkat oraz PBMC były odporne na struktury (**38a,b**) (Schemat 9) [24].

Swami i in. [25] badali chemioterapeutyki wykorzystując nośniki jakimi były lipidowe nanocząstki. Niestety leki te posiadały dwa poważne ograniczenia: niespecyficzne ukierunkowanie i nieefektywną penetrację komórek nowotworowych. Stąd zbadano podatność danego typu guza na koniugaty adenozyzny z lipidowymi nanocząsteczkami. Badanie zostały wykonane na raku piersi oraz prostaty. Powierzchnia nanocząstek została zmodyfikowana o adenozyne w reakcji sprzęgania przy pomocy karbodiimidu. Wyniki pokazały, że ta modyfikacja zwiększyła koncentrację leku w guzie oraz zwiększenie cytotoksyczności. Według autorów adenozyzna może być użyta w takiej formie jako potencjalny lek do zwalczania guza piersi i prostaty.

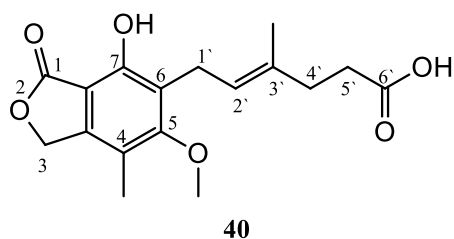
Vistoli i in. [26] zbadali naturalnie występujące pochodne adenozy (39a-d) (Rys. 7). jako inhibitory agregacji płytek krwi. Na podstawie modelowania molekularnego przy użyciu oprogramowania PLANTS autorzy stwierdzili, iż prawdopodobny mechanizm obserwowanej aktywności otrzymanych związków oparty jest na ich oddziaływaniu z receptorem P2Y<sub>12</sub> ADP.



Rys. 7. Pochodne adenozy izolowane ze źródeł naturalnych (39a-d) [26].

### 1.3. Kwas mykofenolowy (MPA)

Kwas mykofenolowy (MPA) (Rys. 8) został wyizolowany w 1896 roku przez Gosio [27]. W 1940 roku zostały odkryte jego właściwości przeciwgrzybicze i przeciwbakteryjne, jednak dopiero w 1957 określono jego strukturę [28], a dwanaście lat później Jones i in. [29] opisali jego pierwszą syntezę. Obiecująca aktywność biologiczna przyczyniła się do zainteresowania MPA, co doprowadziło do odkrycia jego kolejnych potencjalnych zastosowań terapeutycznych: przeciwwirusowych i immunosupresyjnych [30]. Obecnie związek ten jest wpisany na listę leków immunosupresyjnych stosowanych w zapobieganiu różnego rodzaju (przewlekłemu i ostremu) odrzucaniu przeszczepu.



Rys. 8. Struktura kwasu mykofenolowego (**40**).

MPA (**40**) zbudowany jest z układu ftalidowego, który zawiera grupy -OH, -OCH<sub>3</sub>, -CH<sub>3</sub> oraz łańcucha bocznego sześciowęglowego przyłączonego w pozycję 6, zawierającego wiązanie podwójne o konfiguracji *trans* i grupę karboksylową. Okazało się, że tylko izomeria *trans* dla podwójnego wiązania warunkuje aktywność biologiczną [31].

### 1.3.1. Mechanizm działania

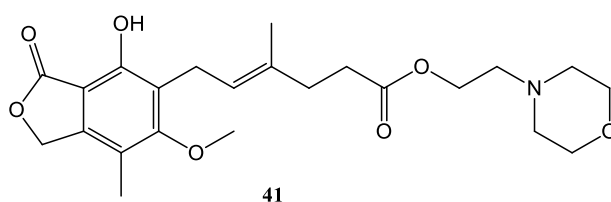
Kwas mykofenolowy (MPA) jest odwracalnym i niekompetycyjnym inhibitorem IMPDH, powodując pośrednio zahamowanie proliferacji komórek i ich różnicowanie [31]. Indukuje on również apoptozę limfocytów T stymulowanych antygenem, zmniejsza liczbę limfocytów oraz monocytów w ognisku zapalnym (hamuje migrację do przeszczepu) [32, 33].

MPA hamuje aktywność obu izoform IMPDH, jednak wykazuje 5-cio krotnie większą w stosunku do izoformy II, która występuje głównie w aktywowanych limfocytach i komórkach nowotworowych. Literatura podaje, że MPA wcześniej łączy się z kompleksem enzym-IMP-NAD poprzez subdomenę N oraz część subdomeny P, co zostało udowodnione w oparciu o struktury krystalograficzne [34, 35]. Pierścień aromatyczny kwasu wiąże się w miejscu przeznaczonym dla nikotynamidu, zaś część laktonowa na osobną część enzymu tzw. regionu PDB1JR1. Poprzez łańcuch boczny MPA oddziałuje z Ser 276 tworząc wiązanie z subdomeną P, z drugiej strony subdomena A pozostaje pusta. Zaobserwować również można oddziaływania van der Waalsa pomiędzy strukturami MPA takimi jak: podstawnik metylowy, metoksyłowy i łańcuch boczny, a fragmentami aminokwasów miejsca aktywnego IMPDH (Asp 274, Asn 303, Arg 322, Gln 441, Ser 276). Kolejnymi są wiązania wodorowe atomów tlenu pierścienia laktonowego w MPA a wodorem amidowym Gly 326 i łańcuchem bocznym Thr 333. Również występująca grupa fenolowa pierścienia aromatycznego generuje wiązanie wodorowe z Thr 333 jak również Gln 441. Dalsze badania ukazały, że wiązanie podwójne o

konfiguracji *trans* w łańcuchu bocznym MPA, pozwala na utworzenie wiązań wodorowych między atomami tlenu znajdującymi się w grupie karboksylowej a Ser 276 i jej wodorem amidowym oraz grupą hydroksylową.

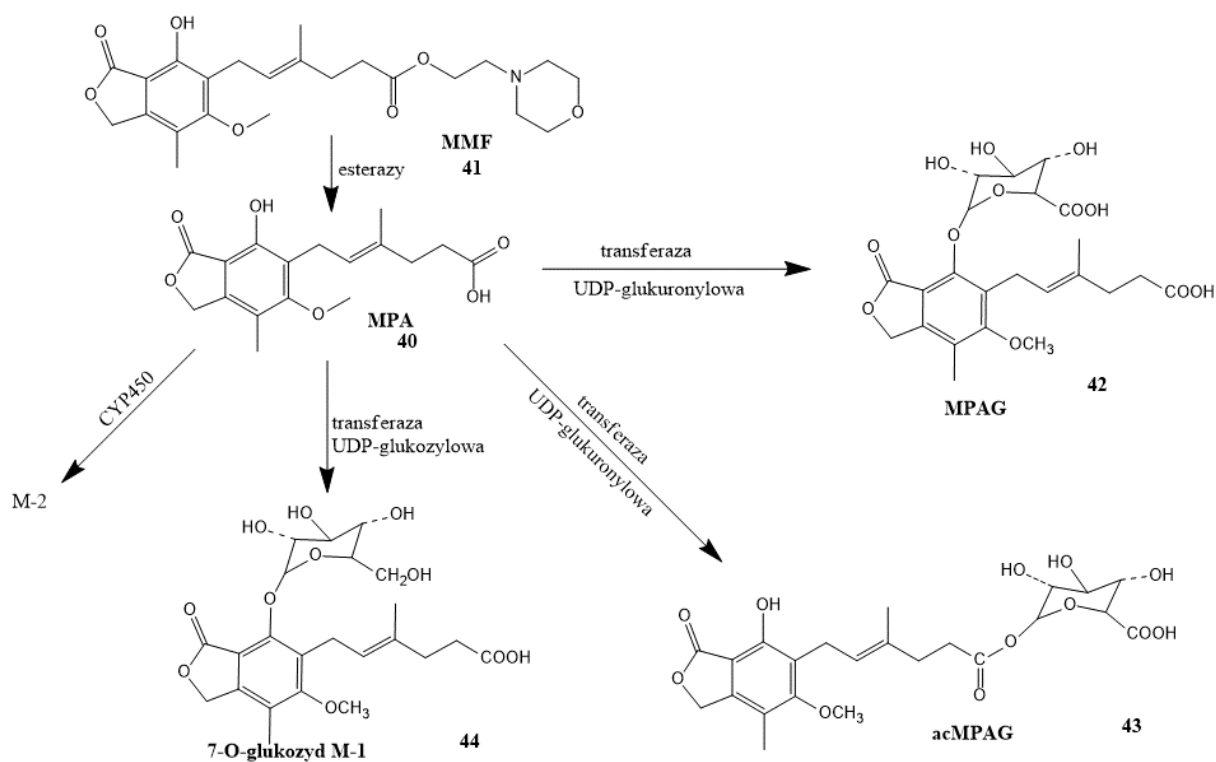
### 1.3.2. Charakterystyka biologiczna MPA na przykładzie MMF i MPS

MPA w leczeniu immunosupresyjnym jest podawany w postaci MMF czyli (*E*)-6-(1,3-dihydro-4-hydroksy-6-metoksy-7-metylo-3-okso-5-izobenzofuranylo)-4-metylo-4-heksenonian-2-morfolinoetylu (Rys. 9).



Rys. 9. Wzór strukturalny MMF (**41**) [36].

Po aplikacji MMF (**41**) u pacjenta, lek uzyskuje swą aktywność terapeutyczną w wyniku hydrolizy do MPA (**40**) (Schemat 10). Lek słabo wchłania się przez przewód pokarmowy, jednak jego estryfikacja poprawia biodostępność. Metabolizm MPA (**40**) następuje głównie w wątrobie, jednak również w mniejszym stopniu w nerkach i jelitach [36]. Produktami metabolizy MPA przy współdziałaniu glukuronylotransferazy są fenolowy glukuronid (MPAG) (**42**), acylowy glukuronid (AcMPAG) (**43**), fenolowy 7-*O*-glukozyd (M-1) (**44**) jak i produkt utleniania przez cytochrom P-450 (CYP-450), którego struktura jest nieznaną.



Schemat 10. Metabolizm MMF (41) [37].

MPA jest odwracalnym i niekompetycyjnym inhibitorem IMPDH, co przekłada się na zdolność hamowania syntezy nukleozydów guaninowych bez konieczności wbudowywania się w strukturę DNA. Zastosowanie MMF powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1, zahamowuje proliferację limfocytów T i migrację ich do przeszczepionych tkanek, hamuje dojrzewanie komórek dendrytycznych, rozrost komórek mięśni gładkich, indukuje apoptozę aktywowanych limfocytów T oraz hamuje produkcję przeciwciał stymulowanych mitogenami i antygenami.

Lek ten wykorzystywany jest w leczeniu podtrzymującym oraz w terapii ostrego nawracającego i przewlekłego odrzucania przeszczepów allogenicznych.

Poprzez zdolność hamowania IMPDH, MPA wiąże się z jej kofaktorem, którym jest NAD przekształcający inozynomonofosforan (IMP) w GMP. Jest to niezmiernie istotne podczas syntezy GMP w aktywowanych limfocytach, ponieważ jest on źródłem nukleotydów (GTP, dGTP), niezbędnych w syntezie DNA oraz glikoprotein.

Dawki kliniczne MPA powodują zahamowanie proliferacji limfocytów T, deplecję wewnątrzkomórkowej puli GTP. Poprzez zmniejszenie puli nukleotydów guanylowych MPA przyczynia się również do redukcji ilości tetrahydrobiopteryny, która jest kofaktorem w syntezie tlenu azotu (iNOS). Wynikiem zahamowania syntezy NO przy współdziałaniu iNOS jest zmniejszenie uszkodzenia tkanek [38].

Dzięki efektowi supresji IMPDH, MPA powoduje hamowanie syntezy puryn *de novo* skutkując zatrzymaniem podziałów limfocytów, co w rezultacie przyczynia się do supresji odpowiedzi immunologicznej w przeszczepie.

MMF obecnie stosuje się wraz z innymi lekami (np. CsA, kortykosteroidy, TK) w profilaktyce ostrego odrzucaniu nerek, serca, wątroby. Jego zastosowanie rozszerza się również w terapii po transplantacji szpiku kostnego. Odkryto również, że może znaleźć zastosowanie w leczeniu tzw. opornego odrzucania przeszczepu.

Zaletami MMF podczas aplikacji jest niewykazywanie działania neuro- i nefrotoksycznego. Nie powoduje również wzrostu stężenia lipidów, rozwoju cukrzycy ani osteoporozy oraz nie wywiera wpływu na ciśnienie tętnicze.

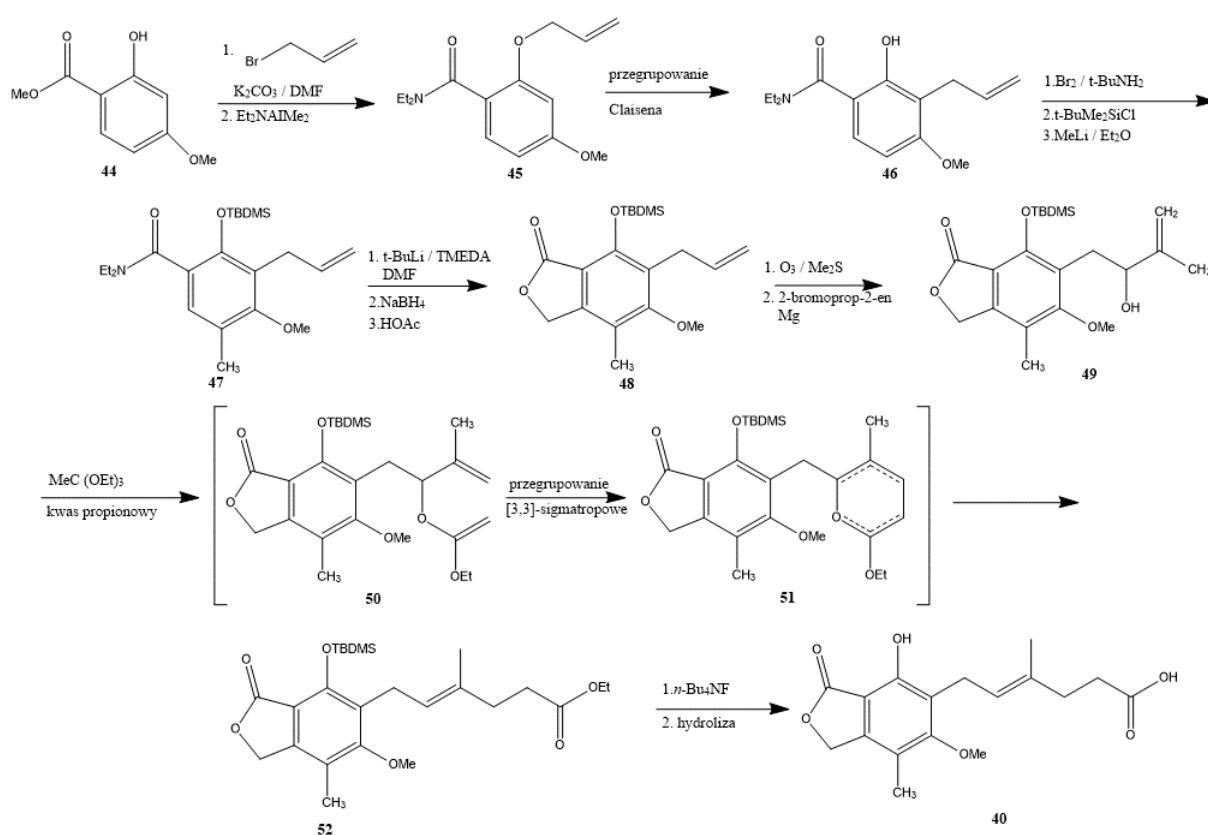
Pośród najistotniejszych działań niepożądanych podczas leczenia są: biegunka, leukopenia, posocznica, wymioty, zwiększona podatność na zakażenia (szczególnie oportunistyczne). W czasie przyjmowania MMF wzrasta ryzyko wystąpienia chłoniaków i innych nowotworów [39-43].

### 1.3.3. Synteza MPA

W literaturze można znaleźć kilka metod otrzymywania MPA. Pierwszą historyczną i przedstawioną przez Gosio było wyizolowanie naturalnego metabolitu pleśni z rodzaju *Penicilium brevicompactum*. Proces fermentacji, którym się posługiwał, charakteryzował się małym zapotrzebowaniem na wodę, niższą represją kataboliczną, umożliwiał uzyskanie większej wydajności i nie wymagał sterylnych warunków [27]. Następnie ukazała się pierwsza synteza chemiczna przedstawiona przez Birch'a i Wright'a [44], a kolejne skupiały się głównie na poprawieniu wydajności i redukcji liczby etapów samej syntezy [5,44-57]. Jedną z nich jest metoda opisana przez Pattersona (Schemat 11) [58]. Poddając 2-hydroksy-metoksybenzoesan metylu (**44**) *O*-alkilowaniu 3-bromoprop-1-enu i kolejno EtNAlMe<sub>2</sub> uzyskano *N,N*-dietylo-4-metoksy-2-(prop-2-enylo)benzamid (**45**), reakcja przegrupowania



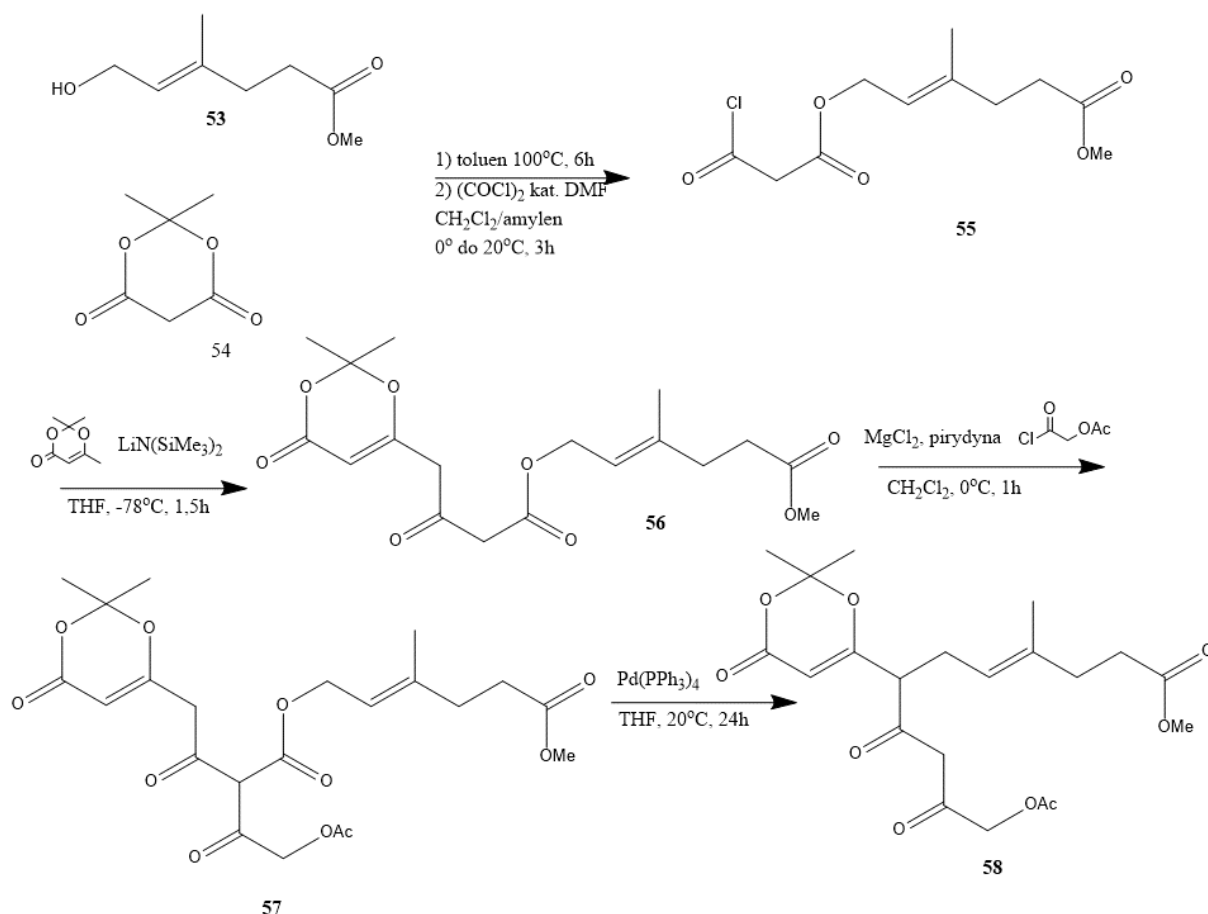
Claisena daje odpowiedni fenol (46) kolejny etap to bromowanie, wprowadzenie grupy ochronnej na grupę hydroksylową i metylowanie w pozycji 6. Tak otrzymany *N,N*-dietylo-2-[(*tert*-butyldimetylosililo)oksy]-4-metoksy-5-metylo-3-(prop-3-enylo)benzamid (47) zredukowano hydroboranem sodu, uzyskując alkohol po czym poddano procesowi laktonizacji do (48) w obecności kwasu octowego. Uzyskany 1,3-dihydro-4-[(*tert*-butyldimetylosililo)oksy]-6-metoksy-7-metylo-3-okso-5-(prop-2-enylo)izobenzofuran (48) utleniono do aldehydu, który przekształcono w alkohol allilowy (49) w reakcji z bromkiem 2-propyleno-magnezu. Alkohol (49) został przekształcony w pochodną (50), która na drodze przegrupowania Johansona-Claisena poprzez (51) ulega eliminacji do alkenu (52) o konfiguracji *trans*. Końcowym etapem była deprotekcja grupy fenolowej oraz hydroliza mykofenolanu etylu do MPA (Schemat 11).

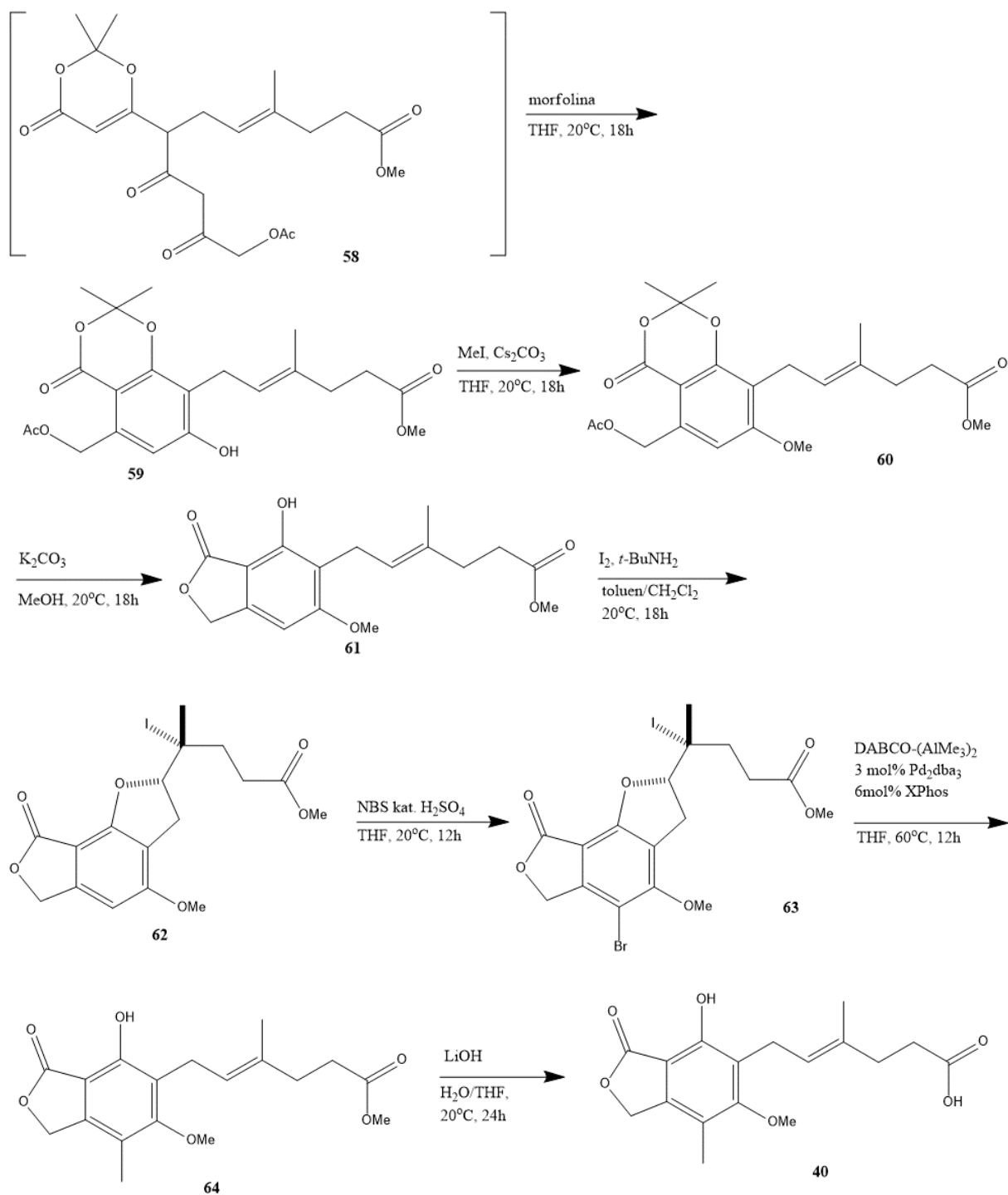


Schemat 11. Synteza MPA (40) przedstawiona przez Pattersona [58].

Od czasu opracowania przez Birch'a pierwszej syntezy MPA w 1969 roku, opracowywano nowe metody otrzymywania MPA. Charakteryzowały się one znaczną ilością etapów, pracochłonnością i niską wydajnością produktu końcowego. Ostatnimi czasy Brookes i in. [59] stworzyli nową metodę, opartą na katalizowanej palladem dekarboksylacji allilowej oraz biomimetycznej sekwencji aromatyzacji przedstawioną na Schemacie 12. Pierwszym etapem

tej drogi syntezy było acylowanie alkoholu (**53**) przy pomocy kwasu Meldruma (**54**), aby w kolejnym uzyskać przy pomocy chlorku oksalilu chlorek kwasowy (**55**). Następnie poprzez substytucję nukleofilową przy użyciu dioksynonu otrzymano ketoester dioksynonu (**56**), który acylowano do (**57**). W kluczowym etapie dekarboksylacji katalizowanej palladem wraz z allilowaniem uzyskano związek (**58**). W następnym etapie drogą cyklizacji aromatycznej utworzono pochodną (**59**). Dalszy etap ciągu reakcji to *O*-metylowanie do fenolu (**60**), transestryfikacja połączona z laktonizacją do estru (**61**). Bezpośrednie jodowanie w obecności *tert*-butyloaminy dało jodo-eter (**62**) (oraz produkt uboczny dijodek). Dalsze etapy obejmowały elektrofilowe halogenowanie przy użyciu NBS do (**63**), a następnie eliminację i metylowanie przy użyciu kompleksu DABCO-(AlMe<sub>3</sub>)<sub>2</sub> i obecności katalizatora palladowego do mykofenolanu metylu (**64**). Zasadowa hydroliza estru (**64**) dała MPA (**40**).



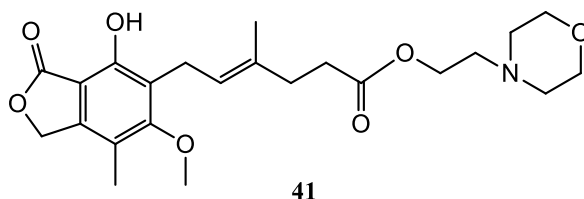


Schemat 12. Synteza MPA (40) opisana przez Brookes i in. [59].

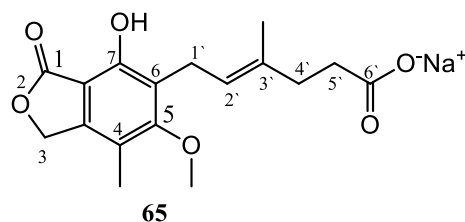
Dzięki tej metodzie autorzy zdołali otrzymać kwas mykofenolowy (40) w dwunastu etapach z wydajnością końcową równą 6%.

### 1.3.4. Klinicznie stosowane analogi MPA

Obecnie stosowanymi klinicznie pochodnymi MPA są mykofenolan mofetylu (**41**) (MMF) oraz mykofenolan sodu (**65**) (EC-MPS). Pierwszy z nich MMF przedstawiony na Rys. 10 produkowany jest pod nazwą CellCept® (Roche). Stosowany jest w transplantologii organów i komórek oraz charakteryzuje się dużą efektywnością w chorobach autoimmunologicznych [60]. Jednym ze sposobów otrzymywania MMF jest reakcja estryfikacji MPA z 2-morfolinoetanolem w obecności odpowiedniego odczynnika kondensującego (np. DCC) [61]. Natomiast mykofenolan sodu (MPS) skutecznością dorównuje MMF jest jednak lepiej tolerowany przez pacjentów (Rys. 11) [62, 63]. Nie ulega on hydrolizie w warunkach kwasowych (żołądek pH<5) oraz dobrze rozpuszcza się w roztworze wodnym o obojętnym pH. Niestety obydwie związki wykazują skutki niepożądane, takie jak: odrzut przeszczepu, wymioty, biegunka, bóle brzucha, nudności [64].



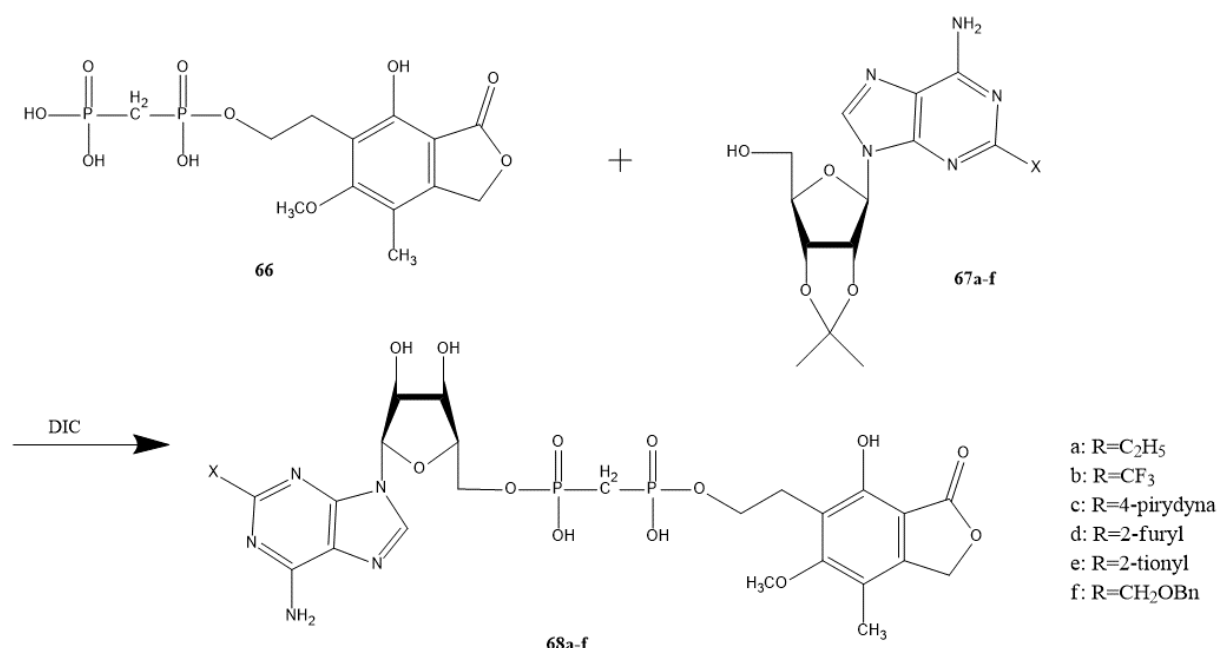
Rys. 10. Mykofenolan mofetylu (MMF) (**41**).



Rys. 11. Mykofenolan sodu (EC\_MPS) (**65**).

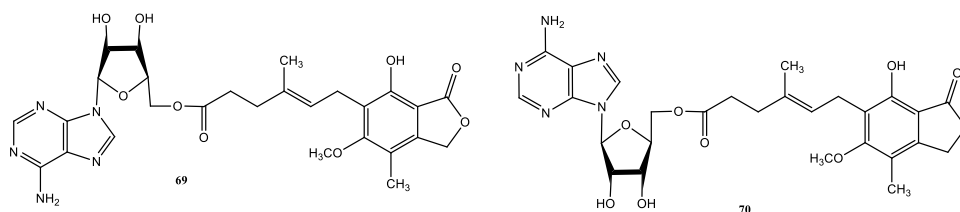
### 1.3.5. Wybrane analogii MPA i ich aktywność biologiczna

Liczne efekty niepożądane towarzyszące zapobieganiu odrzucaniu przeszczepów za pomocą MPA i jego proleków (**41**) i (**65**) skłoniły do poszukiwania nowych pochodnych MPA o poprawionych właściwościach terapeutycznych [65-84]. Felczak i in. [85] zsyntezowali trzy klasy inhibitorów IMPDH opartych o kwas mykofenolowy i zbadali ich właściwości antyproliferacyjne na kilku liniach komórkowych. Pierwszą klasą związków były mykofenolowe analogi dinukleotydu adeniny zawierające podstawnik w pozycji C2 adeniny otrzymane z kondensacji reagentów (**66**) i (**67a-f**) przy pomocy odczynnika sprzęgającego DIC (Schemat 13). Wykazały one inhibicję IMPDH i hamowanie proliferacji komórek linii białaczki (K562).



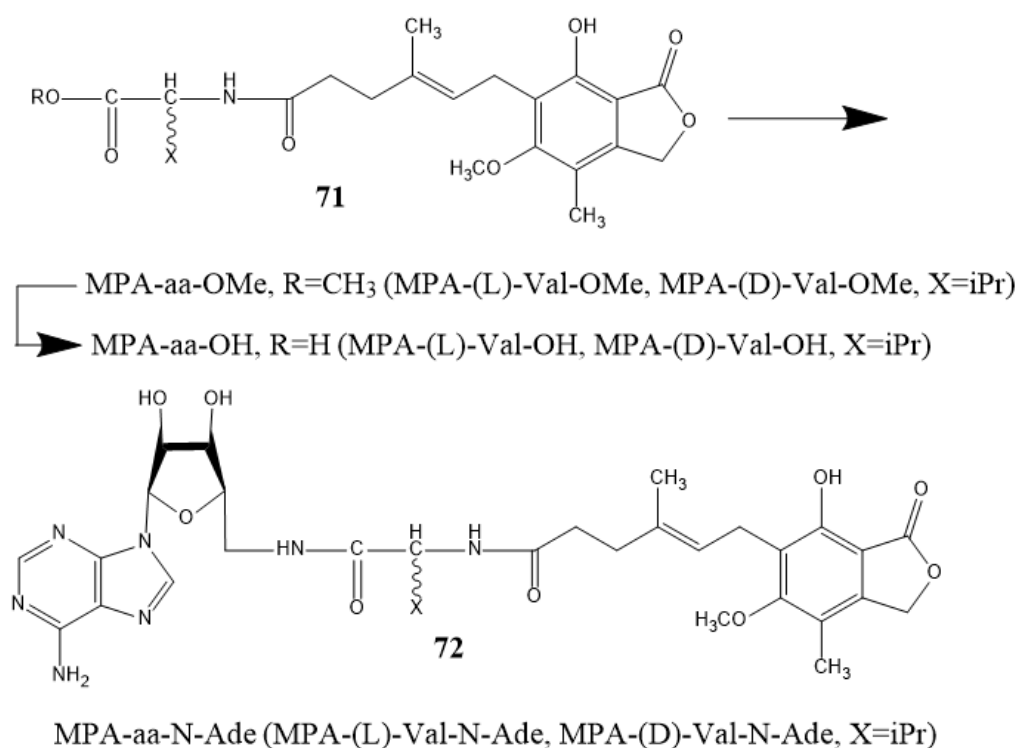
Schemat 13. Mykofenolowe analogi dinukleotydu adeniny (**68a-f**) [85].

Drugą grupą przedstawioną przez autorów były mykofenolowe estry adenozyne pokazane na Rys. 12. Wykazały one inhibicję wobec IMPDH2 oraz linii komórek ludzkiej białaczki szpikowej (K562).



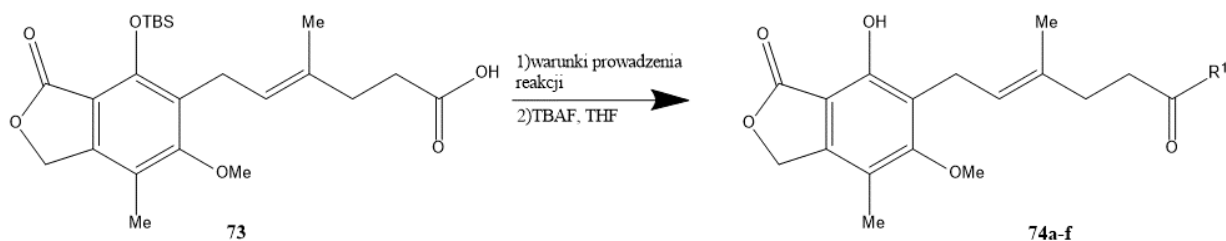
Rys. 12. Ester adenozyzny MPA (**69**) oraz jego forma enancjomeryczna (**70**) [85].

Kolejną opisaną [85] grupą są diamidowe pochodne kwasu mykofenolowego i adenozyzny, gdzie łącznikiem są aminokwasy białkowe (**72**) między innymi walina (Schemat 14), które wykazały wzrost aktywności hamującej względem IMPDH typu I i II po przyłączeniu adenozyzny, lecz bez inhibicji proliferacji komórek rakowych. Zostały one otrzymane z aminokwasowych pochodnych MPA (**71**) przy pomocy odczynnika kondensującego EDCI z HOBt.



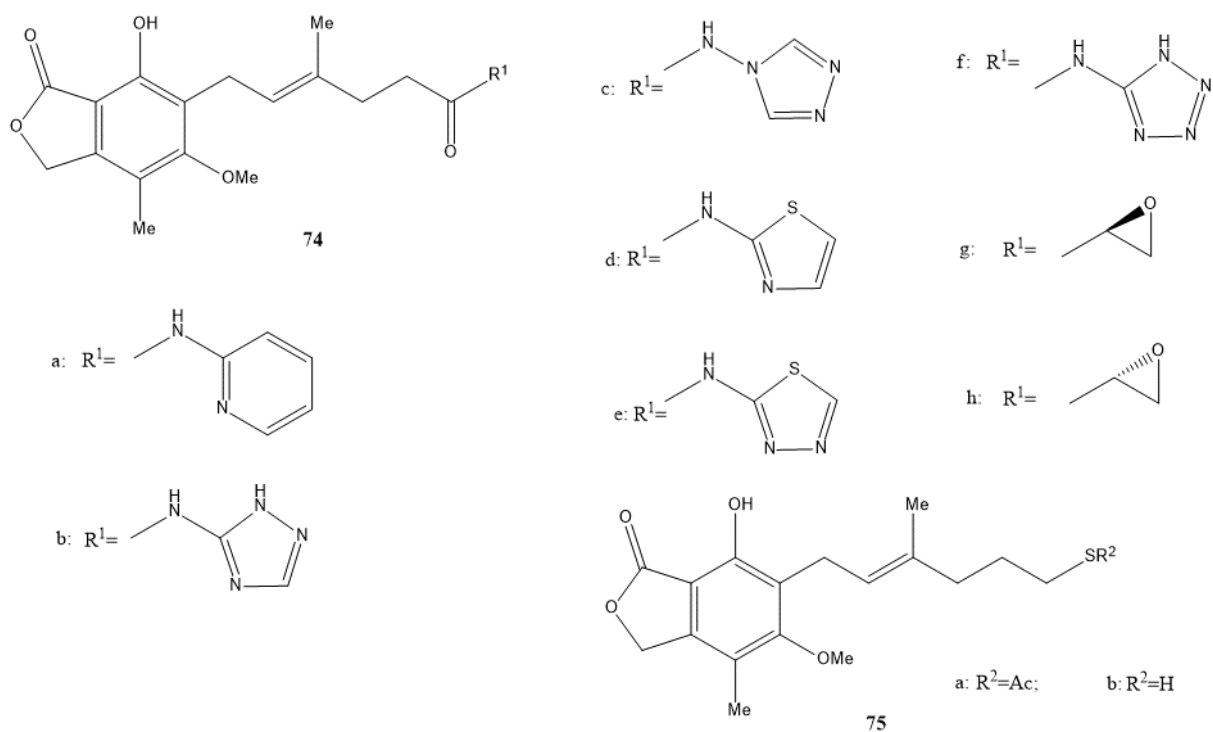
Schemat 14. Synteza mykofenolowych i walinowych pochodnych diamidów adenozyzny (**72**) [85].

Sunohara i in. [86] zsyntetyzowali dziesięć pochodnych MPA, modyfikowanych w pozycję C6' i zbadali zależność struktura-aktywność. Droga syntezy polegała w pierwszej kolejności na reakcji kondensacji z heterocykliczną aminą, po której następowała deprotekcja (Schemat 15). Pulę otrzymanych związków stanowiły pochodne amidowe, a także epoksydowe (Schemat 16) i tiolowe (Schemat 17). W celu otrzymania pochodnych epoksydowych autorzy wychodząc z związku (**73**) zastosowali estryfikację, a później redukcję przy użyciu DIBAL do aldehydu (**76**), który następnie został przekształcony poprzez addycję nukleofilową do racemicznego alkoholu (**77**)/(**78**). Związki (**74g**) oraz (**74h**) zostały utworzone przez epoksydację stereoselektywną, oksydację Dess-Martina i deprotekcję z użyciem TBAF. Z kolei synteza tiolu wykorzystuje redukcję (**76**) za pomocą borowodoru sodu do alkoholu (**77**), który w warunkach reakcji Mitsunobu ulega kondensacji do tioeteru (**78**). Traktowanie tego związku TBAF pozwoliło odtworzyć wolną grupę fenolową (**75a**), a roztwór metanolanu sodu posłużył do uzyskania tiolu (**75b**). Badania biologiczne wykazały, że związki posiadały wysoką aktywność inhibicji IMPDH zarówno pierwszego i drugiego typu.

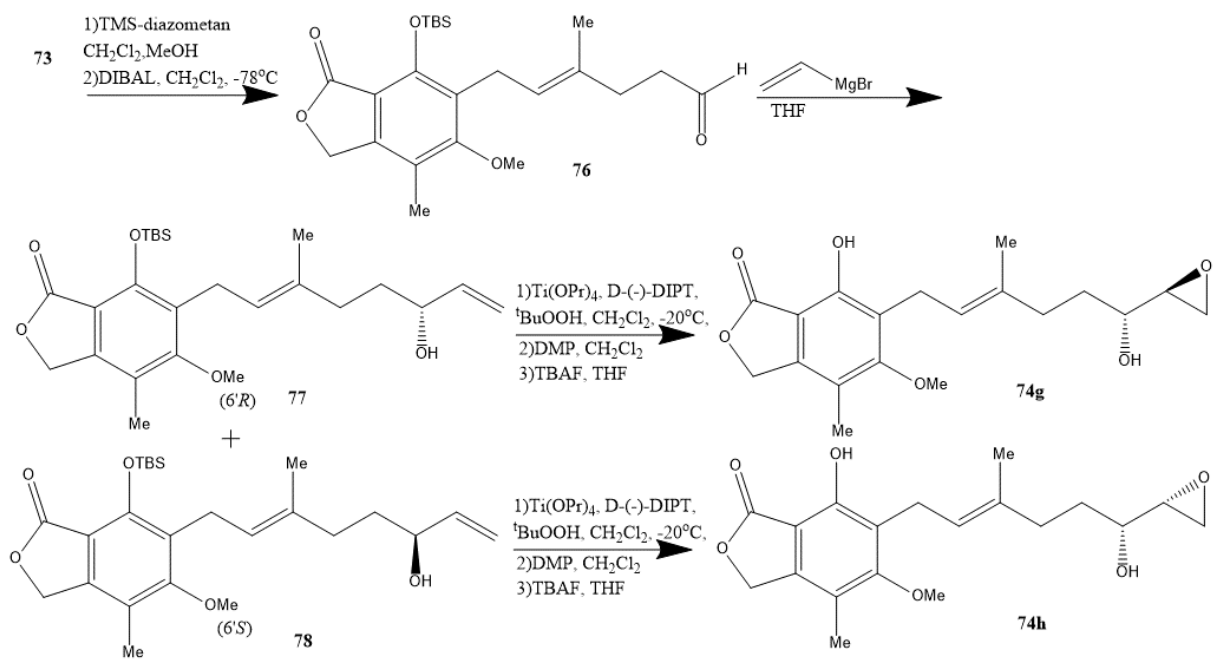


Warunki prowadzenia reakcji	Produkt	Wydajność (%)
EDC, HOBt, 2-aminopirydyna, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	<b>74a</b>	31
ClCOOEt, Et <sub>3</sub> N, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 0°C, potem 3-amino-1,2,4-triazol w DMSO, temp. pok.	<b>74b</b>	93
(COCl) <sub>2</sub> , kat. DMF, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 0°C do temp. pok., potem 4-amino-1,2,4-triazol w DMF, 0°C	<b>74c</b>	92
ClCOOEt, Et <sub>3</sub> N, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 0°C, potem 2-aminotiazol w DMSO, temp. pok.	<b>74d</b>	85
ClCOOEt, Et <sub>3</sub> N, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0°C, potem 2-amino-1,3,4-tiadizol	<b>74e</b>	88
CDI, DMF, temp., pok., potem 5-aminotetrazol w DMSO, 40°C	<b>74f</b>	87

Schemat 15. Synteza heterocyklicznych pochodnych amidowych (**74a-f**) oraz sulfidowych (**75a,b**) [86].

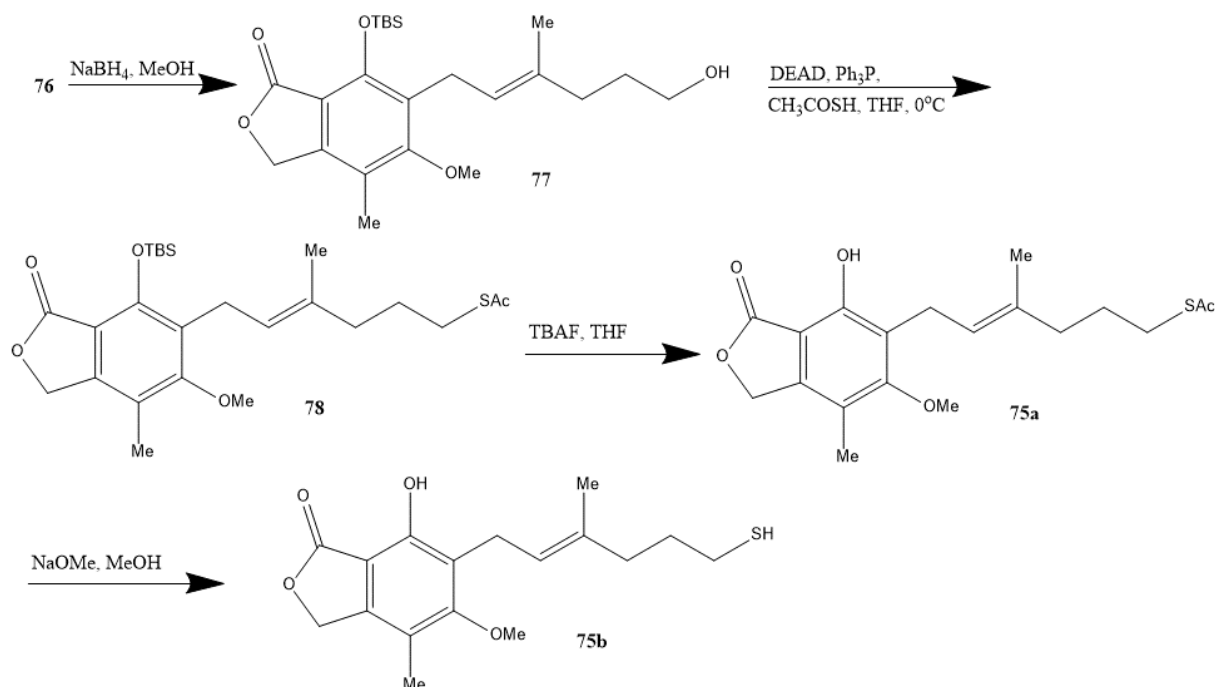


Rys. 11. Struktury pochodnych MPA przedstawione przez Sunohara i in. (**74a-h**), (**75a,b**) [86].



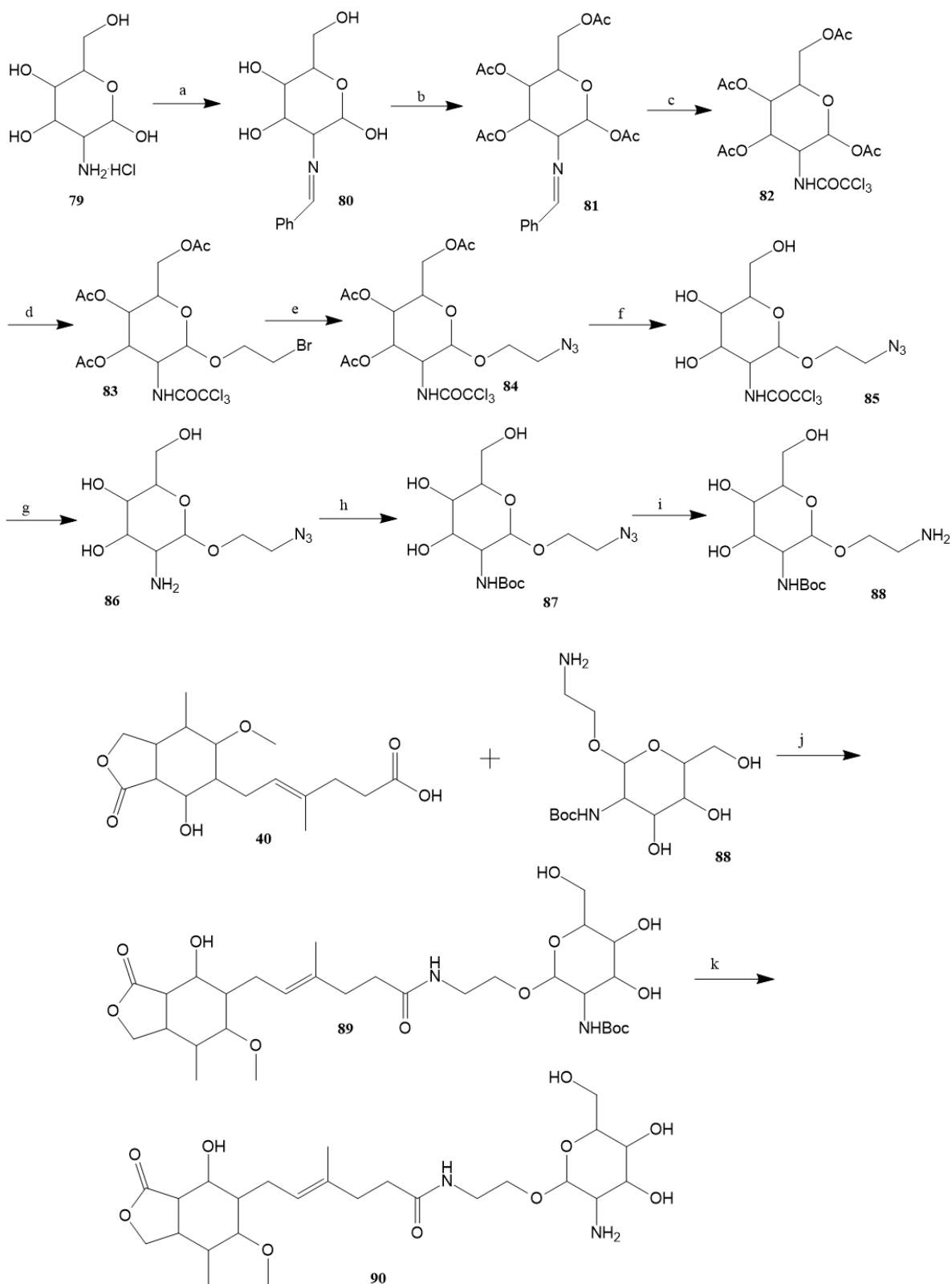
Schemat 16. Synteza pochodnych epoksyketonowych (**74g,h**) [86].





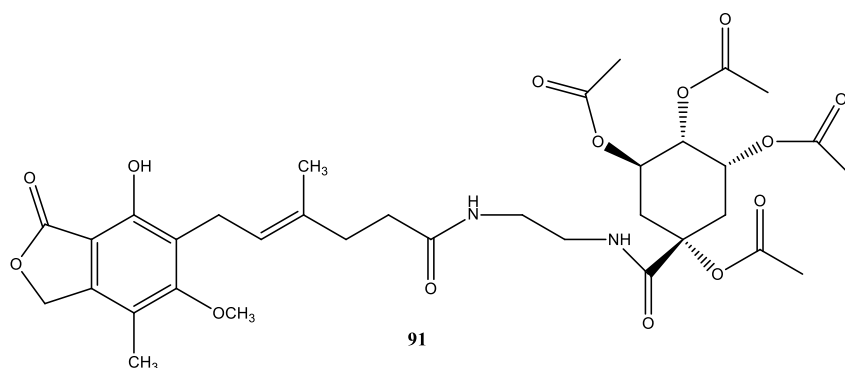
Schemat 17. Synteza mykofenolowego tiooctanu (**75a**) i tiolu (**75b**) [86].

Wang i in. [87] zaprojektowali nowe koniugaty kwasu mykofenolowego oparte o 2-glukozaminę celem zastosowania w zapobieganiu odrzucania przeszczepu nerki. W założeniu modyfikacja miała służyć zwiększeniu selektywności w działaniu leku jak również skuteczności przy jednoczesnej mniejszej dawce. 2-Glukozamina według wcześniejszych badań autorów ze względu na małą toksyczność idealnie nadaje się jako nośnik terapeutyczny. Synteza polegała na otrzymaniu zmodyfikowanej 2-glukozaminy o łańcuchach aminowych, przy odpowiednio zabezpieczonych poszczególnych grupach funkcyjnych glukozaminy. W pierwszym etapie glukozaminę (**79**) wykorzystano jako substrat w reakcji addycji nukleofilowej, po czym tak uzyskany addukt (**80**) poddano acylowaniu do (**81**). Następnie iminę (**81**) przeprowadzono w amid kwasu trichlorooctowego (**82**), z którego otrzymano glikozyd (**83**). Bromek (**83**) traktowano azydkiem sodu, a produkt podstawienia nukleofilowego (**84**) poddano alkoholizacji do (**85**) oraz hydrolizacji do pochodnej (**86**). Następnie wprowadzono osłonę Boc na grupę aminową azydku (**87**) za pomocą pirowęglaanu di-*tert*-butylu, który poddano redukcji do aminy (**88**). Kondensacja MPA (**40**) z aminą (**88**) w obecności DCC pozwoliła otrzymać amid (**89**), którego deprotekcja prowadziła do produktu (**90**) zgodnie ze Schematem 18.



Schemat 18. Synteza koniugatu MPA z glukozaminą (**90**) [87]. Warunki prowadzenia reakcji: (a) benzaldehyd w NaOH/H<sub>2</sub>O; (b) Ac<sub>2</sub>O, pirydyna; (c) HCl i Cl<sub>3</sub>CCOCl, Et<sub>3</sub>N; (d) 2-bromoetanol, BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O w bezwodnym CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (e) NaN<sub>3</sub>, DMF; (f) CH<sub>3</sub>ONa; (g) 0.3 mol/L NaOH; (h) Boc<sub>2</sub>O; (i) Pd/C (10%), H<sub>2</sub> w MeOH; (j) DCC, DMAP, bezwodny DMF; (k) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CF<sub>3</sub>COOH (5:1) pH 9.

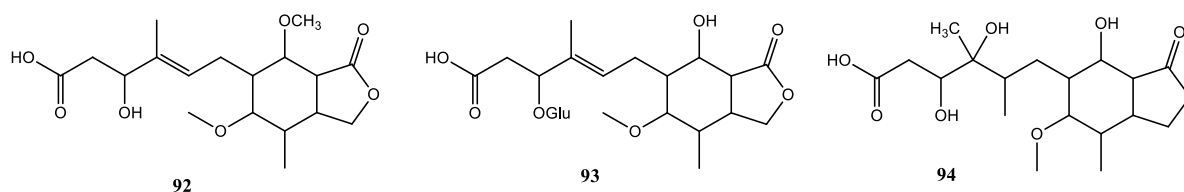
Otrzymany koniugat (**90**) okazał się mniej cytotoksyczny w porównaniu do MPA (**40**), a tym samym obiecującym związkiem w poszukiwaniu skuteczniejszych leków zapobiegającym odrzucaniu przeszczepów.



Rys. 12. Koniugat MPA z kwasem chinowym (**91**) [88].

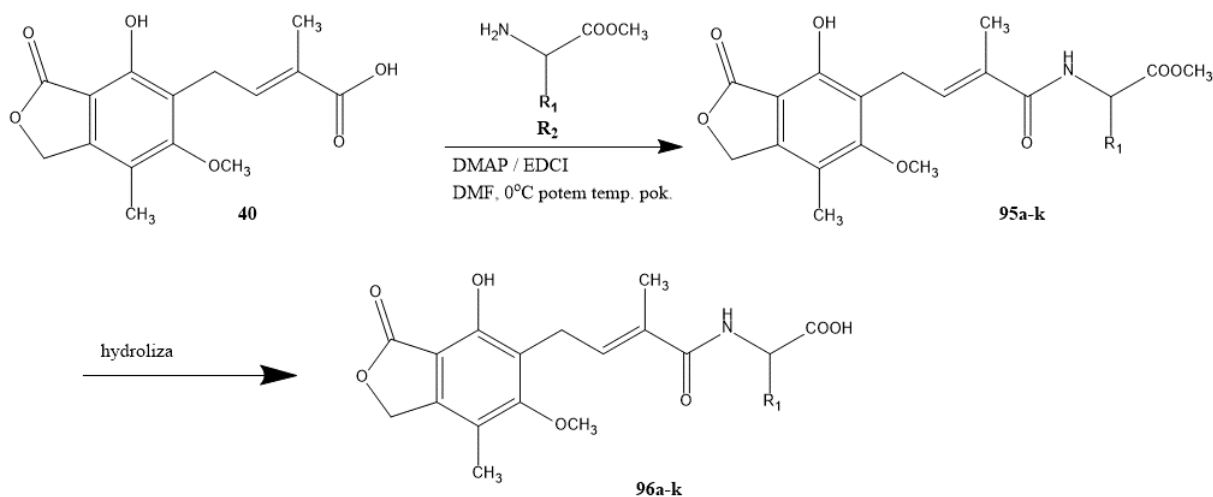
Innym przykładem koniugatu MPA o interesujących właściwościach immunosupresyjnych stanowi połączenie tego związku z pochodną kwasu chinowego (**91**) (Rys. 12) [88]. Autorzy obserwowali znaczne obniżenie toksyczności pochodnej (**91**) w porównaniu do MPA i wytypowali otrzymany związek do badań *in vivo* jako potencjalny immunosupresant.

Chen i in. [89] wyizolowali trzy nowe pochodne MPA (Rys. 13) i zbadali ich aktywność immunosupresyjną. Naukowcy odkryli w morzu Południowochińskim naturalne bioaktywne produkty pochodzące z grzybów *Penicillium* (gat. SOF07) przedstawione na Rys. 13. Dalsze badania oparte na inhibicji IMPDH i proliferacji na komórkach mysich pokazały, że nowo odkryte pochodne nie są mniej aktywne wobec MPA, jednak badania nad strukturą dostarczyły interesujących wniosków. Mianowicie, hydroksylowanie w pozycji C-4', metylacja na C-7-OH, podwójne hydroksylowanie w wiązaniu podwójnym C-2'/ C-3' zmniejszała bioaktywność. Z drugiej strony hydroksylacja glukozyłu w pozycji C-4' korelowała z bioaktywnością porównywalną do obserwowanej w MPA.



Rys. 13. Trzy nowe pochodne MPA (**92**)-(**94**) wyizolowane z *Penicillium* [89].

Iwaszkiewicz-Grześ i in. [2] otrzymali nowe aminokwasowe pochodne MPA w reakcji MPA z estrami metylowymi aminokwasów w obecności EDCI i DMAP (Schemat 19). Celem syntezy było otrzymanie nowych immunosupresantów o wyraźnie lepszym działaniu terapeutycznym niż MPA. Pochodne estrowe (**95a-k**) poddano hydrolizie zasadowej do analogów z wolną grupą hydroksylową (**96a-k**). Obydwie grupy związków zostały zbadane pod kątem aktywności antyproliferacyjnej wobec linii komórkowych Jurkat oraz mononuklearnych komórkach krwi obwodowej pochodzących od zdrowych pacjentów.



<b>95, 96</b>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>a</b>	D-CH <sub>3</sub>	HCl x D-Ala
<b>b</b>	L-CH <sub>3</sub>	HCl x Ala
<b>c</b>	H	HCl x Gly
<b>d</b>	L-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	HCl x Glu
<b>e</b>	D-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	HCl x D-Glu
<b>f</b>	L-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	HCl x Val
<b>g</b>	D-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	HCl x D-Val
<b>h</b>	L-CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	HCl x Leu
<b>i</b>	D-CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	HCl x D-Leu
<b>j</b>	L-CH <sub>2</sub> Ph	HCl x Phe
<b>k</b>	D-CH <sub>3</sub>	HCl x D-Phe

Schemat 19. Aminokwasowe pochodne MPA (**95a-k**) i (**96a-k**) [2].

Badania biologiczne pokazały, że związki (**95j**), (**96e**) i (**96h**) wykazują większą aktywność *in vitro* w stosunku do MPA. Wszystkie otrzymane pochodne są inhibitorami IMPDH, a ponadto na zaobserwowaną aktywność wpływała konfiguracja na chiralnym atomie węgla oraz podstawnik w części aminokwasowej.

## 2. CEL I ZAKRES PRACY

Celem mojej rozprawy doktorskiej jest synteza chemiczna oraz badania i analiza aktywności biologicznej aminoalkilowych i aminokwasowych pochodnych adenozyiny oraz ich koniugatów z MPA jako potencjalnych związków o właściwościach immunosupresyjnych.

Zsyntezowane związki zostały poddane badaniom *in vitro* w Zakładzie Immunologii Klinicznej i Transplantologii w Gdańskim Uniwersytecie Medycznym we współpracy z prof. Piotrem Trzonkowskim.

Synteza chemiczna obejmowała:

1. Syntezę pochodnych aminoalkilowych adenozyiny (Rys. 13);

W celu otrzymania tego typu pochodnych adenozyiny przeprowadziłem syntezę opisaną przez Bressi i in. [3] polegającą na substytucji nukleofilowej pierścienia adeniny w adenozyinie przy użyciu odpowiednich diaminoalkanów. W tym celu posłużyłem się rybozydem 6-chloropuryny na który podziałałem odpowiednią diaminą w obecności trietyloaminy w etanolu.

2. Syntezę aminoalkilowych pochodnych adenozyiny z kwasem mykofenolowym;

W celu utworzenia wiązania amidowego pomiędzy pochodnymi adenozyiny a MPA, przetestowałem różne odczynniki kondensujące. Koniugaty MPA otrzymałem wykorzystując jako odczynnik kondensujący EDCI w obecności DMAP w bezwodnym DMF.

3. Syntezę aminokwasowych pochodnych adenozyiny;

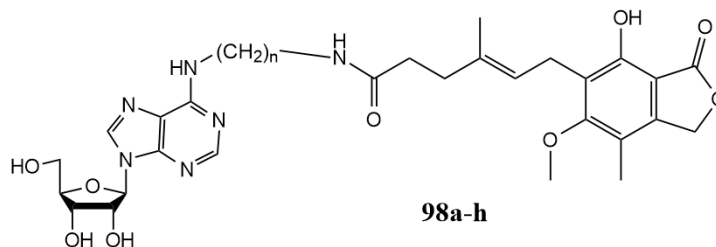
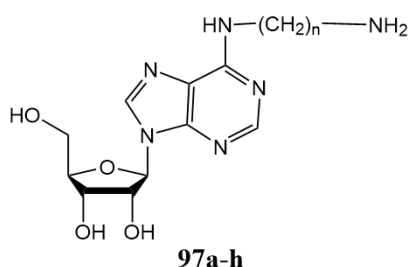
Aby zsyntezować pochodne aminokwasowe adenozyiny użyłem dwóch metod: DCC oraz estryfikacji Yamaguchi [90, 91] opartej o chlorek 2,4,6-trichlorobenzoilu.

4. Syntezę koniugatów MPA z aminokwasowymi pochodnymi adenozyiny;

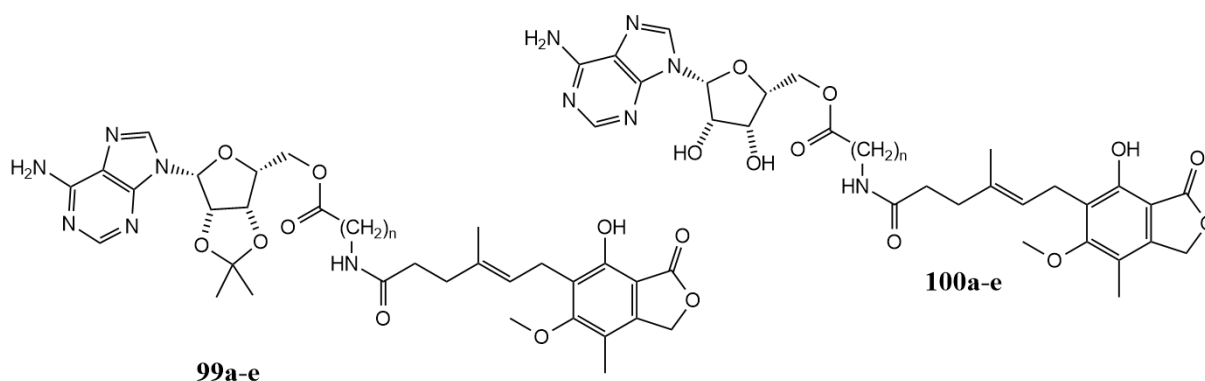
W reakcji utworzenia wiązania amidowego przetestowałem różne odczynniki kondensujące. Koniugaty otrzymałem wykorzystując EDCI w obecności HOBt, TEA w bezwodnym DMF jako rozpuszczalniku.

Badania biologiczne obejmowały:

1. Testy żywności MTT w celu określenia toksyczności związków wobec linii komórkowej Jurkat oraz PBMC miał na celu określenie wartości  $IC_{50}$ ;
2. Testy aktywności proliferacyjnych związków wykorzystując metodą inkorporacji TdR-3H względem linii komórkowej Jurkat oraz PBMC miał na celu określenie wartości  $EC_{50}$ ;
3. Zestawienie oraz porównanie aktywności biologicznej otrzymanych pochodnych adenozyiny w korelacji do adenozyiny jak również koniugatów MPA w odniesieniu do MPA jako wzorca;
4. Określenie współczynnika selektywności (SI) dla wszystkich otrzymanych związków;
5. Zbadanie stabilności oddziaływania otrzymanych koniugatów wobec badanych komórek wykorzystując pomiar stężenia za pomocą HPLC-MS;
6. Analiza wyników oraz wybór związków do badań *in vivo*.



$n=2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12$



**100a-e**

$n=2,5,6,7,10$

związek	97/98:	a	b	c	d	e	f	g	h	99/100:	a	b	c	d	e
	$n =$	2	3	4	5	6	8	10	12	$n =$	2	5	6	7	10

Rys. 13. Struktury otrzymanych i badanych nowych analogów adenozyiny (**97a-h**) i koniugatów MPA (**98a-h**), (**99a-e**), (**100a-e**).

Wszystkie prace syntetyczne i charakterystykę związków wykonałem w Katedrze Chemii Organicznej Politechniki Gdańskiej pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Krystyny Dzierzbickiej oraz dr inż. Grzegorza Cholewińskiego.

Badania aktywności biologicznej związków wykonałem samodzielnie w Zakładzie Immunologii Klinicznej i Transplantologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Piotra Trzonkowskiego.



### 3. OMÓWIENIE WYNIKÓW PRACY

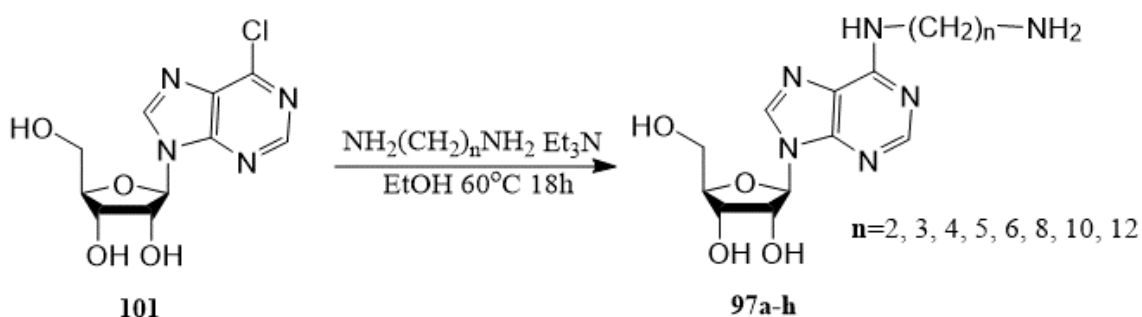
#### 3.1. Prace syntetyczne

Część syntetyczna pracy obejmowała otrzymanie aminowych pochodnych adenozyiny (**97a-h**) i ich koniugatów z MPA (**98a-h**) oraz połączeń MPA z aminokwasowymi pochodnymi adenozyiny zawierającymi osłonę izopropylidenową w pozycji 2',3' części rybozy (**99a-e**), jak i z wolnymi grupami hydroksylowymi (**100a-e**) (Rys. 13).

##### 3.1.1. Synteza aminoalkilowych pochodnych adenozyiny

Aby otrzymać aminowe pochodne adenozyiny użyłem rybozydu 6-chloropuryny oraz diamin: 1,2-diaminoetan, 1,3-diaminopropan, 1,4-diaminobutan, 1,5-diaminopentan, 1,6-diaminoheksan, 1,8-diaminooktan, 1,10-diaminodekan, 1,12-diaminododekan.

W celu utworzenia wiązania pomiędzy łańcuchami alkiloaminowymi a adenozyną w pozycji  $N^6$  adeniny posłużyłem się reakcją podstawienia nukleofilowego w układzie aromatycznym opisaną przez Bressi [3] (Schemat 20), która zakłada użycie rybozydu 6-chloropuryny rozpuszczonego w etanolu. Kolejno dodałem odpowiednią diaminę w postaci wolnej lub chlorowodoru oraz trietyloaminę. Reakcję prowadziłem w temp. 60 °C przez 18 h.



Schemat 20. Synteza aminoalkilowych pochodnych adenozyiny (**97a-h**).

Postęp reakcji kontrolowałem za pomocą TLC. Po zakończeniu reakcji ochłodziłem roztwór do temperatury pokojowej, a następnie otrzymany produkt po oddestylowaniu rozpuszczalnika na wyparce obrotowej oczyszczałem przy użyciu chromatografii kolumnowej. Wydajność otrzymanych produktów mieściła się w zakresie 51-92% (Tabela 2).



Tabela 2. Wydajności aminoalkilowych pochodnych adenozyiny (**97a-h**).

Związek	Wyd. [%]
<b>97a</b>	51
<b>97b</b>	68
<b>97c</b>	50
<b>97d</b>	62
<b>97e</b>	63
<b>97f</b>	68
<b>97g</b>	92
<b>97h</b>	64

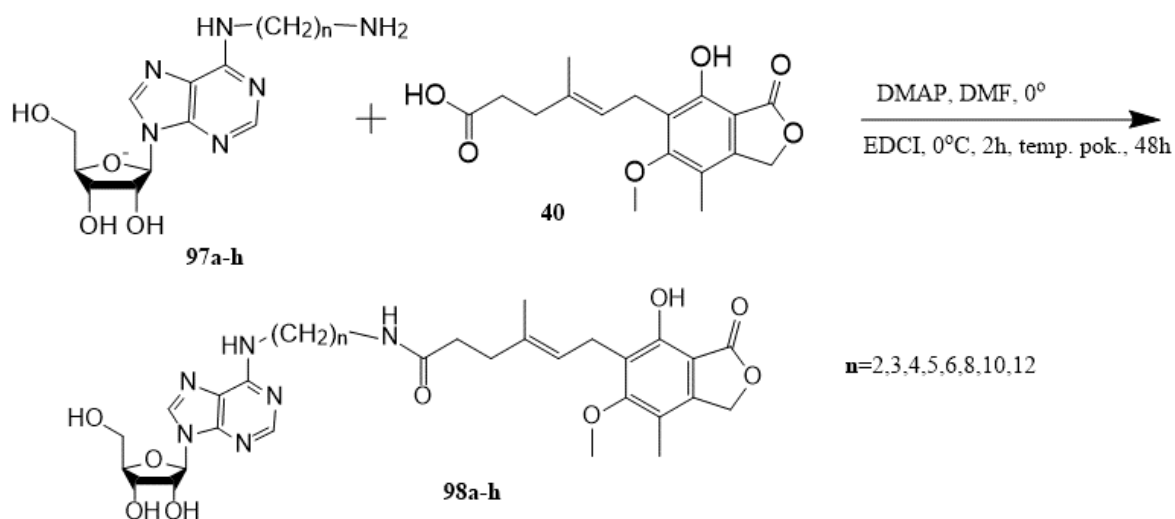
Wszystkie zsyntezowane związki charakteryzowałem za pomocą widm  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz),  $^{13}\text{C}$  NMR, MS oraz określiłem temp. top., a ich czystość za pomocą HPLC-MS (warunki analizy zostały podane w części eksperymentalnej).

### 3.1.2. Synteza aminoalkilowych pochodnych adenozyiny z MPA

Wcześniej otrzymane amidowe pochodne adenozyiny (**97a-h**) posłużyły do utworzenia koniugatów z MPA (**98a-h**).

Do otrzymania wiązania amidowego pomiędzy amidowymi pochodnymi adenozyiny a MPA przetestowałem następujące odczynniki kondensujące: TBTU/HOBt, DPPA/TEA, DCC/NMM, EEDQ/Py, metoda mieszanych bezwodników z chloromrówczanem izobutyli i NMM, T3P/Py, EDCI/DMAP. EDCI/HOBt, CDI, PyBOP/DIPEA. Najkorzystniejszą procedurą otrzymywania produktu okazała się metoda EDCI/DMAP.

W syntezie wykorzystałem MPA, odpowiednią amidową pochodną adenozyiny oraz DMAP w bezwodnym DMF w środowisku gazu obojętnego. Następnie ochłodziłem mieszaninę reakcyjną do temperatury 0 °C, po czym dodawałem EDCI w równych porcjach w czasie 30 minut. Całość mieszałem przez 2-3 h w temp 0 °C, a później w temp. pok. przez następne 48 h (Schemat 21). Postęp reakcji kontrolowałem za pomocą TLC w układzie D.



Schemat 21. Synteza koniugatów MPA z aminoalkilowymi pochodnymi adenozy (98a-h).

Po zakończeniu reakcji, oddestylowałem DMF lub ekstrahowałem przy pomocy octanu etylu i chloroformu w zależności od produktu. Następnie po oddestylowaniu rozpuszczalnika na wyparce obrotowej produkt oczyściłem na kolumnie chromatograficznej wypełnionej żel krzemionkowym przy pomocy eluentu  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : MeOH (50:1 – 10:1 v/v). Surowy produkt oczyszczałem przy pomocy płytek TLC w układzie A, B. Drugą metodą oczyszczania była ekstrakcja do fazy stałej (SPE). Wydajność otrzymanych produktów mieściła się w zakresie 18-49% (Tabela 3). Strukturę otrzymanych związków potwierdziłem za pomocą widm  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) i MS oraz określiłem temperatury topnienia.

Tabela 3. Wydajności otrzymanych koniugatów MPA z pochodnymi adenozy (98a-h).

Związek	n	Wyd. [%]
98a	2	49
98b	3	18
98c	4	19
98d	5	21
98e	6	19
98f	8	28
98g	10	22
98h	12	20

### 3.1.3. Synteza aminokwasowych analogów adenozyiny

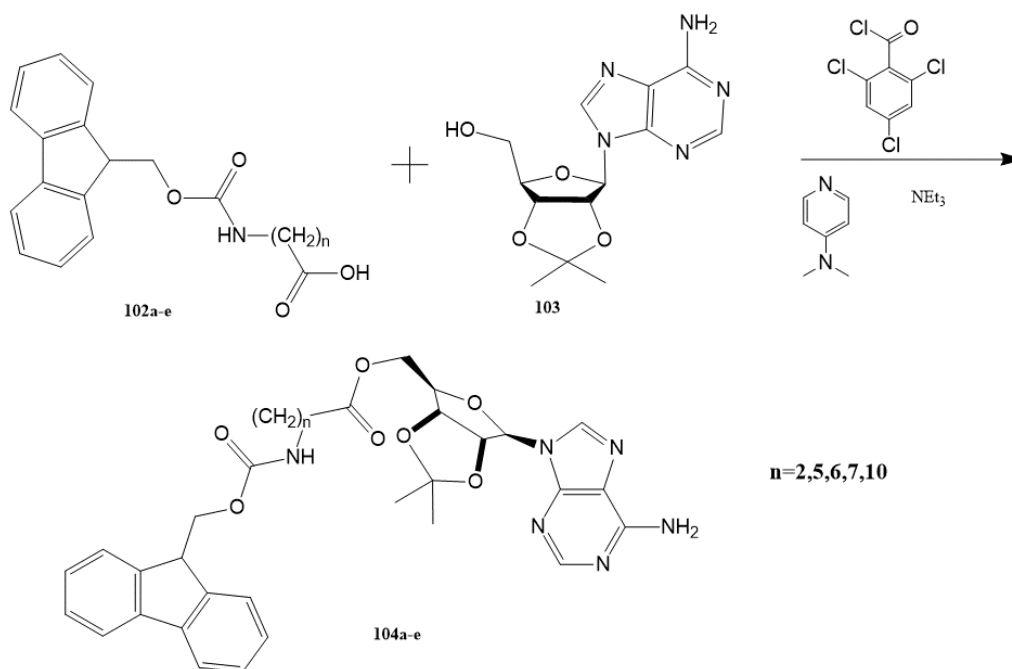
Do syntezy pochodnych adenozyiny wykorzystałem następujące Fmoc chronione aminokwasy: kwas *N*-(fluorenylometoksykarbonylo)- $\beta$ -alaniny (Fmoc- $\beta$ -Ala-OH) **102a**, kwas *N*-(fluorenylometoksykarbonylo)-6-aminoheksanowy (Fmoc-6-Ahx-OH) **102b**, kwas *N*-(fluorenylometoksykarbonylo)-7-aminoheptanowy (Fmoc-7-Ahp-OH) **102c**, kwas *N*-(fluorenylometoksykarbonylo)-8-aminooktanowy (Fmoc-8-Aoc-OH) **102d**, kwas *N*-(fluorenylometoksykarbonylo)-11-aminoundekanowy (Fmoc-11-Aun-OH) **102e**.

W celu utworzenia wiązania estrowego posłużyłem się dwiema metodami:

- estryfikacja Yamaguchi [90, 91];
- metoda DCC.

Najkorzystniejszym sposobem syntezy okazała się zmodyfikowana reakcja estryfikacji Yamaguchi [90, 91].

W reakcji stosowałem odpowiedni aminokwas z ochronioną grupą aminową za pomocą Fmoc, chronioną pochodną 2',3'-izopropylidenową adenozyiny, DMAP, chlorek 2,4,6-trichlorobenzoylu oraz trietyloaminę w bezwodnym chloroformie zgodnie ze Schematem 22. Mieszaninę pozostawiałem na następny dzień w którym dodawałem kolejną porcję chlorku kwasowego (nadmiar powodował zwiększenie wydajności). Postęp reakcji kontrolowałem przy pomocy TLC w układzie D. Po zakończeniu reakcji oddestylowałem chloroform, a surowy produkt oczyściłem przy pomocy TLC w układzie A, B. Wydajność produktów mieściła się w zakresie 77-96 % (Tabela 4). Struktury otrzymanych związków potwierdziłem za pomocą widm MS.



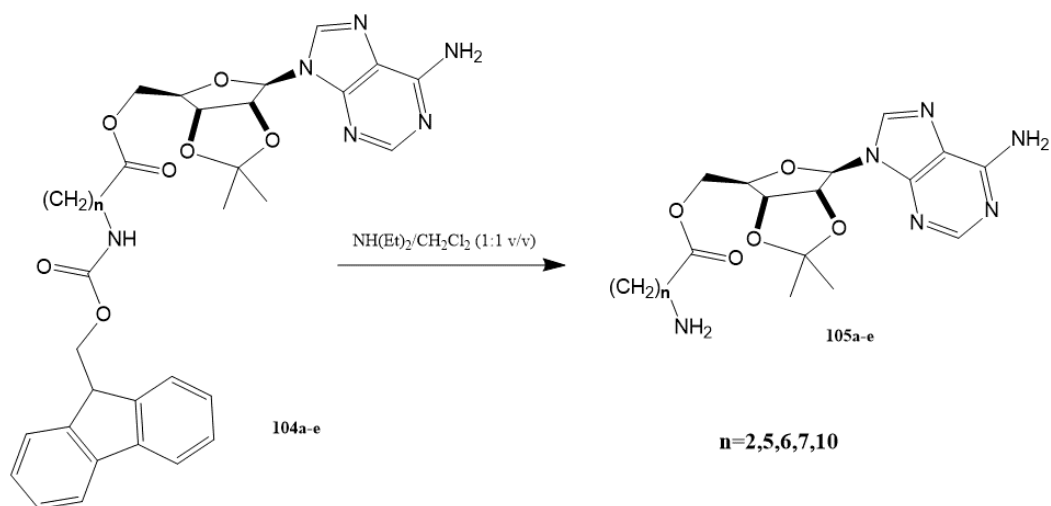
Schemat 22. Synteza aminokwasowych analogów adenozyiny (**104a-e**).

Tabela 4. Wydajności otrzymanych aminokwasowych analogów adenozyiny (**104a-e**).

Związek	n	Wyd. [%]
<b>104a</b>	2	85
<b>104b</b>	5	83
<b>104c</b>	6	91
<b>104d</b>	7	77
<b>104e</b>	10	96

### 3.1.4. Deprotekcja osłony Fmoc z aminokwasowych pochodnych adenozyiny

Do deprotekcji osłony Fmoc wykorzystałem mieszaninę chlorku metylenu z dietyloaminą w proporcjach 1:1 (v/v) zgodnie ze Schematem 23 [92].



Schemat 23. Usuwanie osłony Fmoc z aminokwasowych pochodnych adenozyiny (**105a-e**).

Postęp reakcji kontrolowałem przy pomocy TLC w układzie D. Czas reakcji w zależności od związku mieścił się w zakresie od 8-24 h. Po zakończeniu reakcji oddestylowałem mieszaninę rozpuszczalników na wyparce obrotowej a surowy produkt oczyściłem na TLC w układzie A lub B.

Tabela 5. Wydajności otrzymanych aminokwasowych pochodnych (**105a-e**).

Związek	n	Wyd. [%]
<b>105a</b>	2	53
<b>105b</b>	5	61
<b>105c</b>	6	46
<b>105d</b>	7	50
<b>105e</b>	10	56

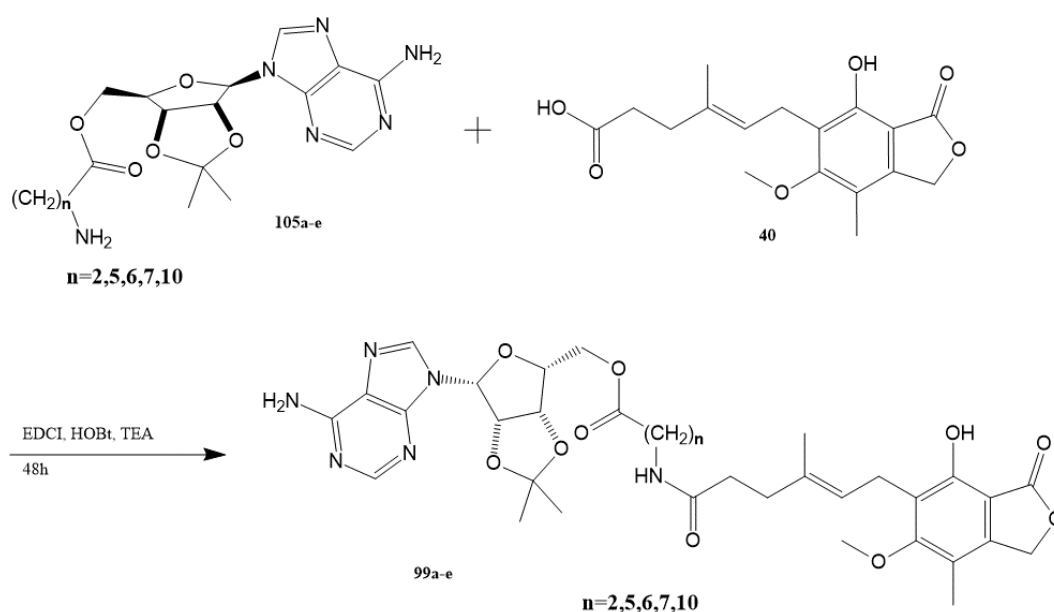
### 3.1.5. Synteza aminokwasowych pochodnych adenozyiny z MPA

Do syntezy aminokwasowych pochodnych adenozyiny z MPA (**99a-e**) wykorzystałem wcześniej otrzymane aminokwasowe pochodne adenozyiny (**105a-e**) (Schemat 24).

W celu utworzenia wiązania amidowego posłużyłem się następującymi odczynnikami kondensującymi: T3P/Py, EEDQ/Py, PyBOP/DIPEA, EDCI/HOBt, chloromrówczan izobutyliu/NMM (metoda mieszanych bezwodników).

Najskuteczniejszą okazała się metoda wykorzystująca połączenie odczynnika kondensującego EDCI w obecności HOBt zwiększającego aktywność grupy karboksylowej na reakcję substytucji nukleofilowej. Metoda charakteryzowała się największą wydajnością, czystością i łatwiejszą izolacjążądanego produktu.

W reakcji stosowałem odpowiednią aminokwasową pochodną adenozyiny, kwas mykofenolowy, EDCI, HOBt, TEA oraz DMF jako rozpuszczalnik zgodnie z Schematem 24. Mieszaninę chłodziłem do temperatury w zakresie -10 °C do 0 °C i prowadziłem reakcję przez 48 h. Postęp reakcji kontrolowałem przy pomocy TLC w układzie D lub E. Następnie oddestylowałem DMF przy użyciu pompy próżniowej i po oczyszczeniu na płytkach TLC w układzie A lub B uzyskałem koniugaty (**99a-e**) z wydajnością podaną w Tabeli 6.



Schemat 24. Synteza koniugatów MPA z aminokwasowymi pochodnymi adenozyiny (**99a-e**).

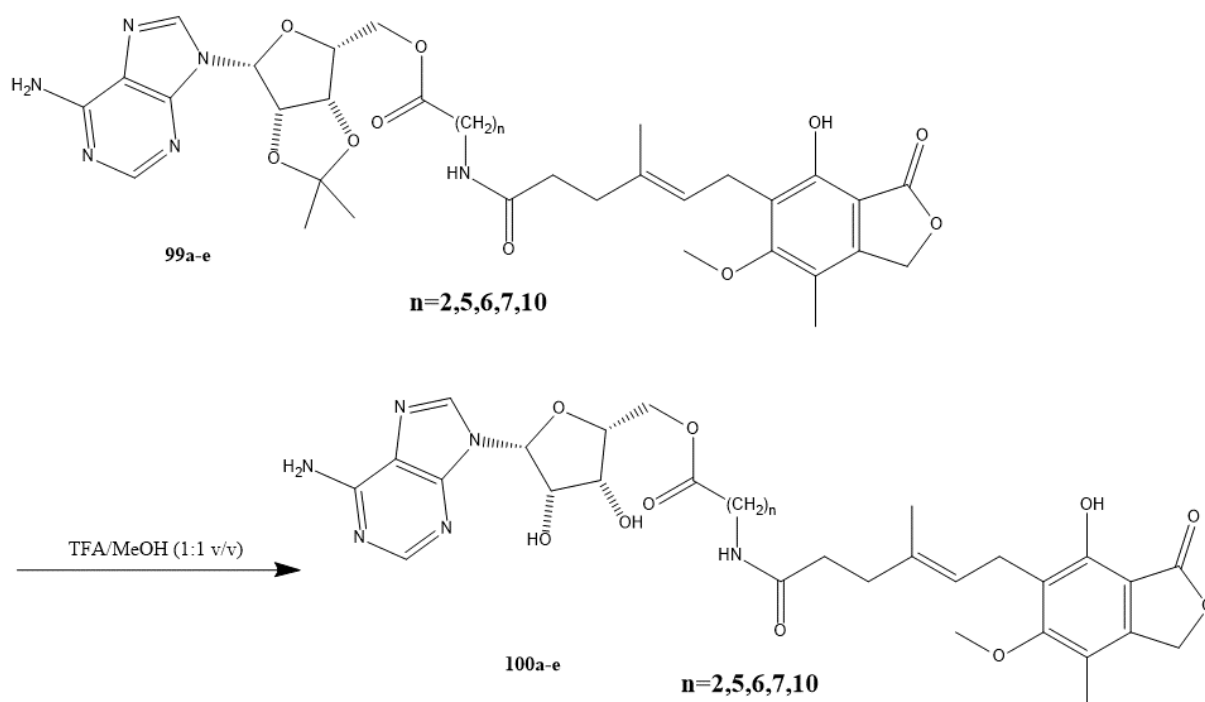
Tabela 6. Wydajności otrzymanych koniugatów MPA z aminokwasowymi pochodnymi adenozyiny (**99a-e**).

Związek	n	Wyd. [%]
<b>99a</b>	2	50
<b>99b</b>	5	62
<b>99c</b>	6	47
<b>99d</b>	7	64
<b>99e</b>	10	72

### 3.1.6. Deprotekcja osłony izopropylidenu z koniugatów MPA zawierających aminokwasowe pochodne adenozyiny

W celu deprotekcji osłony izopropylidenu ze związków **99a-e** wykorzystałem kilka układów rozpuszczalników: TFA:MeOH; CH<sub>3</sub>COOH:H<sub>2</sub>O; H<sub>2</sub>O:MeOH:TFA; piperidyna: CH<sub>3</sub>CN; Et<sub>3</sub>N:pirydyna.

Skuteczną metodą deprotekcji osłony izopropylidenu okazał się układ TFA:MeOH (1:1, v/v) zgodnie ze Schematem 25.



Schemat 25. Synteza koniugatów MPA (**100a-e**).



Postęp reakcji kontrolowałem za pomocą TLC w układzie D w odpowiednim układzie rozpuszczalników. Czas reakcji w zależności od związku mieścił się w zakresie od 6-10 h. Po zakończeniu reakcji oddestylowałem mieszaninę rozpuszczalników przy użyciu wyparki obrotowej, a surowy produkt oczyściłem również wykorzystując TLC w układzie A lub B na płytkach pokrytych żelem krzemionkowym. Zsyntezowane związki scharakteryzowałem za pomocą widm  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, MS oraz HPLC-MS. Dodatkowo określiłem temperatury topnienia dla związków krystalicznych.

Tabela 7. Wydajności otrzymanych koniugatów MPA z aminokwasowymi pochodnymi adenozyiny po deprotekcji osłony izopropylidenowej (**100a-e**).

Związek	n	Wyd. [%]
<b>100a</b>	2	61
<b>100b</b>	5	73
<b>100c</b>	6	56
<b>100d</b>	7	61
<b>100e</b>	10	69

### 3.2. Omówienie wyników badań biologicznych

Nowe związki rozpatrywane jako potencjalne substancje aktywne leków, zanim będą produkowane na skalę masową w celu sprzedaży, muszą przejść wieloetapową drogę badań biologicznych. Pierwszym etapem, zaraz po zsyntezowaniu jest określenie ich aktywności biologicznej oraz toksyczności *in vitro* wobec komórek charakterystycznych dla przeznaczenia docelowego potencjalnych terapeutyków.

Testy żywotności (cytotoksyczności) oparte są na badaniu integralności błony komórkowej czyli określeniu jej stanu. Mogą działać na kilka sposobów. Pierwszy z nich polega na wybarwieniu jedynie komórek martwych. W tym celu stosuje m.in. barwniki: zielen lizaminowa, enzymu Y oraz błękit trypanu. Drugim sposobem, jest wybarwienie komórek żywych. W tym wypadku stosuje się np. diocjan fluoresceiny. Istnieją również techniki podwójnego barwienia, w których stosuje się oznaczanie zarówno żywych jak i martwych komórek. Inny rodzaj technik, w których pomiary opartą są o badanie aktywności enzymów. Do nich zaliczamy np: *N*-acetylo- $\beta$ -D-glukozaminidaza (NAG), dehydrogenaza mleczanowa (LDH) oraz dehydrogenaza bursztynianowa (MTT). Ta ostatnia polega na zmierzeniu

aktywności przemian energetycznych występujących w mitochondriach. Test polega się o redukcję barwnika żółtego MTT do ciemnoniebieskiego formazanu. Aktywność oksydacyjną mitochondriów określa ilość formazanu zmierzonego spektrofotometrycznie [93-99].

W celu określenia aktywności proliferacyjnej komórek (zdolności do replikacji DNA) wobec badanych substancji stosuje się znakowane izotopowo prekursorzy takie jak: metyl- $^3\text{H}$ -tymidynę,  $^{14}\text{C}$ -adenine,  $^{14}\text{C}$ -urydynę oraz  $^{32}\text{P}$  fosfor. Izotopy promieniotwórcze wbudowują się w DNA podczas fazy S podziały komórkowego i bada wykorzystując pomiar scyntylacyjny promienowania  $\beta$  [100, 101].

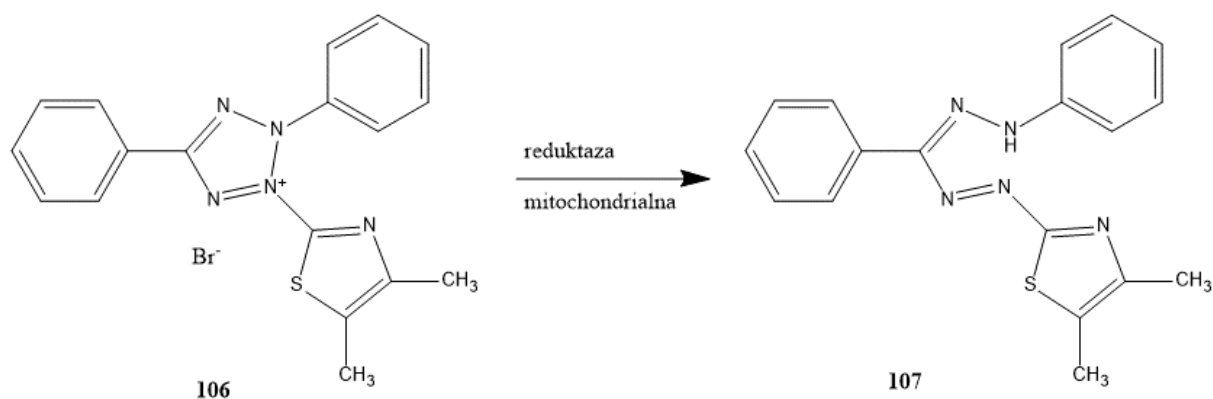
W celu zbadania właściwości immunosupresyjnych otrzymanych związków wykorzystałem test MTT w celu określenia żywotności komórek, zaś do określenia stopnia zahamowania proliferacji komórek posłużyłem się testem inkorporacji metyl- $^3\text{H}$ -tymidyny. Związki zbadalem wykorzystując limfoidalną linię komórkową Jurkat (model ostrej, ludzkiej białaczki komórek T). Wybór komórek ludzkich zaliczanych do nowotworów hematologicznych stanowią korzystny model do wstępnych badań immunosupresyjnych. Z kolei jako odniesieniami do badań posłużyły mi mononuklearne komórki krwi obwodowej (PBMC) pobrane i wyizolowane od zdrowych dawców, aktywowane monoklonalnymi przeciwciałami anti-CD3 i anti-CD28.

Wszystkie testy wykonałem w trzykrotnych powtórzeniach w określonych stężeniach. Związki rozpuszczałem w DMSO lub etanolu. Roztwory do badań przygotowywałem metodą seryjnych rozcieńczeń. Dla porównania przygotowałem rozcieńczenia roztworów adenozyiny, MPA, MPAAdeIPr, MPAAdeOH oraz samych rozpuszczalników w celu zbadania ich wpływu na komórki.

### **3.2.1. Analiza przeżywalności komórek testem MTT**

Test MTT jest powszechnie stosowany i rekomendowany przez organizacje normotwórcze. Stosowany jest do określenia stopnia toksyczności związków w stosunku do badanych komórek. Na podstawie wyników testu oblicza się wartość  $\text{IC}_{50}$  (stężenie związku, przy którym proliferacja komórek zostaje zahamowana w 50 % względem komórek kontrolnych), wskazującą informacje o potencjalnej dawce, która mogła by być zastosowana w przypadku leczenia terapeutycznego [102].

Metoda ta opiera się na redukcji bromku tetrazoliowego (MTT) do formazanu przez dehydrogenazę bursztynianową (Schemat 26), która występuje wyłącznie w żywych komórkach. W wyniku redukcji powstają szarofioletowe kryształki formazanu, które rozpuszcza się w izopropanolu. Zmianę zabarwienia i jej intensywność jest mierzona spektrofotometrycznie i odpowiada ona mierze żywotności komórek.



Schemat 26. Redukcja bromku tetrazoliowego (MTT) przez dehydrogenazę bursztynianową.

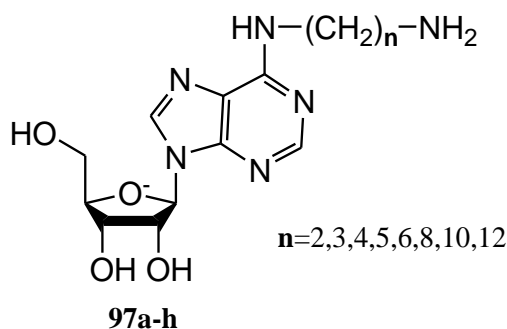
### 3.2.2. Oznaczenie aktywności cytotoksycznej metodą MTT aminoalkilowych pochodnych adenozyliny oraz ich koniugatów z MPA wobec linii komórkowej Jurkat i aktywowanych limfocytów PBMC

Test MTT pozwala ocenić cytotoksyczność określonego czynnika, którego wynik służy określeniu parametru wartości  $IC_{50}$  (stężenie związku, przy którym proliferacja komórek jest zahamowana w 50% w stosunku do komórek kontrolnych). Wartość ta pomaga ocenić potencjalną dawkę, jaką można zastosować w przypadku jeśli substancja została dopuszczona do użytku terapeutycznego.

Komórki inkubowałem w cieplarni w pożywce wraz z badanymi związkami (amidowe pochodne adenozyliny oraz ich koniugaty MPA wraz z związkami referencyjnymi) w dziewięciu różnych stężeniach przez okres 48 h. Następnie dodałem MTT i inkubowałem kolejne 3 h. Powstały wytrącony formazan rozpuściłem w izopropanolu (dodatek 0,4 N HCl) i wytrząsałem przez 15 min., a następnie mierzyłem absorbancję przy długości fali 570 nm.

## Aminoalkilowe pochodne adenozyzny

Wyniki zaprezentowane w Tabeli 8 wskazują, że pochodne adenozyzny (**97a-h**) (Rys. 14) wykazują większą cytotoksyczność w porównaniu z adenozyzną. Jednak można zauważyć, że długość łańcucha diaminowego wpływa na cytotoksyczność. Im dłuższy łańcuch, tym większa cytotoksyczność związku.



Rys. 14. Aminoalkilowe pochodne adenozyzny (**97a-h**).

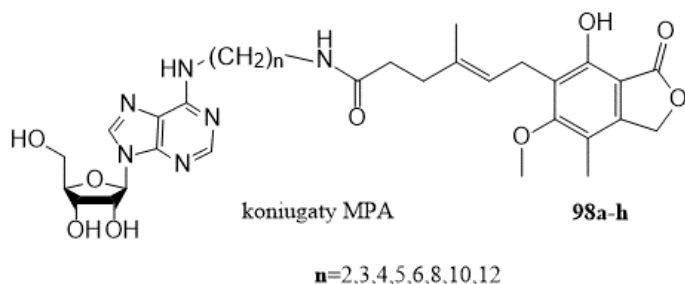
Tabela 8. Wartości  $IC_{50}$  [ $\mu M$ ] aktywności cytotoksycznej pochodnych adenozyzny (**97a-h**) obliczone na podstawie testu kolorymetrycznego MTT dla linii komórkowej Jurkat oraz PBMC (mediana $\pm$ sd).

Związek	Jurkat				PBMC			
	$IC_{50}$	$\pm$	p	F	$IC_{50}$	$\pm$	p	F
<b>97a</b>	2273,21	305,50	0,05	221,83	179,18	127,61	0,04	305,36
<b>97b</b>	1796,57	92,50	0,37	3,13	718,38	36,35	0,02	910,90
<b>97c</b>	15,07	7,09	0,01	2602,72	21,28	6,80	0,00	165513,90
<b>97d</b>	9,93	4,37	0,14	23,57	10,78	1,56	0,10	46,31
<b>97e</b>	26,75	2,40	0,11	38,39	18,01	5,19	0,11	38,70
<b>97f</b>	13,94	3,80	0,04	252,79	12,93	7,28	0,00	44051,96
<b>97g</b>	35,26	15,15	0,35	3,56	118,10	11,12	0,10	49,22
<b>97h</b>	29,07	8,66	0,07	115,26	25,52	6,88	0,01	4895,72
<b>6 ADO</b>	<b>2912,36</b>	<b>548,57</b>	----	----	<b>3010,40</b>	<b>911,54</b>	---	----

p - istotność statystyczna, F - test Fishera dla porównania: (**6**) (adenozyzna).

## Koniugaty MPA oparte o aminoalkilowe pochodne adenozyzny

W przypadku koniugatów MPA (**98a-h**) (Rys. 15, Tabela 9) tendencja jest podobna, tylko w przypadku komórek Jurkat, gdzie wszystkie koniugaty są bardziej cytotoksyczne od MPA. Z odwrotną sytuacją mamy do czynienia obserwując komórki PBMC, gdzie tylko dwa koniugaty (**98c**) i (**98d**) wykazują większą cytotoksyczność w porównaniu do MPA. Wszystkie pozostałe są od 4 do nawet 48 razy mniej cytotoksyczne. W tym przypadku trudno zauważyć korelację między długością łącznika diaminowego a cytotoksycznością.



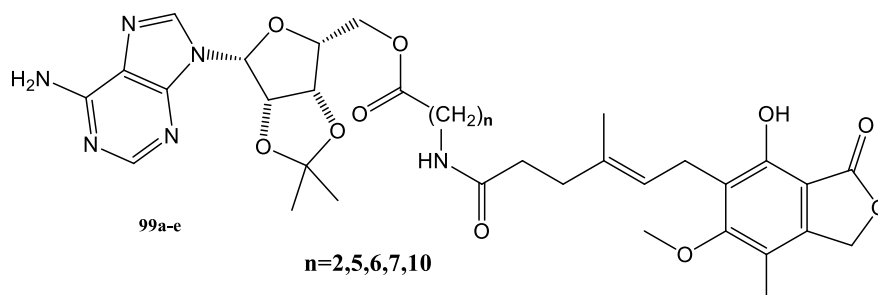
Rys. 15. Koniugaty MPA (**98a-h**) zawierające aminoalkilowe pochodne adenozyzny.

Tabela 9. Wartości  $IC_{50}$  [ $\mu M$ ] aktywności cytotoksycznej koniugatów MPA (**98a-h**) obliczone na podstawie testu kolorymetrycznego MTT dla linii komórkowej Jurkat oraz PBMC (mediana $\pm$ sd).

Związek	Jurkat				PBMC			
	$IC_{50}$	$\pm$	p	F	$IC_{50}$	$\pm$	p	F
<b>98a</b>	476,96	106,43	0,05	168,89	125,52	29,54	0,39	2,87
<b>98b</b>	1109,53	47,07	0,07	108,78	80,91	11,63	0,36	3,35
<b>98c</b>	589,25	43,72	0,05	206,32	5,15	1,17	0,12	34,73
<b>98d</b>	68,27	3,16	0,00	270746,10	5,19	1,30	0,05	179,36
<b>98e</b>	73,12	6,58	0,01	9351,71	69,53	1,50	0,09	56,93
<b>98f</b>	73,77	37,03	0,02	1538,56	232,21	19,95	0,05	186,04
<b>98g</b>	92,30	36,84	0,01	17047,80	721,95	38,49	0,14	24,59
<b>98h</b>	13,15	3,56	0,12	33,96	319,83	1,99	0,11	37,87
<b>40 MPA</b>	<b>1553,35</b>	<b>204,16</b>	----	----	<b>15,92</b>	<b>8,05</b>	----	----

p - istotność statystyczna, F- test Fishera dla porównania: MPA (**40**).

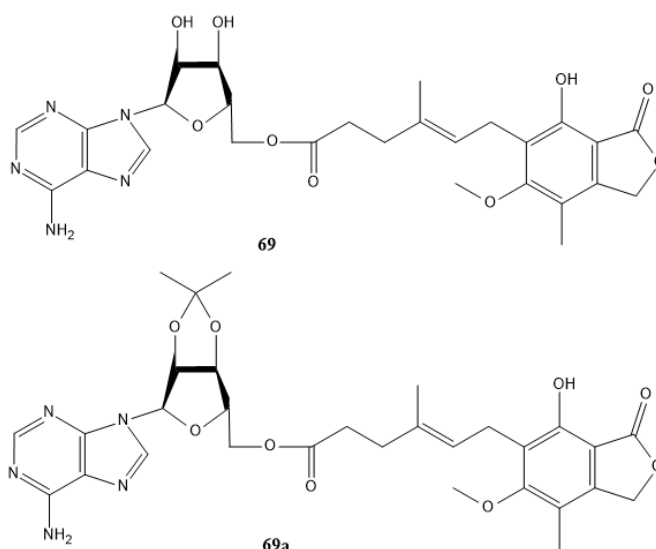
## Koniugaty MPA zawierające aminokwasowe pochodne adenozyiny z osłoną izopropylidenową



Rys. 16. Koniugaty MPA (**99a-e**) oparte o aminokwasowe pochodne adenozyiny z osłoną izopropylidenową.

W literaturze chemicznej opisano estrowe koniugaty kwasu mykofenolowego i adenozyiny (**69**), (**69a**) (Rys. 17), które nie zawierają łącznika aminokwasowego [85]. Postanowiłem otrzymać obydwie związki celem włączenia ich do swoich badań i porównania właściwości cytotoksycznych.

Wyniki przedstawione w Tabeli 10 wskazują, że koniugaty MPA oparte o aminokwasowe pochodne adenozyiny z osłoną izopropylidenową w części rybozy wykazują porównywalną cytotoksyczność zarówno w porównaniu do MPA jak i pochodnych (**69**) oraz (**69a**). Zauważa się również korelację pomiędzy długością łącznika aminokwasowego a toksycznością związku. Odstępstwem od tej reguły jest związek (**99e**).



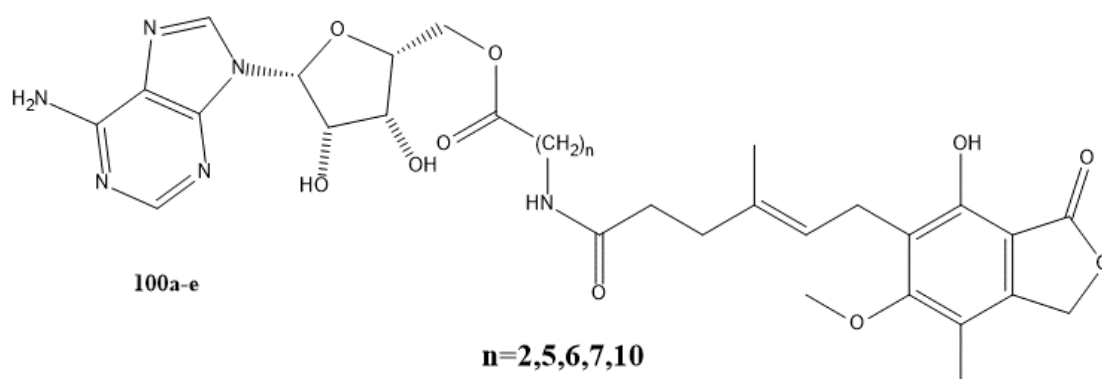
Rys. 17. Estrowe koniugaty kwasu mykofenolowego i adenozyiny (**69**) i (**69a**) [85].

Tabela 10. Wartości IC<sub>50</sub> [μM] aktywności cytotoksycznej analogów MPA (**99a-e**) opartych o aminokwasowe pochodne adenozyiny z osłoną izopropylidenową obliczone na podstawie testu kolorymetrycznego MTT dla linii komórkowej Jurkat oraz PBMC (mediana±sd).

Związek	Jurkat				PBMC			
	IC <sub>50</sub>	±	p	F	IC <sub>50</sub>	±	p	F
<b>69a</b>	<b>0,164</b>	<b>0,06187</b>	<0,0001	48,182	<b>0,328</b>	<b>0,0328</b>	0,1603	5,396
<b>99a</b>	1,47	0,1866	<0,0001	28,358	0,881	0,0587	0,0009	16,586
<b>99b</b>	0,83	0,0553	<0,0001	16,943	0,553	0,415	0,001	15,915
<b>99c</b>	0,407	0,0271	<0,0001	26,805	0,136	0,0502	0,0052	9,4702
<b>99d</b>	0,533	0,0266	<0,0001	25,694	0,133	0,0266	0,0005	19,277
<b>99e</b>	1,328	0,332	0,0076	5,2767	0,378	NAN	0,0001	29,178
<b>40 MPA</b>	<b>30,592</b>	<b>12.306</b>	----	----	<b>0,0299</b>	<b>0,00403</b>	----	----

p - istotność statystyczna, F - test Fishera dla porównania: MPA (**40**), (**69a**) [85].

### Koniugaty MPA zawierające aminokwasowe pochodne adenozyiny z wolnymi grupami hydroksylowymi



Rys. 18. Koniugaty MPA (**100a-e**) oparte o aminokwasowe pochodne adenozyiny z wolnymi grupami hydroksylowymi.

Wyniki dla analogów MPA zawierających aminokwasowe pochodne adenozyne z wolnymi grupami hydroksylowymi przedstawione w Tabeli 11 wskazują na mniejszą cytotoxycznosc w porownaniu do MPA (**40**) oraz (**69**)/(**69a**). Jedyne odstepstwo mozna zauwazyc w przypadku związku **100d**. Warto zauwazyc, iz analogi MPA z wolnymi grupami hydroksylowymi wykazuja zauwazalnie mniejsza cytotoxycznosc nizeli analogi MPA z oslonietymi grupami hydroksylowymi. Najlepsze wyniki zostaly otrzymane dla związku (**100a**). Był on okolo 100 razy mniej toksyczny nizeli MPA w przypadku komorek Jurkat oraz 10 razy mniej toksyczny dla komorek PBMC. Jednakowo jak w przypadku analogow z chronionymi grupami hydroksylowymi mozna dostrzec korelacje, w ktorej lacznik aminokwasowy jest dluzszy tym wieksza jest toksycznosc związku. Odstepstwem od tej reguly jest związek (**100e**).

Tabela 11. Wartości IC<sub>50</sub> [μM] aktywności cytotoxycznej analogow MPA (**100a-e**) opartych o aminokwasowe pochodne adenozyne obliczone na podstawie testu kolorymetrycznego MTT dla linii komorkowej Jurkat oraz PBMC (mediana±sd).

Związek	Jurkat				PBMC			
	IC <sub>50</sub>	±	p	F	IC <sub>50</sub>	±	p	F
<b>69</b>	0,878	NAN	0,0238	3,9123	0,172	0,00351	0,0005	19,435
<b>100a</b>	35,745	6,447	<0,0001	40,264	15,453	1,897	0,0055	9,2732
<b>100b</b>	41,891	NAN	0,1109	2,2758	0,440	0,146	<0,0001	58,923
<b>100c</b>	1,292	0,175	<0,0001	19,707	0,574	0,316	0,0002	23,778
<b>100d</b>	0,2814	0,0844	0,0002	11,195	0,281	0,141	<0,0001	50,5559
<b>100e</b>	1,461	0,217	0,0127	4,6441	13,150	2,966	0,0052	9,4624
<b>40 MPA</b>	<b>0,624</b>	<b>0,0937</b>	----	----	<b>2,185</b>	<b>1,561</b>	----	----

p - istotnosc statystyczna, F-test Fishera dla porownania: MPA (**40**), (**69**) [85] .

### 3.2.3. Analiza aktywnosci proliferacyjnej metoda inkorporacji TdR-3H

Metoda ta sluzi ocenie skutecznosci dzialania związku jako leku immunosupresyjnego. Wartość EC<sub>50</sub> czyli stężenie efektywne, jest wartoscia obliczona w teście zahamowania proliferacji. Im jego wartosc jest nizsza, tym nizsze stężenie związku,



które można zastosować w leczeniu. Test ten z powszechnie jest stosowany jako wskaźnik monitorowania syntezy DNA oraz proliferacji komórek [67]. Test został przeprowadzony w oparciu o linię komórkową Jurkat oraz PBMC.

Fundamentem tego testu jest wbudowanie znakowanej trytem tymidyny w strukturę DNA przez żywe komórki. Test przeprowadzałem na płytkach 96-dołkowych. Na płytkach inkubowałem komórki odpowiedniej linii komórkowej wraz z odpowiednimi stężeniami badanych związków w pożywce. Po okresie 72 h inkubacji dodałem TdR-3H i pozostawiłem na kolejne 18h. Po tym czasie przenieśliem komórki na specjalne filtry celulozowe i pozostawiłem do wyschnięcia. Następnie umieściłem filtry z komórkami w naczynia i dodałem płynu scyntylicyjnego. Pomiar radioaktywności jest mierzony w CPM. Dzięki zależności pomiędzy otrzymanymi wartościami CPM a stężeniami związków badanych wyznaczyłem wartość  $EC_{50}$  zakładając wartość komórek kontrolnych na poziomie 100 %.

### Aminoalkilowe pochodne adenozyiny

Wyniki testu proliferacyjnego przedstawione w Tabeli 12 dla pochodnych adenozyiny wykazują niższą wartość  $EC_{50}$  zarówno wobec komórek Jurkat jak i PBMC. Jedynym wyjątkiem jak związek (**97b**) ( $EC_{50}=141,52 \mu\text{M}$ ) wobec komórek PBMC. Wykazuje on około 4,5 krotnie wyższą wartość w porównaniu do adenozyiny.

Tabela 12. Wartości  $EC_{50}$  [ $\mu\text{M}$ ] aktywności cytotoksycznej pochodnych adenozyiny (**97a-h**) obliczone na podstawie testu TdR-3H dla linii komórkowej Jurkat oraz PBMC (mediana $\pm$ sd).

Związek	Jurkat				PBMC			
	$EC_{50}$	$\pm$	p	F	$EC_{50}$	$\pm$	p	F
<b>97a</b>	24,49	7,93	0,00	20144,03	0,97	0,25	0,01	6,59
<b>97b</b>	90,03	53,96	0,02	884,49	427,02	141,52	0,04	11,78
<b>97c</b>	1,48	0,68	0,10	47,23	0,59	0,34	0,01	6,67
<b>97d</b>	28,09	6,38	0,05	16,08	1,42	0,43	0,06	4,12
<b>97e</b>	279,46	81,87	0,03	50,80	0,82	0,55	0,04	10,19
<b>97f</b>	69,71	5,43	0,02	100,42	25,86	7,71	0,01	7,01
<b>97g</b>	0,71	0,71	0,02	75,43	44,49	5,96	0,02	6,50
<b>97h</b>	15,54	5,15	0,04	268,71	8,43	3,33	0,08	3,28
<b>6 ADO</b>	<b>1952,93</b>	<b>72,59</b>	----	----	<b>129,47</b>	<b>31,54</b>	----	----

p - istotność statystyczna, F -test Fishera dla porównania: (**6**) (adenozyina)

## Analogi MPA zawierające aminoalkilowe pochodne adenozyiny

W przypadku koniugatów MPA opartych o amidowe pochodne adenozyiny (Tabela 13) zależność ta jest niemalże odwrotna. Aktywność proliferacyjna badana na komórkach Jurkat jest wyższa lub prawie równa w porównaniu z MPA. Godnymi uwagi są związki (**98g**) ( $EC_{50}=0,41 \mu M$ ) oraz (**98h**) ( $EC_{50}=0,26 \mu M$ ), które okazały się najbardziej aktywnymi koniugatami MPA. Obserwując wyniki dla linii PBMC zauważymy, że wszystkie związki mają wartości znacząco większe niż MPA.

Tabela 13. Wartości  $EC_{50}$  [ $\mu M$ ] aktywności cytotoksycznej koniugatów MPA (**98a-h**) obliczone na podstawie testu TdR-3H dla linii komórkowej Jurkat oraz PBMC (mediana $\pm$ sd).

Związek	Jurkat				PBMC			
	$EC_{50}$	$\pm$	p	F	$EC_{50}$	$\pm$	p	F
<b>98a</b>	10,28	1,35	0,03	39,65	8,49	7,15	2,00E-06	90,18
<b>98b</b>	1,28	0,14	0,09	1,75	17,71	10,98	0,00	590,80
<b>98c</b>	10,77	0,47	0,05	1,52	11,87	3,81	0,00	177,97
<b>98d</b>	11,00	0,46	0,02	130,25	9,93	4,67	0,00	1899,88
<b>98e</b>	111,55	38,58	0,03	47,24	61,16	15,10	0,00	596,55
<b>98f</b>	16,36	2,15	0,05	12,44	13,63	5,07	0,00	704,60
<b>98g</b>	0,41	0,14	0,01	300,30	46,49	0,76	7,00E-06	62,86
<b>98h</b>	0,27	0,11	0,02	77,10	114,09	1,79	0,00	1962,40
<b>40 MPA</b>	12,17	3,34	----	----	9,89E-04	1,94E-04	----	----

p - istotność statystyczna, F - test Fishera dla porównania: MPA (**40**)

Wartości  $EC_{50}$  dla analogów MPA opartych o aminokwasowe pochodne adenozyiny z osłoną izopropylidenową (Tabela 14) charakteryzują się niższą wartością niż MPA w przypadku komórek Jurkat. W przypadku komórek PBMC sytuacja jest odwrotna, wszystkie wartości  $EC_{50}$  są wyższe od MPA.

Tabela 14. Wartości EC<sub>50</sub> [μM] aktywności cytotoksycznej analogów MPA (**99a-e**) opartych o aminokwasowe pochodne adenozy z osłoną izopropylidenową obliczone na podstawie testu TdR-3H dla linii komórkowej Jurkat oraz PBMC (mediana±sd).

Związek	Jurkat				PBMC			
	EC <sub>50</sub>	±	p	F	EC <sub>50</sub>	±	p	F
<b>69a</b>	1,640	0,932	0,0019	13,025	0,984	0,492	<0,0001	82,8
<b>99a</b>	1,322	0,108	0,0053	9,3904	0,147	0,0805	0,0081	122,14
<b>99b</b>	1,384	0,393	0,0039	10,432	1,107	0,415	0,0001	28,164
<b>99c</b>	0,814	0,543	0,0012	14,821	0,407	0,271	<0,0001	43,36
<b>99d</b>	0,133	0,0266	0,0021	12,646	0,400	0,0354	<0,0001	57,475
<b>99e</b>	1,2612	1,735	<0,0001	39,737	0,252	0,0631	<0,0001	338,71
<b>40 MPA</b>	30,592	12,306	----	----	0,0299	0,00403	----	----

p - istotność statystyczna, F- test Fishera dla porównania: MPA (**40**), (**69a**) [85].

### Analogi MPA zawierające aminokwasowe pochodne adenozy z wolnymi grupami hydroksylowymi

Jak można zauważyć w Tabeli 15 wszystkie analogi MPA ukazują niższą wartość EC<sub>50</sub> niż MPA wobec linii komórkowej Jurkat. Odwrotną sytuację można zaobserwować w przypadku linii PBMC. Dodatkowo można dostrzec korelację między długością łączącego aminokwasu a wartością otrzymaną podczas testu, chociaż nie jest już ona tak oczywista. Jedynym związkiem odbiegającym od tej zależności jest (**100e**) wobec linii Jurkat.

Tabela 15. Wartości EC<sub>50</sub> [μM] aktywności cytotoksycznej analogów MPA (**100a-e**) opartych o aminokwasowe pochodne adenozy z wolnymi grupami hydroksylowymi obliczone na podstawie testu TdR-3H dla linii komórkowej Jurkat oraz PBMC (mediana±sd).

Związek	Jurkat				PBMC			
	EC <sub>50</sub>	±	p	F	EC <sub>50</sub>	±	p	F
<b>69</b>	1,229	0,158	0,0014	14,165	0,351	0,0281	<0,0001	628,43
<b>100a</b>	4,995	0,562	0,0004	20,846	12,019	6,712	0,1113	48,47
<b>100b</b>	4,980	2,197	<0,0001	42,125	1,318	0,314	0,0001	160,11
<b>100c</b>	1,435	0,431	<0,0001	43,393	1,292	0,0363	<0,0001	67,535
<b>100d</b>	1,407	0,240	<0,0001	36,048	0,422	0,0374	<0,0001	1319,9
<b>100e</b>	3,055	1,594	<0,0001	162,86	0,266	0,0664	0,0047	9,8017
<b>40 MPA</b>	30,592	12,306	----	----	0,0299	0,00403	----	----

p - istotność statystyczna, F- test Fishera dla porównania: MPA (**40**), (**69**) [85] .

### 3.2.4. Wybór analogów MPA o najkorzystniejszych parametrach biologicznych

Aby określić, który związek posiada najkorzystniejsze parametry jako potencjalny lek, wykorzystałem współczynnik selektywności (SI), który charakteryzuje się zależnością pomiędzy wyliczonymi parametrami IC<sub>50</sub> oraz EC<sub>50</sub> według wzoru:

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

gdzie:

IC<sub>50</sub> - stężenie hamujące otrzymane w teście MTT

EC<sub>50</sub> - stężenie efektywne otrzymane w teście aktywności proliferacyjnej

W przypadku gdy wartość współczynnika selektywności jest większa, oznacza to mniejszą toksyczność związku w porównaniu z zastosowaną dawką badanego leku. Wynika z tego, że związki im posiadają większą wartości SI będą najkorzystniejsze w wykorzystaniu farmakologicznym.

Tabela 16. Wartości indeksu selektywności dla amidowych pochodnych adenozyiny (**97a-h**) oraz opartych o nie analogów MPA (**98a-h**).

Związek	Jurkat	PBMC
	IC <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub>
<b>97a</b>	<b>92,82</b>	<b>185,33</b>
<b>97b</b>	<b>19,96</b>	1,68
<b>97c</b>	<b>10,20</b>	<b>36,00</b>
<b>97d</b>	0,35	<b>7,60</b>
<b>97e</b>	0,10	<b>22,00</b>
<b>97f</b>	0,20	0,50
<b>97g</b>	<b>49,67</b>	2,65
<b>97h</b>	1,87	3,03
<b>6 ADO</b>	1,49	23,25
<b>98a</b>	46,38	14,79
<b>98b</b>	<b>869,13</b>	4,57
<b>98c</b>	54,70	0,43
<b>98d</b>	6,21	0,52
<b>98e</b>	0,66	1,14
<b>98f</b>	4,51	17,03
<b>98g</b>	<b>223,00</b>	15,53
<b>98h</b>	49,50	2,80
<b>40 MPA</b>	127,59	16103,57

Zgodnie z danymi w Tabeli 16 najbardziej obiecującymi pochodnymi adenozyiny są (**97a,b,c,g**) w przypadku komórek Jurkat, a (**97a,c,d,e**) w przypadku komórek PBMC. Wśród koniugatów z MPA jedynie (**98b**) oraz (**98g**) wykazały wyższą wartość współczynnika selektywności. Z kolei MPA posiadał wyższą wartość współczynnika SI wobec komórek PBMC aniżeli badane koniugaty.

Tabela 17. Wartości IS dla analogów MPA opartych o aminokwasowe pochodne adenozyiny z osłoną izopropylidenową (**99a-e**) oraz analogów MPA bez osłony (**100a-e**).

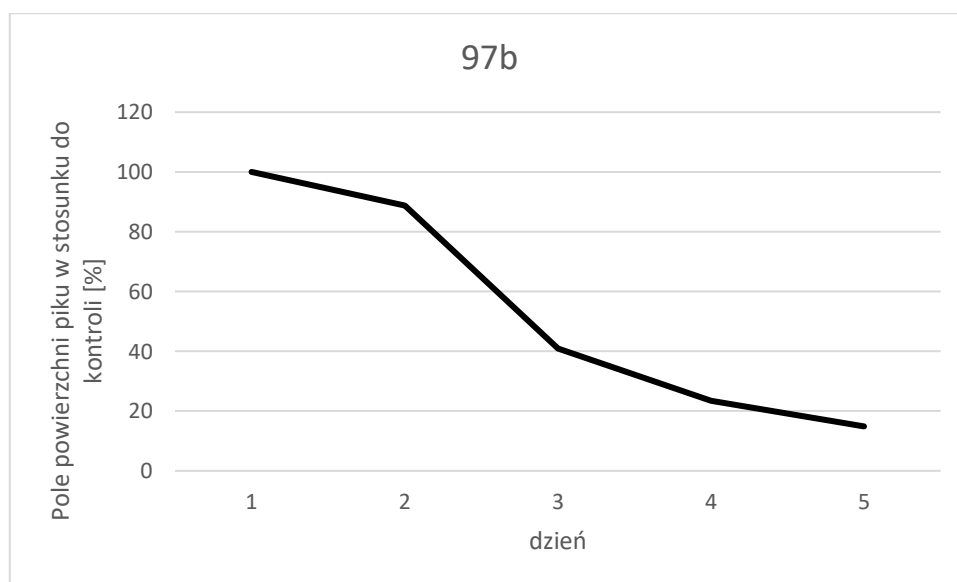
związek	Jurkat	PBMC
	IC <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub>
<b>69a</b>	0,100	0,333
<b>99a</b>	1,111	6,000
<b>99b</b>	0,600	0,750
<b>99c</b>	0,500	1,000
<b>99d</b>	4,000	1,333
<b>99e</b>	1,000	5,000
<b>69</b>	0,714	0,489
<b>100a</b>	7,156	1,286
<b>100b</b>	8,412	0,333
<b>100c</b>	0,900	0,444
<b>100d</b>	0,200	0,667
<b>100e</b>	<b>0,478</b>	<b>49,500</b>
<b>40 MPA</b>	0,020	73,069

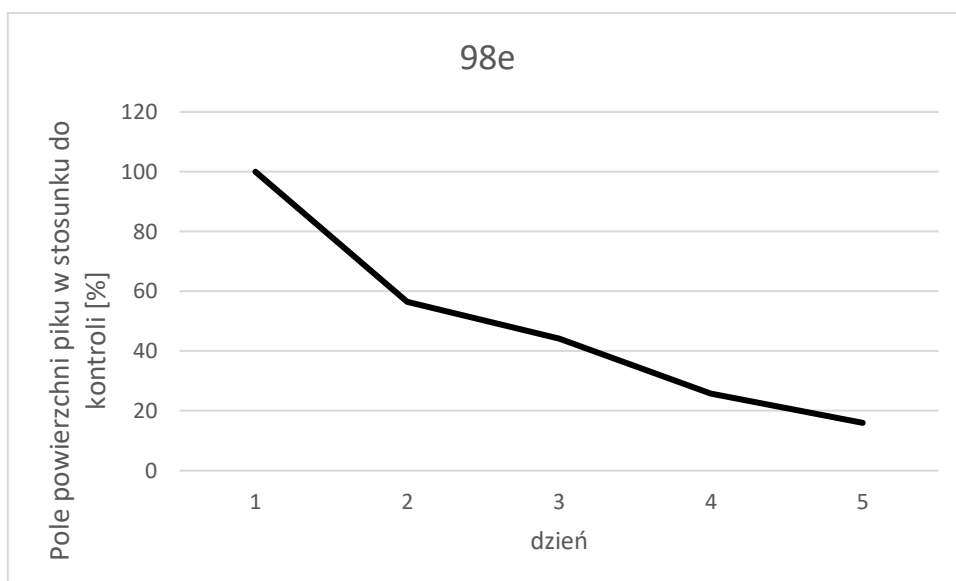
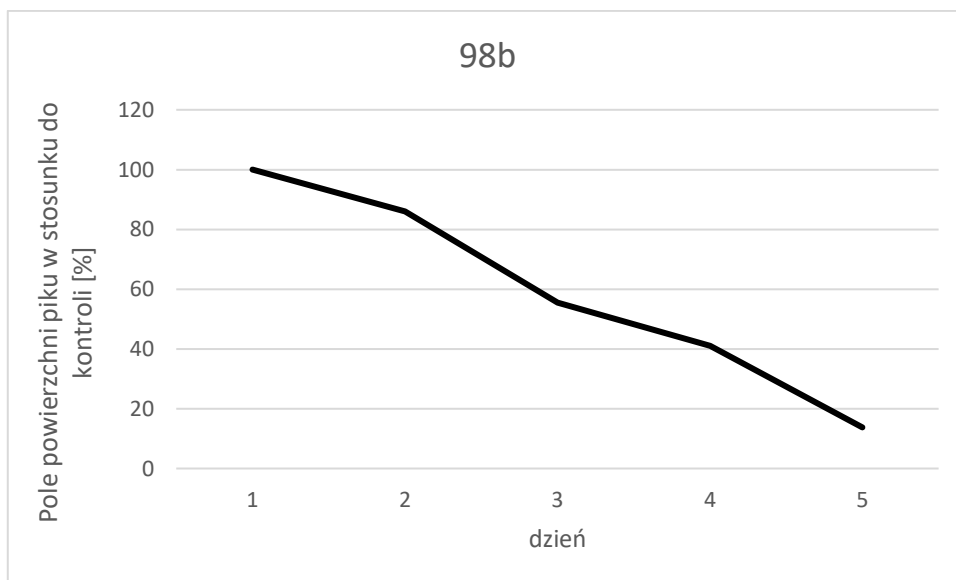
Wartości współczynnika SI wskazuje, że związek (**99e**) jest obiecujący - mimo mniejszej wartości współczynnika EC<sub>50</sub> i jest mniej toksyczny niż MPA. Pozostałe związki nie wykazują podobnej charakterystyki. W przypadku linii Jurkat wszystkie związki wykazują większą wartość współczynnika SI, zaś w przypadku linii PBMC sytuacja jest odwrotna.

### 3.2.5. Oznaczenie stabilności wybranych analogów przez komórki Jurkat z wykorzystaniem chromatografii HPLC-MS

W celu zdefiniowania stabilności (czasu półtrwania) związków przez komórki podczas hodowli zdecydowałem wykonać test HPLC-MS. Linię komórkową Jurkat inkubowałem przez 5 dni razem z badanymi związkami o stężeniu  $EC_{50}$  wcześniej określonym zgodnie z wcześniejszymi testami. Z kolei każdego następnego dnia pobierałem próbkę do testu MS HPLC. Do badanego dołka dodawałem wody i delikatnie mieszałem. Następnie tak przygotowany roztwór pobierałem do próbki Eppendorfa i odwirowywałem. Potem zbierałem delikatnie nadsącz. Tak przygotowane próbki przechowywałem w zamrażalniku do całkowitego ukończenia testu.

Wyniki HPLC-MS otrzymałem w postaci pól powierzchni badanego piksu. Wynik dla pierwszej próbki pobranej w dniu rozpoczęcia testu przyjąłem jako 100 % związku.

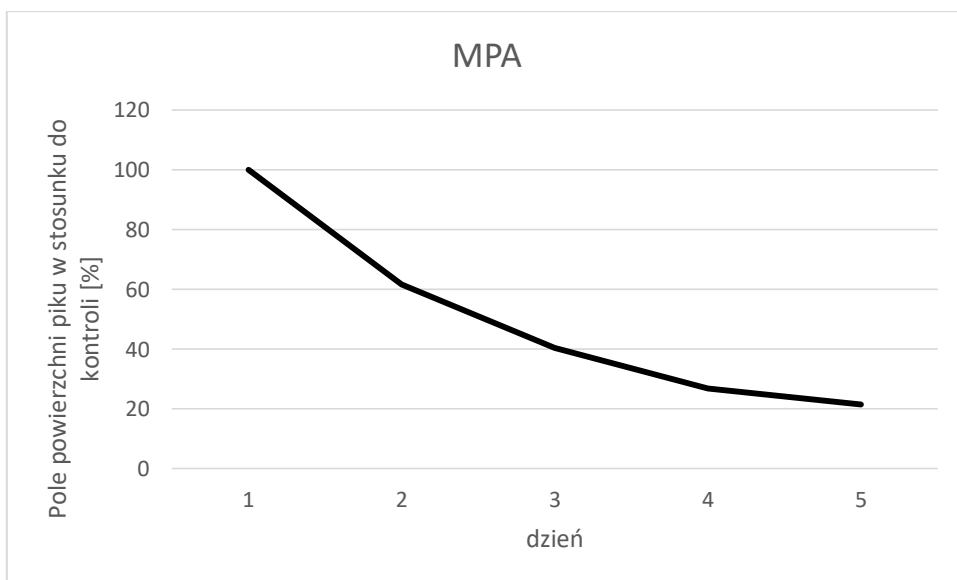
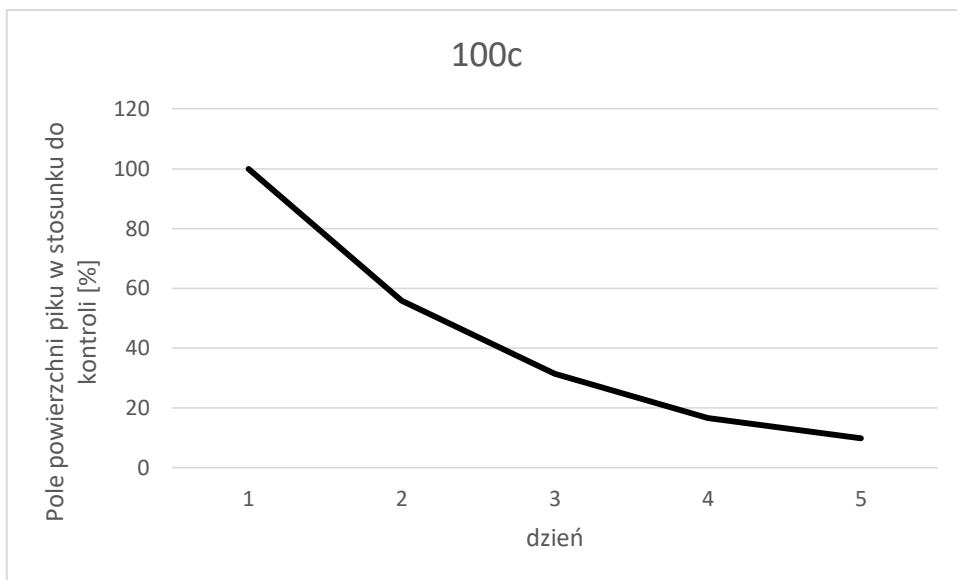
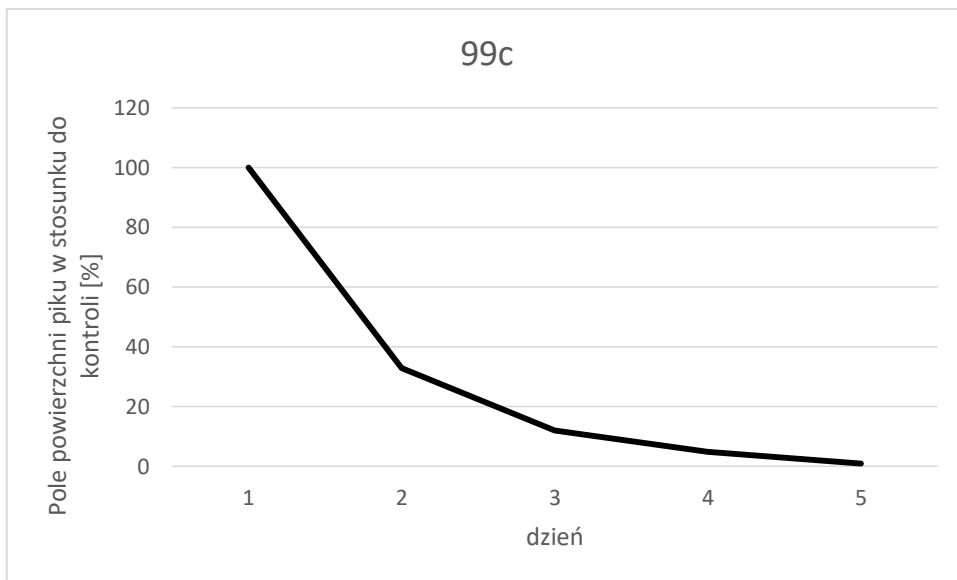




**Wykres 1.** Zawartość związków amidowych pochodnych adenozy (97b) oraz składających się z nich koniugatów z MPA (98b), (98e) w czasie 5-cio dniowej inkubacji.

Z powyższych wykresów można wywnioskować, że już po trzech dniach w dołku znajdują się tylko 50 % związku. Co za tym idzie, w czasie przeprowadzania testu powyżej 5 dni, należy dodać ponownie związku podczas pasażowania hodowli.





**Wykres 2.** Zawartość koniugatów MPA (**99c**), (**100c**) zawierających aminokwasowe pochodne adenozyiny w czasie 5-cio dniowej inkubacji.

Analizując wykresy stabilności związków analogów MPA zawierających aminokwasowe pochodne adenozyiny wobec komórek Jurkat możemy zauważyć, że badane pochodne szybciej są „trawione” przez komórki aniżeli samo MPA. W związku z powyższym, już od 4-5-tego dnia należałoby uzupełnić badanym związkiem podczas dłuższych testów inkubacyjnych.

#### 4. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

Otrzymane związki oczyszczałem przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej na płytkach TLC pokrytych żelem krzemionkowym [silica gel 60 (0,040-0,063mm); 1.05554.0001 Merck] wykorzystując następujące układy rozwijające:

Eluent A - chloroform : metanol (25:1, v/v)

Eluent B - chloroform : metanol (20:1, v/v)

Eluent C - chloroform : metanol (15:1, v/v)

Eluent D - chloroform : metanol (10:1, v/v)

Eluent E - chloroform : metanol (12:1, v/v)

oraz na kolumnie z wypełnieniem jakim był żel krzemionkowy (gel Merck, Kieselgel 60 (70-230 mesh)) w układzie: chloroform : metanol : amoniak aq (25 %).

Jako odczynnik wywołujący zastosowałem:

- wywoływacz ninhydrynowy o składzie: 200 mg ninhydryny, 100 ml etanolu, 2 ml kwasu octowego.

Temperatury topnienia zostały zmierzone przy pomocy kapilary w aparacie Kohler (bez korygowania wartości).

Widma  $^1\text{H}$  NMR oraz  $^{13}\text{C}$  NMR zostały wykonane na aparacie Varian Unity 500 MHz oraz Gemieni 200 MHz w Gdańskim Międzyuczelnianym Laboratorium NMR.

Widma masowe wykonano na aparacie BIFLEX III Bruker w Katedrze Chemii Analitycznej Politechniki Gdańskiej, z zastosowaniem CCA lub DHB jako matrycy.

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

Parametry chromatograficznej detekcji związków:

Kolumna: Poroshell EC-18-C18 (3,0x150 mm) / 2,7  $\mu\text{m}$ , Agilent Technologies

Temperatura kolumny: 40 °C

Objętość iniekcji: 2 µl

Przepływ: 0,4 ml/min

Eluenty: 0,1 % HCOOH w H<sub>2</sub>O / 0,1 % HCOOH w ACN/MeOH (1:1, v/v)

Detekcja UV-Vis: UV:254 nm; Vis:580 nm

Pomiary spektrofotometryczne wykonane zostały za pomocą spektrofotometru PerkinElmer 2030Multilabel Reader Victor™X4 w Zakładzie Immunologii Klinicznej i Transplantologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Pomiary scyntylicyjne zostały wykonane za pomocą czytnika scyntylicyjnego fazy płynnej LSC-Beckman w Katedrze i Zakładzie Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w czasie 2 min/próbka oraz 5 min/próbka.

Wartości IC<sub>50</sub> oraz EC<sub>50</sub> wyznaczone były za pomocą programu SigmaPlot 11.

Równanie: „Four Parameter Logistic” (cztery parametry logistyczne) o wzorze:

$Y = \min + (\max - \min) / (1 + (x / (IC_{50} \text{ lub } EC_{50})^{-Hillslope}))$  wykreślony z opcją „Log X axis”

Wartości p i F wyznaczone były z wykorzystaniem programu STATYSTYKA 10.0.

#### 4.1. Materiały/odczynniki zastosowane podczas prac syntetycznych pochodnych aminoalkilowych oraz ich koniugatów z MPA

Nazwa	Firma
rybozyd 6-chloropuryny	Alfa Aesar
diaminy	Sigma-Aldrich
MPA	Sigma-Aldrich
adenozyna	Sigma-Aldrich
chronione aminokwasy	Sigma-Aldrich
DMAP	Sigma-Aldrich

DMF	Sigma-Aldrich
EDCI	Sigma-Aldrich
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	POCH
CHCl <sub>3</sub>	POCH
płytki TLC	Merck
MeOH	POCH
octan etylu	POCH
aceton	POCH

## 4.2. Synteza aminoalkilowych pochodnych adenozyiny

Pochodne adenozyiny otrzymałem zgodnie z procedurą opisaną w literaturze [3].

### 4.2.1. Synteza *N*<sup>6</sup>-(2-aminoetylo)adenozyiny **97a**

97,5 mg (0,34 mmoli) rybozydu 6-chloropuryny, 60,1 mg (1 mmol) 1,2-diaminoetanu, 0,14 ml (1 mmol) trietyloaminy rozpuściłem w 5 ml etanolu i mieszaninę ogrzewałem przez 18 h w temp 60 °C. Następnie po oddestylowaniu rozpuszczalnika surowy produkt oczyściłem na kolumnie chromatograficznej w układzie CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH:25%NH<sub>3</sub>aq. (5:3:0,3 v/v). Otrzymałem 54 mg (wyd. 51 %) pochodnej **97a** w postaci oleju.

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO, δ (ppm) ): 2,75 (t, 2H, C2''-H), 3,31 (br s, 2H, C1''-H), 3,51 i 3,65 (2x m, 2H, C5'-H), 3,98 (m, 1H, C4'-H), 4,15 (dd, 1H, C3'-H), 4,61 (dd, 1H, C2'-H), 5,89 (d, 1H, C1'-H), 7,80 (br s, 1H, N6-H), 8,20 (s, 1H, C2-H), 8,35 (s, 1H, C8-H).

### 4.2.2. Synteza *N*<sup>6</sup>-(3-aminopropilo)adenozyiny **97b**

97,5 mg (0,34 mmol) rybozydu 6-chloropuryny, 74,12 mg (1 mmol) 1,3-diaminopropanu, 0,14 ml (1 mmol) trietyloaminy rozpuściłem w 5 ml etanolu i mieszaninę ogrzewałem przez 18 h w temp 60 °C. Następnie po oddestylowaniu rozpuszczalnika pozostałość oczyściłem na kolumnie chromatograficznej w układzie CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH:25%NH<sub>3</sub>aq. (5:2:0,2 v/v). Otrzymałem 75,5 mg (wyd. 68 %) produktu **97b** w postaci oleju.

$^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO,  $\delta$  (ppm) ): 1,50 (t, 4H, C1''-H, C2''-H), 1,70 (br s, 2H, C3''-H), 3,55 i 3,59 (2x m, 2H, C5'-H), 3,97 (m, 1H, C4'-H), 4,15 (dd, 1H, C3'-H), 4,61 (dd, 1H, C2'-H), 5,90 (d, 1H, C1'-H), 7,96 (br s, 1H, N6-H), 8,21 (s, 1H, C2-H), 8,35 (s, 1H, C8-H).

#### 4.2.3. Synteza $N^6$ -(4-aminobutylo)adenozyny 97c

97,5 mg (0,34 mmoli) rybozydu 6-chloropuryny, 80 mg (1 mmol) dichlorowodorku 1,4-diaminobutanu, 0,28 ml (2 mmol) trietyloaminy rozpuściłem w 5 ml etanolu i mieszaninę ogrzewałem przez 18 h w temperaturze 60 °C. Po oddestylowaniu rozpuszczalnika pozostałość oczyściłem na kolumnie chromatograficznej w układzie  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:25\%\text{NH}_3\text{aq.}$  (5:2:0,3 v/v). Otrzymałem 28,5 mg (wyd. 50 %) produktu w postaci oleju.

$^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO,  $\delta$  (ppm)): 1,63 (m, 2H, C3''-H), 1,64 (m, 2H, C2''-H), 2,79 (t, 2H, C4''-H), 3,37 (br s, 2H, C1''-H), 3,51 i 3,55 (2 x m, 2H, C5'-H), 4,15 (m, 1H, C4'-H), 4,60 (dd, 1H, C3'-H), 5,26 (dd, 1H, C2'-H), 5,87 (m, 1H, C1'-H), 7,98 (br s, 1H, N6-H), 8,22 (s, 1H, C2-H), 8,38 (s, 1H, C8-H).

#### 4.2.4. Synteza $N^6$ -(5-aminopentylo)adenozyny 97d

97,5 mg (0,34 mmol) rybozydu 6-chloropuryny, 175 mg (1 mmol) 1,5-dichlorowodorku diaminopentanu, 0,56 ml (4 mmol) trietyloaminy rozpuściłem w 5 ml etanolu i mieszaninę ogrzewałem przez 18 h w temperaturze 60 °C. Po oddestylowaniu rozpuszczalnika pozostałość oczyściłem na kolumnie chromatograficznej w układzie  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:25\%\text{NH}_3\text{aq.}$  (5:2:0,4 v/v). Otrzymałem 75 mg (wyd. 62 %) produktu w postaci oleju.

$^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO,  $\delta$  (ppm) ): 1,39 ( 2H, C3''-H), 1,58-1,60 (br s, 4H, C2''- H i C4''-H), 2,76 (t, 2H, C5''-H), 3,47 (br s, 2H, C1''-H), 3,57 i 3,65 (2 x m, 2H, C5'-H), 4,15 (m, 1H, C4'-H), 4,61 (dd, 1H, C3'- H), 5,24 (dd, 1H, C2'-H), 5,87 (m, 2H, C1'-H) 7,91 (br s, 1H, N6-H), 8,20 (s, 1H, C2-H), 8,36 (s, 1H, C8-H).

#### 4.2.5. Synteza $N^6$ -(6-aminoheksylo)adenozyny 97e

97,5 mg (0,34 mmoli) rybozydu 6-chloropuryny, 189,2 mg (1 mmol) dichlorowodorku 1,6-diaminoheksanu, 0,56 ml (4 mmol) trietyloaminy rozpuściłem w 5 ml etanolu i mieszaninę ogrzewałem przez 18 h w temp 60 °C. Mieszaninę oczyściłem na kolumnie

chromatograficznej w układzie  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:25\%\text{NH}_3\text{aq.}$  (5:2:0,2 v/v). Otrzymałem 79,5 mg (wyd. 63 %) produktu **97e** w postaci oleju.

$^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO,  $\delta$  (ppm)): 1,30-1,40 (br s, 4H,  $\text{C}3''\text{-H}$  i  $\text{C}4''\text{-H}$ ), 1,56 (m, 2H,  $\text{C}2''\text{-H}$ ), 1,59 (m, 2H,  $\text{C}5''\text{-H}$ ), 2,74 (t, 2H,  $\text{C}6''\text{-H}$ ), 3,36 (br s, 2H,  $\text{C}1''\text{-H}$ ), 3,58 i 3,64 (2 x m, 2H,  $\text{C}5'\text{-H}$ ), 4,15 (m, 1H,  $\text{C}4'\text{-H}$ ), 4,61 (dd, 1H,  $\text{C}3'\text{-H}$ ), 5,24 (dd, 1H,  $\text{C}2'\text{-H}$ ), 5,88 (m, 2H,  $\text{C}1'\text{-H}$ ), 7,92 (br s, 1H,  $\text{N}6\text{-H}$ ), 8,20 (s, 1H,  $\text{C}2\text{-H}$ ), 8,35 (s, 1H,  $\text{C}8\text{-H}$ ).

#### 4.2.6. Synteza $\text{N}^6\text{-(8-aminooktylo)adenozyny 97f}$

97,5 mg (0,34 mmoli) rybozydu 6-chloropuryny, 144 mg (1 mmol) 1,8-diaminooktanu, 0,14 ml (1 mmoli) trietyloaminy rozpuściłem w 5 ml etanolu i mieszaninę ogrzewałem przez 18 h w temperaturze 60 °C. Następnie po oddestylowaniu rozpuszczalnika oczyściłem na kolumnie chromatograficznej w układzie  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:25\%\text{NH}_3\text{aq.}$  (5:2:0,3 v/v). Otrzymałem 91,5 mg (wyd. 68 %) produktu **97f**.  $R_f=0,4$ , temp. top. 174-176 °C.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO,  $\delta$  (ppm)): 1,22-1,35 (m, 4H,  $\text{C}3''\text{-H}$  i  $\text{C}4''\text{-H}$ ), 1,56 (m, 4H,  $\text{C}2''\text{-H}$ ,  $\text{C}7''\text{-H}$ ), 2,48-2,51 (t, 2H,  $\text{C}8''\text{-H}$ ), 3,54-3,46 (m, 2H,  $\text{C}1''\text{-H}$ ), 3,94 (m, 2H,  $\text{C}5'\text{-H}$ ), 4,12 (m, 1H,  $\text{C}4'\text{-H}$ ), 4,59 (m, 1H,  $\text{C}3'\text{-H}$ ), 5,85-5,86 (t, 1H,  $\text{C}2'\text{-H}$ ,  $\text{C}1'\text{-H}$ ), 7,88 (s, 1H,  $\text{N}6\text{-H}$ ), 8,18 (s, 1H,  $\text{C}2\text{-H}$ ), 8,32 (s, 1H,  $\text{C}8\text{-H}$ ).

MS (DHB)  $m/z$  obliczone dla  $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_4$  394,47; znalezione 395,1 ( $\text{M}^+$ ).

#### 4.2.7. Synteza $\text{N}^6\text{-(10-aminodecylo)adenozyny 97g}$

97,5 mg (0,34 mmol) rybozydu 6-chloropuryny, 172,31 mg (1 mmol) 1,10-diaminodekanu, 0,14 ml (1 mmol) trietyloaminy rozpuściłem w 5 ml etanolu i roztwór ogrzewałem przez 18 h w temperaturze 60 °C. Mieszaninę oczyściłem na kolumnie chromatograficznej w układzie  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_3\text{aq.}$  (5:2:0,2 v/v). Otrzymałem 133 mg (wyd. 92 %) produktu w postaci oleju.

$^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO,  $\delta$  (ppm)): 1,26 (br s, 12H,  $\text{C}3''\text{-C}8''\text{-H}$ ), 1,53 (m, 2H,  $\text{C}2''\text{-H}$ ), 1,56 (m, 2H,  $\text{C}9''\text{-H}$ ), 2,75 (t, 2H,  $\text{C}10''\text{-H}$ ), 3,34 (br s, 2H,  $\text{C}1''\text{-H}$ ), 3,58 i 3,65 (2 x m, 2H,  $\text{C}5'\text{-H}$ ), 4,14 (m, 1H,  $\text{C}4'\text{-H}$ ), 4,61 (dd, 1H,  $\text{C}3'\text{-H}$ ), 5,20 (dd, 1H,  $\text{C}2'\text{-H}$ ), 5,90 (m, 2H,  $\text{C}1'\text{-H}$ ), 7,87 (br s, 1H,  $\text{N}6\text{-H}$ ), 8,19 (s, 1H,  $\text{C}2\text{-H}$ ), 8,34 (s, 1H,  $\text{C}8\text{-H}$ ).

#### 4.2.8. Synteza *N*<sup>6</sup>-(12-aminododecylo)adenozyny 97h

97,5 mg (0,34 mmoli) rybozydu 6-chloropuryny, 200 mg (1 mmola) 1,12-diaminododekanu, 0,14 ml (1 mmoli) trietyloaminy rozpuściłem w 5 ml etanolu i mieszaninę ogrzewałem przez 18 h w temperaturze 60 °C. Mieszaninę oczyściłem na kolumnie chromatograficznej w układzie CHCl<sub>3</sub>:MeOH:NH<sub>3</sub>aq. (5:2:0,3 v/v). Otrzymałem 97,5 mg (wyd. 64 %) pochodną **97h**, R<sub>f</sub>=0,61, temp. top. 168-172 °C.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO, δ (ppm)): 1,21-1,36 (m, 16H, C3''-C10''-H), 1,26 (m, 2H, C2''-H), 1,56 (m, 2H, C11''-H), 2,48-2,53 (t, 2H, C12''-H), 3,31 (s, 2H, C1''-H), 3,54 i 3,64 (2 x dd, 2H, C5'-H), 3,94 (d, 1H, C4'-H), 4,12 (t, 1H, C3'-H), 4,59 (t, 1H, C2'-H), 5,86 i 5,85 (m, 2H, C1'-H), 7,87 (s, 1H, N6-H), 8,18 (s, 1H, C2-H), 8,31 (s, 1H, C8-H).

MS (DHB) *m/z* obliczone dla C<sub>22</sub>H<sub>38</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub> 450,57; znalezione 451,4 (M<sup>+</sup>).

#### 4.3. Synteza koniugatów MPA z pochodnymi adenozyiny

Pochodne MPA z pochodnymi adenozyiny otrzymałem zgodnie z procedurą opisaną w literaturze [2].

##### 4.3.1. Synteza *N*-mykofenoilo-*N*<sup>6</sup>-(2-aminoetylo)adenozyny 98a

64 mg (0,2 mmoli) MPA, 28 mg (0,228 mmoli) DMAP, 70,6 mg (0,228 mmoli) *N*<sup>6</sup>-(2-aminoetylo)adenozyny rozpuściłem w 3,5 ml bezwodnego DMF. Mieszaninę ochłodziłem do temp. 0 °C i dodałem 74,6 mg (0,389 mmoli) EDCI. Reakcję prowadziłem 2 h, następnie 48 h w temperaturze pokojowej. Mieszaninę oczyściłem na kolumnie chromatograficznej w układzie CHCl<sub>3</sub>:MeOH:NH<sub>3</sub>aq (9:1:0,3 v/v). Otrzymałem 60 mg (wyd. 49%) krystalicznego produktu. R<sub>f</sub>=0,09, temp. top. (zwęglenia) 181 °C.

<sup>1</sup>H NMR: (500 MHz, DMSO, δ (ppm)): 1,69 (s, 3H, M3a-H); 2,00 (s, 3H, M5a-H); 2,08 (s, 4H, M4',M5'-H); 3,25 (s, 2H, L2-H); 3,43 (d, 2H, M1'-H); 3,54 (s, 2H, L1-H); 3,49 i 3,54 (2 x s, 2H, A5'-H); 3,64 (s, 3H, M6a-H); 3,94 (d, 1H, A4'-H); 4,12 (d, 1H, A3'-H); 4,58 (s, 1H, A2'-H); 5,09 (s, 1H, M2'-H); 5,14 (s, 2H, M3-H); 5,86 (d, 1H, A1'-H); 5,87 (s, 1H, A6a-H); 7,24 (dd, 1H, A5'-OH); 8,18 (s, 1H, A8-H); 8,33 (s, 1H, A 2-H).

MS (DHB) *m/z* obliczone dla C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub> 612,63; znalezione 613,1 (M<sup>+</sup>).



#### 4.3.2. Synteza *N*-mykofenoilo-*N*<sup>6</sup>-(3-aminopropylo)adenozyny **98b**

64 mg (0,2 mmoli) MPA, 28 mg (0,228 mmoli) DMAP, 70,6 mg (0,228 mmoli) *N*<sup>6</sup>-(2-aminoetylo)adenozyny rozpuściłem w 3,5 ml bezwodnego DMF. Mieszaninę ochłodziłem do temp. 0 °C i dodałem 74,6 mg (0,389 mmoli) EDCI. Reakcję prowadziłem 2 h, następnie 48 h w temperaturze pokojowej. Mieszaninę oczyściłem na kolumnie chromatograficznej w układzie CHCl<sub>3</sub>:MeOH:NH<sub>3</sub>aq (9:1:0,3 v/v). Otrzymałem 22 mg (wyd. 18%) pochodnej **98b**. R<sub>f</sub>=0,11, temp. top. (zwęglenia) 180 °C.

<sup>1</sup>H NMR: (500 MHz, DMSO, δ (ppm)): 1,63 (s, 3H, L2-H); 1,71 (s, 3H, M3a-H); 2,03 (s, 3H, M5a-H) 2,11 (s, 4H, M4,M5-H); 3,01 (d, 2H, L3-H); 3,27 (d, 2H, M1'-H); 3,54 (d, 2H, L1-H); 3,65 (s, 3H, M6a-H); 3,94 (m, 1H, A4'-H); 4,12 (d, 1H, A3'-H); 4,58 (t, 1H, A2'-H); 5,10 (t, 1H, M2'-H); 5,20 (s, 2H, M3-H); 5,86 (d, 2H, A1'-H); 6,04 (s, 1H, N6-H); 6,96 (s, 1H, A1'-H ); 7,10 i 7,18 (dd, 1H, A5'-OH); 8,17 (s, 1H, C8-H); 8,18 (s, 1H, A 2-H); 8,33 (s, 1H, M8-OH).

MS (DHB) *m/z* obliczone dla C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub> 626,66; znalezione 627,2 (M+).

#### 4.3.3. Synteza *N*-mykofenoilo-*N*<sup>6</sup>-(4-aminobutylo)adenozyny **98c**

64 mg (0,2 mmoli) MPA, 28 mg (0,228 mmoli) DMAP, 70,6 mg (0,228 mmoli) *N*<sup>6</sup>-(3-aminoetylo)adenozyny rozpuściłem w 3,5 ml bezwodnego DMF. Mieszaninę ochłodziłem do temp. 0 °C i dodałem 74,6 mg (0,389 mmoli) EDCI. Reakcję prowadziłem 2 h, następnie 48 h w temperaturze pokojowej. Mieszaninę oczyściłem na kolumnie chromatograficznej w układzie CHCl<sub>3</sub>:MeOH:NH<sub>3</sub>aq (9:1:0,3 v/v). Otrzymałem 23 mg (wyd. 19%) produktu **98c**. R<sub>f</sub>=0,12, temp. top. (zwęglenia) 120 °C.

<sup>1</sup>H NMR: (500 MHz, DMSO, δ (ppm)): 1,10 (s, 3H, L3-H); 1,52 (t, 3H, L2-H); 1,70 (s, 3H, M3a-H); 2,05 (s, 3H, M5a-H); 2,07 (s, 2H, M5-H); 2,08 (s, 2H, M4-H); 2,97 (t, 2H, L4-H); 3,27 (d, 2H, M1'-H); 3,53 (d, 2H, L1-H); 3,33 (2 x m, 2H, A5'-H); 3,66 (s, 3H, M6a-H); 3,94 (d, 1H, A4'-H); 4,12 (s, 1H, A3'-H); 4,12 (d, 1H, A3'-OH); 4,35 (d, 1H, A2'-OH); 4,68 (dd, 1H, A2'-H); 5,25 (t, 1H, M2'-H); 5,36 (s, 2H, M3-H); 5,96 (m, 2H, A1'-H); 6,07 (s, 1H, N6-H); 6,93 (s, 1H, A1'-H ); 7,03 (dd, 1H, A5'-OH); 8,18 (s, 1H, C8-H); 8,21 (s, 1H, A 2-H); 8,22 (s, 1H, M8-OH).

MS (DHB) *m/z* obliczone dla C<sub>31</sub>H<sub>40</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub> 640,68; znalezione 641,0 (M+).

#### 4.3.4. Synteza *N*-mykofenoilo-*N*<sup>6</sup>-(5-aminopentylo)adenozyny 98d

64 mg (0,2 mmoli) MPA, 28 mg (0,228 mmoli) DMAP, 70,6 mg (0,228 mmoli) *N*<sup>6</sup>-(4-aminoetylo)adenozyny w 3,5 ml bezwodnego DMF. Mieszaninę ochłodziłem do temp. 0 °C i dodałem 74,6 mg (0,389 mmoli) EDCI. Reakcję prowadziłem 2 h, następnie 48 h w temperaturze pokojowej. Mieszaninę oczyściłem na kolumnie chromatograficznej w układzie CHCl<sub>3</sub>:MeOH:NH<sub>3</sub>aq (9:1:0,3 v/v). Otrzymałem 27 mg (wyd. 21%) produktu. R<sub>f</sub>=0,13, temp. top. (zwęglenia) 12 °C.

<sup>1</sup>HNMR: (500 MHz, aceton, δ (ppm)): 1,68 (s, 3H, M3a-H); 2,10 (s, 3H, M5a-H); 2,08 (s, 4H, M4,M5-H); 3,25 (t, 2H, L2-H); 3,33 (d, 2H, M1'-H); 3,43 (br. s, 2H, L1-H); 3,54 (2 x m, 2H, A5'-H); 3,66 (s, 3H, M6a-H); 3,94 (m, 1H, A4'-H); 4,12 (d, 1H, A3'-H); 4,14 (d, 1H, A3'-OH); 4,32 (d, 1H, A2'-OH); 4,56 (dd, 1H, A2'-H); 5,25 (t, 1H, M2'-H); 5,32 (s, 2H, M3-H); 5,92 (m, 2H, A1'-H); 6,02 (br.s, 1H, N6-H); 6,96 (s, 1H, A1'-H ); 7,09 (dd, 1H, A5'-OH); 8,17 (s, 1H, C8-H); 8,21 (s, 1H, A 2-H); 8,22 (s, 1H, M8-OH).

MS (DHB) *m/z* obliczone dla C<sub>32</sub>H<sub>42</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub> 654,71; znalezione 654,9 (M+)

#### 4.3.5. Synteza *N*-mykofenoilo-*N*<sup>6</sup>-(6-aminoheksylo)adenozyny 98e

64 mg (0,2 mmoli) MPA, 28 mg (0,228 mmoli) DMAP, 70,6 mg (0,228 mmoli) *N*<sup>6</sup>-(6-aminoetylo)adenozyny w 3,5 ml bezwodnego DMF. Mieszaninę ochłodziłem do temp 0°C i dodałem 74,6 mg (0,389 mmoli) EDCI. Reakcję prowadziłem 2 h, następnie 48 h w temperaturze pokojowej. Mieszaninę oczyściłem na kolumnie chromatograficznej w układzie CHCl<sub>3</sub>:MeOH:NH<sub>3</sub>aq (9:1:0,3 v/v). Otrzymałem 23 mg (wyd. 19%) krystalicznego produktu. R<sub>f</sub>=0,16, temp. top. (zwęglenia) 89 °C.

<sup>1</sup>HNMR: (500 MHz, DMSO, δ (ppm)): 1,67 (s, 3H, M3a-H); 2,01 (s, 3H, M5a-H); 2,08 (s, 4H, M4, M5-H); 3,25 (t, 2H, L2-H); 3,32 (d, 2H, M1'-H); 3,53 (br. s, 2H, L1-H); 3,33 (2 x m, 2H, A5'-H); 3,66 (s, 3H, M6a-H); 3,94 (m, 1H, A4'-H); 4,12 (d, 1H, A3'-H); 4,12 (d, 1H, A3'-OH); 4,35 (d, 1H, A2'-OH); 4,68 (dd, 1H, A2'-H); 5,25 (t, 1H, M2'-H); 5,32 (s, 2H, M3-H); 5,92 (m, 2H, A1'-H); 6,04 (s, 1H, N6-H); 6,96 (s, 1H, A1'-H ); 7,07 (dd, 1H, A5'-OH); 8,17 (s, 1H, C8-H); 8,21 (s, 1H, A 2-H); 8,22 (s, 1H, M8-OH).

MS (DHB) *m/z* obliczone dla C<sub>33</sub>H<sub>44</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub> 668,74; znalezione 669,0 (M+).

#### 4.3.6. Synteza *N*-mykofenoilo-*N*<sup>6</sup>-(8-aminooktylo)adenozyny **98f**

64 mg (0,2 mmoli) MPA, 28 mg (0,228 mmoli) DMAP, 70,6 mg (0,228 mmoli) *N*<sup>6</sup>-(8-aminoetylo)adenozyny w 3,5 ml bezwodnego DMF. Mieszaninę ochłodziłem do temp 0 °C i dodałem 74,6 mg (0,389 mmoli) EDCI. Reakcję prowadziłem 2 h, następnie 48 h w temperaturze pokojowej. Po oddestylowaniu rozpuszczelnika mieszaninę oczyściłem na kolumnie chromatograficznej w układzie CHCl<sub>3</sub>:MeOH:NH<sub>3</sub>aq (9:1:0,3 v/v). Otrzymałem 39 mg (wyd. 28 %) produktu. R<sub>f</sub>=0,27, temp. top (zwęglenia) 110 °C.

<sup>1</sup>HNMR: (500 MHz, DMSO, δ (ppm)): 1,21-1,28 (s, 12H, L3-L9-H); 1,68 (m, 2H, L2-H); 1,81 (s, 3H, M3a'-H); 2,18 (s, 3H, M5a-H); 2,21 (s, 2H, M5'-H); 2,23 (s, 2H, M4'-H); 3,15 (t, 2H, L10-H); 3,38 (d, 2H, M1'-H); 3,64 (br. s, 2H, L1-H); 3,68 i 3,75 (2 x m, 2H, A5'-H); 3,79 (s, 3H, M6a-H); 4,18 (m, 1H, A4'-H); 4,37 (dd, 1H, A3'-H); 4,39 (d, 1H, A3'-OH); 4,75 (d, 1H, A2'-OH); 4,95 (dd, 1H, A2'-H); 5,25 (t, 1H, M2'-H); 5,32 (s, 2H, M3-H); 5,92 (m, 2H, A1'-H); 6,02 (s, 1H, A6a-H); 6,96 (s, 1H, M6a'-H); 7,07 (dd, 1H, A5'-OH); 8,17 (s, 1H, C8-H); 8,21 (s, 1H, A 2-H); 8,22 (s, 1H, M8-OH).

<sup>13</sup>C NMR: (500 MHz, DMSO, δ (ppm)): 172, 09; 170,85; 163,24; 155,32; 153,51; 153,08; 146,43; 140,32; 134,73; 123,13; 116,54; 107,61; 88,63; 86,61; 74,12; 71,38; 69, 28; 62,39; 61,29; 40,68; 40,51; 40,36; 40,18; 40,01; 39,85; 39,68; 39,03; 35,78; 34,91; 29,75; 29,48; 29,41; 27,05; 23,09; 16,73; 11,72.

MS (DHB) *m/z* obliczone dla C<sub>35</sub>H<sub>48</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub> 696,79; znalezione 697,1 (M+).

#### 4.3.7. Synteza *N*-mykofenoilo-*N*<sup>6</sup>-(10-aminodecylo)adenozyny **98g**

64 mg (0,2 mmoli) MPA, 28 mg (0,228 mmoli) DMAP, 70,6 mg (0,228 mmoli) *N*<sup>6</sup>-(10-aminoetylo)adenozyny w 3,5 ml bezwodnego DMF. Mieszaninę ochłodziłem do temp 0 °C i dodałem 74,6 mg (0,389 mmoli) EDCI. Reakcję prowadziłem 2 h, następnie 48 h w temperaturze pokojowej. Mieszaninę oczyściłem na kolumnie chromatograficznej w układzie CHCl<sub>3</sub>:MeOH:NH<sub>3</sub>aq (9:1:0,3 v/v). Otrzymałem 32 mg (wyd. 22 %) pochodnej **98g**. R<sub>f</sub>=0,25, temp. top. 145 °C.

<sup>1</sup>HNMR: (500 MHz, aceton, δ (ppm)): 1,22-1,28 (s, 12H, L3-L9-H); 1,69 (m, 2H, L2-H); 1,81 (s, 3H, M3a'-H); 2,18 (s, 3H, M5a-H); 2,21 (s, 2H, M5'-H); 2,23 (s, 2H, M4'-H); 3,15 (t, 2H, L10-H); 3,39 (d, 2H, M1'-H); 3,64 (br. s, 2H, L1-H); 3,68 i 3,75 (2 x m, 2H, A5'-H); 3,79 (s, 3H, M6a-H); 4,18 (m, 1H, A4'-H); 4,37 (dd, 1H, A3'-H); 4,39 (d, 1H, A3'-OH); 4,75

(d, 1H, A2'-OH); 4,95 (dd, 1H, A2'-H); 5,25 (t, 1H, M2'-H); 5,32 (s, 2H, M3-H); 5,92 (m, 2H, A1'-H); 6,02 (s, 1H, A6a-H); 6,96 (s, 1H, M6a'-H); 7,07 (dd, 1H, A5'-OH); 8,17 (s, 1H, C8-H); 8,21 (s, 1H, A 2-H); 8,22 (s, 1H, M8-OH).

MS (DHB)  $m/z$  obliczone dla  $C_{37}H_{52}N_6O_9$  724,84; znalezione 725,3 (M+).

#### 4.3.8. Synteza *N*-mykofenoilo-*N*<sup>6</sup>-(12-aminododecylo)adenozyny **98h**

64 mg (0,2 mmoli) MPA, 28 mg (0,228 mmoli) DMAP, 70,6 mg (0,228 mmoli) *N*<sup>6</sup>-(12-aminoetylo)adenozyny w 3,5 ml bezwodnego DMF. Mieszaninę ochłodziłem do temp 0 °C i dodałem 74,6 mg (0,389 mmoli) EDCI. Reakcję prowadziłem 2 h, następnie 48 h w temperaturze pokojowej. Mieszaninę oczyściłem na kolumnie chromatograficznej w układzie  $CHCl_3:MeOH:NH_3aq$  (9:1:0,3 v/v). Otrzymałem 31 mg (wyd. 20 %) produktu **98h**.  $R_f=0,35$ , temp. top. 160 °C.

<sup>1</sup>HNMR: (500 MHz, DMSO,  $\delta$  (ppm)): 1,24-1,28 (s, 12H, L3-L9-H); 1,67 (m, 2H, L2-H); 1,82 (s, 3H, M3a'-H); 2,18 (s, 3H, M5a-H); 2,21 (s, 2H, M5'-H); 2,23 (s, 2H, M4'-H); 3,15 (t, 2H, L10-H); 3,38 (d, 2H, M1'-H); 3,64 (br. s, 2H, L1-H); 3,68 i 3,75 (2 x m, 2H, A5'-H); 3,79 (s, 3H, M6a-H); 4,18 (m, 1H, A4'-H); 4,37 (dd, 1H, A3'-H); 4,39 (d, 1H, A3'-OH); 4,75 (d, 1H, A2'-OH); 4,95 (dd, 1H, A2'-H); 5,25 (t, 1H, M2'-H); 5,32 (s, 2H, M3-H); 5,92 (m, 2H, A1'-H); 6,02 (br.s bs?, 1H, A6a-H); 6,97 (s, 1H, M6a'-H); 7,07 (dd, 1H, A5'-OH); 8,17 (s, 1H, C8-H); 8,21 (s, 1H, A 2-H); 8,22 (s, 1H, M8-OH).

MS (DHB)  $m/z$  obliczone dla  $C_{39}H_{56}N_6O_9$  752,90; znalezione 753,4 (M+).

#### 4.4. Synteza chronionych aminokwasowych pochodnych adenozyiny

Chronione aminokwasowe pochodne adenozyiny otrzymałem zgodnie z procedurą opisaną w literaturze [90, 91].

##### 4.4.1. Synteza estru 2',3'-*O*-izopropylidenoadenozylu-5'-wego kwasu *N*-(fluorenylometyloksykarbonylo)-3-aminopropionowego **104a**

42,3 mg (1,359 mmola) kwasu *N*-(fluorenylometoksykarbonylo)- $\beta$ -alaniny, 42 mg (1,359 mmola) 2',3'-*O*-izopropylidenoadenozyny (1,359 mmola), 18 mg DMAP (kat.) rozpuściłem w 9 ml bezwodnego chloroformu. Następnie dodałem 2x33  $\mu$ l chlorku 2,4,6-trichlorobenzoiłu (2,04 mmola), 78  $\mu$ l trietyloaminy (5,58 mmola) i mieszałem na mieszadle magnetycznym

przez noc w temp. pok. Rozpuszczalnik oddestylowałem pod zmniejszonym ciśnieniem, surowy produkt oczyściłem na TLC w układzie B. Otrzymałem 71,8 mg (wyd. 85%) produktu **104a**,  $R_f=0,5$ .

MS (DHB)  $m/z$  obliczone dla  $C_{31}H_{32}N_6O_7$  600,6; znalezione 601,3 (M+H)<sup>+</sup>.

#### **4.4.2. Synteza estru 2',3'-*O*-izopropylidenoadenozylu-5'-wego kwasu *N*-(fluorenylometyloksykarbonylo)-6-aminoheksanowego 104b**

48 mg (1,359 mmola) kwasu *N*-(fluorenylometoksykarbonylo)-6-aminoheksanowego, 42 mg (1,359 mmola) 2',3'-*O*-izopropylidenoadenozyny (1,359 mmola), 18 mg DMAP (kat.), rozpuściłem w 9 ml bezwodnego chloroformu. Następnie dodałem 2 x 33  $\mu$ l chlorku 2,4,6-trichlorobenzoilu (2,04 mmola), 78  $\mu$ l trietyloaminy (5,58 mmola) i mieszałem przez noc w temp pokojowej. Rozpuszczalnik oddestylowałem pod zmniejszonym ciśnieniem, surowy produkt oczyściłem na płytkach TLC w układzie B. Otrzymałem 75 mg (wyd. 83 %) produktu,  $R_f=0,49$ .

MS (DHB)  $m/z$  obliczone dla  $C_{34}H_{38}N_6O_7$  642,70; znalezione 643,23 (M+H)<sup>+</sup>.

#### **4.4.3. Synteza estru 2',3'-*O*-izopropylidenoadenozylu-5'-wego kwasu *N*-(fluorenylometyloksykarbonylo)-7-aminoheptanowego 104c**

51 mg (1,359 mmola) kwasu *N*-(fluorenylometoksykarbonylo)-7-aminoheptanowego, 42 mg (1,359 mmola) 2',3'-*O*-izopropylidenoadenozyny (1,359 mmola), 18 mg DMAP (kat.), rozpuściłem w 9 ml bezwodnego chloroformu. Następnie dodałem 2 x 33  $\mu$ l chlorku 2,4,6-trichlorobenzoilu (2,04mmola), 78  $\mu$ l trietyloaminy (5,58 mmola) i mieszałem przez noc w temp. pok. Rozpuszczalnik oddestylowałem pod zmniejszonym ciśnieniem, surowy produkt oczyściłem na płytkach TLC w układzie B. Otrzymałem 84,8 mg (wyd. 91 %) produktu.  $R_f=0,56$

MS (DHB)  $m/z$  obliczone dla  $C_{35}H_{40}N_6O_7$  656,73; znalezione 657,24 (M+).

#### 4.4.4. Synteza estru 2',3'-*O*-izopropylidenoadenozylu-5'-wego kwasu *N*-(fluorenylometyloksykarbonylo)-8-aminooktanowego 104d

51,6 mg (1,359 mmola) kwasu *N*-(fluorenylometoksykarbonylo)-8-aminooktanowego, 42 mg (1,359 mmola) 2',3'-*O*-izopropylidenoadenozyny (1,359 mmola), 18 mg DMAP (kat.), rozpuściłem w 9 ml bezwodnego chloroformu. Następnie dodałem 2 x 33 μl chlorku 2,4,6-trichlorobenzoiłu (2,04 mmola), 78 μl trietyloaminy (5,58 mmola) i mieszałem przez noc w temp. pok. Rozpuszczalnik oddestylowałem pod zmniejszonym ciśnieniem, surowy produkt oczyściłem na płytkach TLC w układzie B. Otrzymałem 72 mg (wyd. 77 %) produktu.  $R_f=0,52$

MS (DHB)  $m/z$  obliczone dla  $C_{36}H_{42}N_6O_7$  670,8; znalezione 671,4 (M+H)<sup>+</sup>.

#### 4.4.5. Synteza estru 2',3'-*O*-izopropylidenoadenozylu-5'-wego kwasu *N*-(fluorenylometyloksykarbonylo)-11-aminoundekanowego 104e

57,3 mg (1,359 mmola) kwasu *N*-(fluorenylometoksykarbonylo)-11-aminoundekanowego, 42 mg (1,359 mmola) 2',3'-*O*-izopropylidenoadenozyny (1,359 mmola), 18 mg DMAP (kat.), rozpuściłem w 9 ml bezwodnego chloroformu. Następnie dodałem 2 x 33 μl chlorku 2,4,6-trichlorobenzoiłu (2,04 mmola), 78 μl trietyloaminy (5,58 mmola) i mieszałem przez noc w temp. pok. Rozpuszczalnik oddestylowałem pod zmniejszonym ciśnieniem, surowy produkt oczyściłem na TLC w układzie B. Otrzymałem 96 mg (wyd. 96 %) produktu,  $R_f=0,65$ .

MS (DHB)  $m/z$  obliczone dla  $C_{39}H_{48}N_6O_7$  712,8; znalezione 713,4 (M+H)<sup>+</sup>.

#### 4.5. Deprotekcja Fmoc chronionych aminokwasowych pochodnych adenozyliny

Deprotekcja aminokwasowych pochodnych adenozyliny otrzymałem zgodnie z procedurą opisaną w literaturze [92].

Odpowiednią chronioną aminokwasową pochodną **104a-e** (1 mmol) rozpuściłem w mieszaninie chlorku metylenu z dietyloaminą w proporcji (1:1 v/v). Reakcję mieszałem w temp pokojowej przez noc. Po całkowitym przereagowaniu i sprawdzeniu na TLC w układzie D  $CHCl_3:CH_3OH$ : (10:1 v/v), rozpuszczalniki oddestylowałem pod zmniejszonym ciśnieniem a produkty **105a-e** oczyściłem na TLC w układzie D  $CHCl_3:CH_3OH$  (10:1 v/v).

#### 4.5.1. Synteza estru 2',3'-*O*-izopropylidenoadenozylu-5'-wego kwasu 3-amino- propionowego 105a

Otrzymałem 24 mg (wyd. 53 %).

MS (DHB) *m/z* obliczone dla C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub> 378,4; znalezione 379,2 (M+H)<sup>+</sup>.

#### 4.5.2. Synteza estru 2',3'-*O*-izopropylidenoadenozylu-5'-wego kwasu 6-amino- heksanowego 105b

Otrzymałem 30 mg (wyd. 61 %).

MS (DHB) *m/z* obliczone dla C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub> 420,5; znalezione 421,2 (M+H)<sup>+</sup>.

#### 4.5.3. Synteza estru 2',3'-*O*-izopropylidenoadenozylu-5'-wego kwasu 7-amino- heptanowego 105c

Otrzymałem 26 mg (wyd. 46 %).

MS (DHB) *m/z* obliczone dla C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub> 434,5; znalezione 435,2 (M+H)<sup>+</sup>.

#### 4.5.4. Synteza estru 2',3'-*O*-izopropylidenoadenozylu-5'-wego kwasu 8-amino- oktanowego 105d

Otrzymałem 22 mg (wyd. 50 %).

MS (DHB) *m/z* obliczone dla C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub> 448,5; znalezione 449,3 (M+H)<sup>+</sup>.

#### 4.5.5. Synteza estru 2',3'-*O*-izopropylidenoadenozylu-5'-wego kwasu 11-amino- undekanowego 105e

Otrzymałem 37 mg (wyd. 56 %).

MS (DHB) *m/z* obliczone dla C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub> 490,6; znalezione 491,4 (M+H)<sup>+</sup>.

#### 4.6. Synteza koniugatów MPA z aminokwasowymi pochodnymi adenozyiny

W celu syntezy koniugatów MPA z aminokwasowymi pochodnymi adenozyiny wykorzystałem aminokwasowe pochodne **105a-e**.

W reakcji stosowałem MPA **40**, odpowiednią aminokwasową pochodną adenozyiny **105a-e**, DMAP, HOBt w bezwodnym DMF. Mieszaninę chodziłem do 0 °C, po czym dodawałem EDCI oraz HOBt. Całość mieszałem przez 4 h w 0 °C, a następnie w temp. pok.

Przez 48 h. Postęp reakcji kontrolowałem za pomocą TLC w układzie chloroform:metanol (10:1 v/v). Po zakończeniu reakcji i oddestylowaniu DMF pozostałość oczyszczałem na płytkach TLC w układzie A chloroform:metanol (25:1 v/v).

#### 4.6.1. Synteza estru 2',3'-*O*-izopropylidenoadenozylu-5'-wego kwasu *N*-mykofenoilo-3-aminopropionowego **99a**

50,3 mg (0,133 mmola) związku **105a**, 42 mg (0,133 mmola) MPA, 0,017ml (0,123 mmola) TEA rozpuściłem w 7,5 ml bezwodnego DMF. Reakcję ochłodziłem do temp. 0 °C i dodałem 28 mg (0,145 mmola) EDCI i 21 mg (0,145 mmola) HOBt. Otrzymałem 56,3 mg (wyd. 61 %) produktu **99a**,  $R_f=0,47$ .

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO):  $\delta$  (ppm) 1,53 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,71 (s, 3H, CH<sub>3MPA</sub>), 2,06 (s, 3H, CH<sub>3MPA</sub>), 2,07-2,10 (m, 4H, CH<sub>2MPA</sub>), 2,16-2,21 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,93 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,27 (d,  $J=6.8\text{Hz}$ , 2H, CH<sub>2MPA</sub>), 3,67 (s, 3H, CH<sub>3MPA</sub>), 4,14-4,15 (m, 1H, CH), 4,20-4,21 (m, 1H, CH), 4,38 (m, 1H, CH), 5,02-5,04 (m, 1H, CH), 5,09 (t,  $J=6.8\text{Hz}$ , 1H, CH<sub>MPA</sub>), 5,23 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 5,44-5,46 (m, 1H, CH), 6,20 (d,  $J=1,9\text{Hz}$ , 1H, CH), 7,66 (bs, 1H, NH), 8,17 (s, 2H, NH<sub>2ade</sub>), 8,31 (s, 1H, CH<sub>ade</sub>), 8,40 (s, 1H, CH<sub>ade</sub>), 9,36 (bs, 1H).

MS (DHB)  $m/z$  obliczone dla C<sub>33</sub>H<sub>40</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub> 680,70; znalezione 681,28 (M<sup>+</sup>).

#### 4.6.2. Synteza estru 2',3'-*O*-izopropylidenoadenozylu-5'-wego kwasu *N*-mykofenoilo-6-aminoheksanowego **99b**

55,8 mg (0,133 mmola) związku **105b**, 42 mg (0,133 mmola) MPA **40**, 0,017 ml (0,123 mmola) TEA rozpuściłem w 7,5 ml bezwodnego DMF. Reakcję ochłodziłem do temp. 0 °C i dodałem 28 mg (0,145 mmola) EDCI i 21 mg (0,145 mmola) HOBt. Otrzymałem 71,4 mg (wyd. 73 %) żądanego produktu **99b**,  $R_f=0,6$ .

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO):  $\delta$  (ppm) 1,14-1,16 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,23-1,25 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,32 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,38-1,41 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,53 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,71 (s, 3H, CH<sub>3MPA</sub>), 2,06 (s, 3H, CH<sub>3MPA</sub>), 2,07-2,10 (m, 4H, CH<sub>2MPA</sub>), 2,15-2,21 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,92 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,27 (d,  $J=6.8\text{Hz}$ , 2H, CH<sub>2MPA</sub>), 3,67 (s, 3H, CH<sub>3MPA</sub>), 4,14-4,15 (m, 1H, CH), 4,20-4,21 (m, 1H, CH), 4,38 (m, 1H, CH), 5,02-5,04 (m, 1H, CH), 5,09 (t,  $J=6.8\text{Hz}$ , 1H, CH<sub>MPA</sub>), 5,23 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 5,44-5,46 (m, 1H, CH), 6,20 (d,  $J=1,9\text{Hz}$ , 1H, CH), 7,68 (bs, 1H, NH), 8,28 (s, 2H, NH<sub>2ade</sub>), 8,31 (s, 1H, CH<sub>ade</sub>), 8,40 (s, 1H, CH<sub>ade</sub>), 9,38 (bs, 1H).



MS (DHB)  $m/z$  obliczone dla  $C_{36}H_{46}N_6O_{10}$  722,78; znalezione 723,33 ( $M^+$ ).

#### 4.6.3. Synteza estru 2',3'-*O*-izopropylidenoadenozylu-5'-wego kwasu *N*-mykofenoilo-7-aminoheptanowego **99c**

58 mg (0,133 mmola) związku **105c**, 42 mg (0,133 mmola) MPA **40**, 0,017 ml (0,123 mmola) TEA rozpuściłem w 7,5 ml bezwodnego DMF. Mieszaninę reakcyjną ochłodziłem do temp. 0 °C i dodałem 28 mg (0,145 mmola) EDCI i 21 mg (0,145 mmola) HOBt. Otrzymałem 56 mg (wyd. 56 %) produktu **99c**,  $R_f=0,65$ .

$^1H$  NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta$  (ppm) 1,14-1,16 (m, 4H,  $CH_2$ ), 1,25-1,28 (m, 2H,  $CH_2$ ), 1,32 (s, 3H,  $CH_3$ ), 1,39-1,40 (m, 2H,  $CH_2$ ), 1,53 (s, 3H,  $CH_3$ ), 1,71 (s, 3H,  $CH_{3MPA}$ ), 2,06 (s, 3H,  $CH_{3MPA}$ ), 2,07-2,10 (m, 4H,  $CH_{2MPA}$ ), 2,18-2,20 (m, 2H,  $CH_2$ ), 2,92-2,93 (m, 2H,  $CH_2$ ), 3,27 (d,  $J=6.8Hz$ , 2H,  $CH_{2MPA}$ ), 3,68 (s, 3H,  $CH_{3MPA}$ ); 4,13-4,14 (m, 1H, CH), 4,20-4,21 (m, 1H, CH), 4,38 (m, 1H, CH), 5,02-5,04 (m, 1H, CH), 5,09 (t,  $J=6.8Hz$ , 1H,  $CH_{MPA}$ ), 5,23 (s, 2H,  $CH_2$ ), 5,46-5,48 (m, 1H, CH), 6,18 (d,  $J=1.8Hz$ , 1H, CH), 7,42 (s, 2H,  $NH_{2ade}$ ), 7,67 (bs, 1H, NH), 8,17 (s, 1H,  $CH_{ade}$ ), 8,30 (s, 1H,  $CH_{ade}$ ), 9,35 (bs, 1H).

MS (DHB)  $m/z$  obliczone dla  $C_{37}H_{48}N_6O_{10}$  736,81; znalezione 737,35 ( $M^+$ ).

#### 4.6.4. Synteza estru 2',3'-*O*-izopropylidenoadenozylu-5'-wego kwasu *N*-mykofenoilo-8-aminooktanowego **99d**

59,6 mg (0,133 mmola) związku **105d**, 42 mg (0,133 mmola) MPA, 0,017 ml (0,123 mmola) TEA rozpuściłem w 7,5 ml bezwodnego DMF. Mieszaninę reakcyjną ochłodziłem do 0 °C i dodałem 28 mg (0,145 mmola) EDCI oraz (0,145 mmola) HOBt. Otrzymałem 62 mg (wyd. 61 %) produktu **99d**,  $R_f=0,68$ .

$^1H$  NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta$  (ppm) 1,15-1,17 (m, 6H,  $CH_2$ ), 1,26-1,29 (m, 2H,  $CH_2$ ), 1,32 (s, 3H,  $CH_3$ ), 1,40-1,41 (m, 2H,  $CH_2$ ), 1,55 (s, 3H,  $CH_3$ ), 1,72 (s, 3H,  $CH_{3MPA}$ ), 2,07 (s, 3H,  $CH_{3MPA}$ ), 2,08-2,10 (m, 4H,  $CH_{2MPA}$ ), 2,18-2,21 (m, 2H,  $CH_2$ ), 2,92-2,94 (m, 2H,  $CH_2$ ), 3,27 (d,  $J=6.8Hz$ , 2H,  $CH_{2MPA}$ ), 3,68 (s, 3H,  $CH_{3MPA}$ ), 4,13-4,14 (m, 1H, CH), 4,20-4,21 (m, 1H, CH), 4,38-4,39 (m, 1H, CH), 5,01-5,03 (m, 1H, CH), 5,09 (t,  $J=6.8Hz$ , 1H,  $CH_{MPA}$ ), 5,23 (s, 2H,  $CH_2$ ), 5,46-5,48 (m, 1H, CH), 6,18 (d,  $J=1.8Hz$ , 1H, CH), 7,67 (bs, 1H, NH), 7,90 (bs, 2H,  $NH_{2ade}$ ), 8,23 (s, 1H,  $CH_{ade}$ ), 8,39 (s, 1H,  $CH_{ade}$ ), 9,38 (bs, 1H).

MS (DHB)  $m/z$  obliczone dla  $C_{38}H_{50}N_6O_{10}$  750,84; znalezione 751,37 ( $M^+$ ).

#### 4.6.5. Synteza estru 2',3'-*O*-izopropylidenoadenozyl-5'-wego kwasu *N*-mykofenoilo-11-aminoundekanowego **99e**

65,2 mg (0,133 mmola) związku **105e**, 42 mg (0,133 mmola) MPA, 0,017 ml (0,123 mmola) TEA rozpuściłem w 7,5 ml bezwodnego DMF. Mieszaninę reakcyjną ochłodziłem do temp. 0 °C i dodałem 28 mg (0,145 mmola) EDCI i 21 mg (0,145 mmola) HOBt. Otrzymałem 74 mg (wyd. 69 %) produktu **99e**,  $R_f=0,7$ .

$^1H$  NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta$  (ppm) 1,18 (m, 12H,  $CH_2$ ), 1,29 (m, 2H,  $CH_2$ ), 1,32 (s, 3H,  $CH_3$ ), 1,41 (m, 2H,  $CH_2$ ), 1,53 (s, 3H,  $CH_3$ ), 1,72 (s, 3H,  $CH_{3MPA}$ ), 2,07 (s, 3H,  $CH_{3MPA}$ ), 2,08-2,10 (m, 4H,  $CH_{2MPA}$ ), 2,19-2,20 (m, 2H,  $CH_2$ ), 2,92-2,94 (m, 2H,  $CH_2$ ), 3,27 (d,  $J=6.8Hz$ , 2H,  $CH_{2MPA}$ ), 3,68 (s, 3H,  $CH_{3MPA}$ ), 4,13-4,14 (m, 1H, CH), 4,21-4,22 (m, 1H, CH), 4,38-4,39 (m, 1H, CH), 5,02-5,04 (m, 1H, CH), 5,09 (t,  $J=6.8Hz$ , 1H,  $CH_{MPA}$ ), 5,23 (s, 2H,  $CH_2$ ), 5,46-5,48 (m, 1H, CH), 6,18 (d,  $J=2.4Hz$ , 1H, CH), 7,35 (s, 2H,  $NH_{2ade}$ ), 7,67 (bs, 1H, NH), 8,28 (s, 1H,  $CH_{ade}$ ), 8,31 (s, 1H,  $CH_{ade}$ ), 9,35 (bs, 1H).

MS (DHB)  $m/z$  obliczone dla  $C_{38}H_{50}N_6O_{10}$  792,92; znalezione 793,41 ( $M^+$ ).

Związek **69a** otrzymałem zgodnie z opisaną procedurą [85].

### 4.7. Deprotekcja koniugatów MPA z aminokwasowymi pochodnymi adenozyiny

*Ogólna procedura.* Odpowiedni koniugat MPA **105a-e** rozpuściłem w metanolu (4 ml), następnie dodałem TFA (4 ml) i pozostawiłem mieszaninę na noc. Po przereagowaniu substratów, rozpuszczalnik oddestylowałem pod zmniejszonym ciśnieniem, a surowy produkt oczyściłem na TLC w układzie A lub B  $CHCl_3:CH_3OH$  (20-25:1 v/v). Dodatek 25 %  $NH_3$  aq 0.1 v/v ułatwiał separację i otrzymanie produktów **100a-e**.

#### 4.7.1. Ester adenozyyl-5'-owy kwasu *N*-mykofenoilo-3-aminopropionowego **100a**

Otrzymałem 32,5 mg (wyd. 61 %);  $R_f=0,39$ ; temp. top. 56,6-57,5 °C.

$^1H$  NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta$  (ppm) 1,71 (s, 3H,  $CH_{3MPA}$ ), 2,07 (m, 7H,  $CH_{3MPA}$ ,  $2 \times CH_{2MPA}$ ), 2,21 (m, 2H,  $CH_2$ ), 2,90 (m, 4H,  $CH_2$ ,  $CH_{2MPA}$ ), 3,68 (s, 3H,  $CH_{3MPA}$ ); 4,08 (m,

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO): δ (ppm) 1,19-4,24 (m, 1H, CH), 4,31 (m, 1H, CH), 4,64 (m, 1H, CH), 5,10 (m, 1H, CH<sub>MPA</sub>), 5,24 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 5,40-5,60 (m, 1H, CH), 5,91 (m, 1H, CH), 7,71-7,82 (m, 1H, NH), 8,24 (s, 1H, CH<sub>ade</sub>), 8,40 (s, 1H, CH<sub>ade</sub>), 8,48 (s, 2H, NH<sub>2ade</sub>), 9,35 (bs, 1H).

MS (DHB) *m/z* obliczone dla C<sub>30</sub>H<sub>36</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub> 640,6; znalezione 641,3 (M+H)<sup>+</sup>.

#### 4.7.2. Ester adenozyli-5'-owy kwasu *N*-mykofenoilo-6-aminoheksanowego 100b

Otrzymałem 49 mg (wyd. 73 %); R<sub>f</sub>=0,44; temp. top. 76,8-77,8 °C.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO): δ (ppm) 1,16-1,28 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 1,41-1,42 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,71 (s, 3H, CH<sub>3MPA</sub>), 2,07 (m, 7H, CH<sub>3MPA</sub>, 2xCH<sub>2MPA</sub>), 2,21 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,90 (m, 4H, CH<sub>2</sub>, CH<sub>2MPA</sub>), 3,68 (s, 3H, CH<sub>3MPA</sub>), 4,08 (m, 1H, CH), 4,19-4,24 (m, 1H, CH), 4,31 (m, 1H, CH), 4,64 (m, 1H, CH), 5,10 (m, 1H, CH<sub>MPA</sub>), 5,24 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 5,40-5,60 (m, 1H, CH), 5,91 (m, 1H, CH), 7,71-7,82 (m, 1H, NH), 8,24 (s, 1H, CH<sub>ade</sub>), 8,40 (s, 1H, CH<sub>ade</sub>), 8,51 (s, 2H, NH<sub>2ade</sub>), 9,36 (bs, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, DMSO): δ (ppm) 11.5, 16.5, 24.5, 26.3, 29.2, 33.7, 34.7, 35.5, 38.6, 41.8, 60.8, 64.2, 69.06, 70.7, 73.4, 82.0, 88.3, 107.4, 116.4, 119.5, 122.8, 122.9, 134.5, 140.9, 146.2, 146.5, 149.5, 151.1, 153.2, 163.0, 170.6, 171.9, 173.1.

MS (DHB) *m/z* obliczone dla C<sub>33</sub>H<sub>42</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub> 682,7; znalezione 683,3 (M+H)<sup>+</sup>.

#### 4.7.3. Ester adenozyli-5'-owy kwasu *N*-mykofenoilo-7-aminoheptanowego 100c

Otrzymałem 30 mg (wyd. 56 %); R<sub>f</sub>=0,46; temp. top. 66,1-67,2 °C.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO): δ (ppm) 1,15-1,28 (m, 6H, CH<sub>2</sub>), 1,42-1,46 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,71 (s, 3H, CH<sub>3MPA</sub>), 2,07-2,09 (m, 7H, CH<sub>3MPA</sub>, 2xCH<sub>2MPA</sub>), 2,26 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,91 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, CH<sub>2MPA</sub>), 3,28 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, CH<sub>2MPA</sub>), 3,68 (s, 3H, CH<sub>3MPA</sub>); 4,08 (m, 1H, CH), 4,13-4,24 (m, 1H, CH), 4,31-4,32 (m, 1H, CH), 4,64 (m, 1H, CH), 5,09 (m, 1H, CH<sub>MPA</sub>), 5,23 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 5,40-5,58 (m, 1H, CH), 5,91 (m, 1H, CH), 7,70-7,71 (m, 3H, NH, NH<sub>2ade</sub>), 8,21 (s, 1H, CH<sub>ade</sub>), 8,37 (s, 1H, CH<sub>ade</sub>), 9,37 (bs, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, DMSO): δ (ppm) 11.5, 16.5, 24.8, 26.5, 28.5, 29.3, 33.7, 34.7, 35.6, 38.7, 41.8, 60.7, 64.1, 69.07, 70.7, 73.4, 82.0, 88.3, 107.4, 116.6, 119.5, 122.8, 122.9, 134.5, 140.7, 146.2, 149.6, 151.7, 153.2, 155.5, 163.0, 170.6, 171.9, 173.2.

MS (DHB) *m/z* obliczone dla C<sub>34</sub>H<sub>44</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub> 696,8; znalezione 697,3 (M+H)<sup>+</sup>.

#### 4.7.4. Ester adenozyli-5'-owy kwasu *N*-mykofenoilo-8-aminooktanowego 100d

Otrzymałem 35,8 mg (wyd. 61 %);  $R_f=0,47$ ; temp. top. 69,8-70,5 °C.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta$  (ppm) 1,18 (m, 6H,  $\text{CH}_2$ ), 1,45 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1,71 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{MPA}$ ), 1,98-2,09 (m, 7H,  $\text{CH}_3\text{MPA}$ ,  $2\times\text{CH}_2\text{MPA}$ ), 2,26 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,92 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{MPA}$ ), 3,16-3,35 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{MPA}$ ), 3,67 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{MPA}$ ), 4,06 (m, 1H, CH), 4,15-4,25 (m, 1H, CH), 4,31 (m, 1H, CH), 4,66 (m, 1H, CH), 5,10 (m, 1H,  $\text{CH}_{\text{MPA}}$ ), 5,23 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 5,39-5,59 (m, 1H, CH), 5,90 (m, 1H, CH), 7,31 (s, 2H,  $\text{NH}_{2\text{ade}}$ ), 7,69-7,94 (m, 1H, NH), 8,14 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{ade}}$ ), 8,30 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{ade}}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta$  (ppm) 11.5, 16.5, 24.8, 26.7, 28.8, 29.5, 33.7, 34.7, 35.6, 36.2, 38.8, 41.8, 61.0, 64.1, 69.07, 70.7, 73.3, 81.9, 88.2, 107.4, 116.6, 119.6, 122.9, 134.4, 139.7, 140.2, 146.2, 149.8, 151.6, 153.1, 153.8, 156.5, 170.6, 171.9, 173.2.

MS (DHB)  $m/z$  obliczone dla  $\text{C}_{35}\text{H}_{46}\text{N}_6\text{O}_{10}$  710,8; znalezione 711,4 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

#### 4.7.5. Ester adenozyli-5'-owy kwasu *N*-mykofenoilo-11-aminoundekanoowego 100e

Otrzymałem 49,4 mg (wyd. 69 %);  $R_f=0,49$ ; temp. top. 67,3-68,8 °C.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta$  (ppm) 1,17-1,20 (m, 12H,  $\text{CH}_2$ ), 1,43 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1,71 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{MPA}$ ), 1,92-2,09 (m, 7H,  $\text{CH}_3\text{MPA}$ ,  $2\times\text{CH}_2\text{MPA}$ ), 2,27 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,94 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{MPA}$ ), 3,14-3,31 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{MPA}$ ), 3,67 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{MPA}$ ), 4,07 (m, 1H, CH), 4,17-4,24 (m, 1H, CH), 4,32 (m, 1H, CH), 4,68 (m, 1H, CH), 5,10 (m, 1H,  $\text{CH}_{\text{MPA}}$ ), 5,23 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 5,39-5,58 (m, 1H, CH), 5,90 (m, 1H, CH), 7,53 (s, 2H,  $\text{NH}_{2\text{ade}}$ ), 7,72 (m, 1H, NH), 8,12 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{ade}}$ ), 8,32 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{ade}}$ ).

MS (DHB)  $m/z$  obliczone dla  $\text{C}_{39}\text{H}_{54}\text{N}_6\text{O}_{10}$  766,9; znalezione 767,7 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

Związek **69** otrzymałem zgodnie z opisaną procedurą [85].

#### 4.8. Materiały stosowane w badaniach biologicznych

Nazwa skrócona	Charakterystyka	Firma
RPMI-1640	Pożywka z L-glutaminą i 2,0 g/l $\text{NaHCO}_3$ (poj. 500 ml)	IMMUNIQ
FBS Fetal Bovine Serum, qualified, heat inactivated, E.U.-approved, South America Origin	Płodowa surowica wołowa (poj. 500 ml)	Life Technologies
PBS pH 7,4 W/O CAMG PLASTIC	Bufor fosforanowy bez endotoksyny (poj. 500 ml)	Life Technologies

P/S	Penicillin-Streptomycin Sterile-Filtered (poj. 100 ml)	Sigma-Aldrich
MTT	Barwnik do testów kolometrycznych Thiazolyl blue tetrazolium bromide - 98%	Sigma-Aldrich
Thymidyne, [Methyl- <sup>3</sup> H]	Odczynnik do testów aktywności proliferacyjnej 5 mCi (185 MBq) 2,0 Ci/mmol (0,074 TBq/mmol) 5ml Aqueous soln. Steri-packaged	PerkinElmer
Ficoll Paque Plus	Fikol do izolacji limfocytów 1,078 g/ml (poj.100 ml)	Sigma-Aldrich
CYTOSCINT <sup>tm</sup> -ES LIQUID SCINTILLATION COCKTAIL	Płyn scyntylicyjny (poj. 1 gal)	ABO
Końcówki do pipet	Pojemności: 0,5-10 µl, 200 µl, 1000 µl, klasa Superior, typ Eppendorf	MEDLAB-PRODUCTS
Probówki Eppendorf	Pojemność 1,5 ml z dnem stożkowym	MEDLAB-PRODUCTS
Falcon 96-well plate round bottom	Płytki 96-dołkowe z zaokrąglonym dnem, pakowane indywidualnie	DIAG-MED
Falcon 96-well plate flat bottom	Płytki 96-dołkowe z płaskim dnem, pakowane indywidualnie	DIAG-MED
Probówki wirówkowe	Pojemności: 15 ml, 50 ml	DIAG-MED
EasyFlask <sup>TM</sup> Nunclon <sup>TM</sup>	Buteleczki hodowlane (poj. 25 ml)	ALAB

#### 4.8.1. Linie komórkowe

W testach wykorzystałem linię komórkową ostrej białaczki limfoblastycznej typu T-Jurkat z banku komórek znajdującym się w Zakładzie Immunologii Klinicznej i Transplantologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Komórki PBMC (komórki jednojądrowe krwi obwodowej) były wyizolowane z kożuszka leukocytarnego od anonimowych dawców z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Gdańsku.

#### **4.8.2. Podłoża hodowlane**

Linie komórkowe Jurkat oraz PBMC hodowałem na podłożu płynnym, o składzie: RPMI-1640, FBS (10%) i 100 IU/ml penicyliny (P/S) oraz 100 µg/ml streptomycyny. Proces przygotowania był prowadzony w warunkach sterylnych, podłoże przechowywane w szklanych buteleczkach zabezpieczonych jałowym, gumowym korkiem.

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

##### **4.9.1. Hodowla linii komórkowej Jurkat**

###### **4.9.1.1. Pasażowanie linii komórkowej**

Zastosowana linia komórkowa zalicza się do komórek zawieszinowych. Hodowlę prowadziłem w cieplarni laboratoryjnej w warunkach: temperatura 37 °C, atmosfera zawierająca 5% CO<sub>2</sub>. Pasażowanie odbywało się w medium hodowlanym (P. 4.8.2.). Komórki pasażowałem co 2 dni rozpipetowując zawartość buteleczki hodowlanej, następnie odwirowywałem i większość zużytej pożywki wraz z komórkami usuwałem. Do pozostałych komórek dodawałem medium hodowlane do objętości nie przekraczającej 10 ml.

###### **4.9.1.2. Rozmrażanie linii komórkowej**

Komórki pobierałem w krioampułkach z banku komórek znajdującym się w ciekłym azocie i natychmiast rozmrażałem. Kolejno zawiesinę odwirowywałem na wirówce laboratoryjnej przy parametrach: 1200 obr./min 4 min. Nadsącz usuwałem poprzez delikatne zlewanie, a pozostałość zalewałem pożywką, rozpipetowywałem i przenosiłem do buteleczek hodowlanych. Całość uzupełniałem do objętości nie przekraczającej 10 ml medium hodowlanym.

###### **4.9.1.3. Mrożenie linii komórkowej**

Zawiesinę komórek żywych odwirowywałem (przy parametrach: 1200 obr./min 4 min). Nadsącz zlewałem, a pozostałość zawieszałem w pożywce z dodatkiem 10% FBS i 10% DMSO (procentowe stężenia w finalnej objętości). Tak przygotowane komórki umieszczałem

w krioampułkach i umieszczałem w zamrażalce laboratoryjnej w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ . Następnie całość przenosiłem do banku komórek w ciekłym azocie.

#### 4.9.2. Przygotowanie rozcieńczeń pochodnych adenozyiny i koniugatów MPA

Wszystkie stężenia w zakresie  $10^{-1}$ - $10^{-6}$  mg/ml przygotowywane były metodą seryjnych rozcieńczeń. Badane związki rozpuszczałem w DMSO (dla pochodnych aminoakilowych adenozyiny **97a-h** i opartych o nie analogów MPA **98a-h**) oraz etanolu (dla analogów MPA **99a-e** i **100a-e**) i pożywcze aby otrzymać roztwór wyjściowy o stężeniu 10 mg/ml przy zawartości DMSO/etanolu nie przekraczającym zawartości 5 % objętościowo. W ten sposób otrzymałem stężenia docelowe na płytkach:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  mg/ml. Dla każdego testu zastosowano również stężenia kontrolne związków odniesienia: **6** (adenozyina), **40** (MPA), **69**, **69a** oraz rozpuszczalników (DMSO, etanol) w celu kontroli rozpuszczalnika, jak również pożywkę bez badanych związków z komórkami i bez komórek.

#### 4.9.3. Uzyskiwanie mononuklearnych komórek krwi obwodowej (PBMC)

Komórki PBMC uzyskiwałem z tzw. kożuszka leukocyarno-łytkowego, pochodzącego z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Gdańsku (RCKiK). Otrzymany materiał do badań pochodził od anonimowych, zdrowych dawców, wg kryteriów RCKiK. Kożuszek leukocyarny jest składnikiem krwi i powstaje podczas odwirowanie pełnej krwi, zawierającej leukocyty oraz płytki krwi. Krew rozcieńczyłem buforem PBS w stosunku 1:1 w probówce wirówkowej (typu corning) i nawarstwiałem na mieszaninę Ficollu–Uropoliny (1:1). Całość wirowałem przez 15 min przy prędkości 2500 obr./min. Tak otrzymany, częściowo oddzielony “kożuszek” leukocyarny, znajdujący się na granicy Ficollu i osocza delikatnie zbierałem przy pomocy pipety do probówki wirówkowej. Następnie przepłukałem dwukrotnie buforem PBS i odwirowałem. Tak otrzymane komórki zawieszałem w medium hodowlanym przy zachowaniu parametrów  $10^6$  komórek na 1 ml medium.

#### 4.9.4. Test kolometryczny MTT

##### 4.9.4.1. Linia komórkowa Jurkat

Test użytkowany jest w celu zdefiniowania żywotności komórek. Komórki gotowe do testu zlewałem do probówki wirówkowej, wirowałem 4 min. przy prędkości 1200 obr./min. Nadsącz zlewałem a komórki zawieszałem w świeżym medium hodowlanym. Komórki umieszczałem w ilości  $10^5$ /dołek w 100  $\mu$ l pożywki. Do dołek umieszczałem 100  $\mu$ l roztworu odpowiedniego analogu adenozyiny/MPA (rozpuszczonego w pożywce oraz DMSO -dla pochodnych aminoakilowych adenozyiny **97a-h** i opartych o nie analogów MPA **98a-h** oraz etanolu- dla analogów MPA **99a-e** i **100a-e**) przygotowanego wg pkt 4.9.2. w stężeniach  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  mg/ml. Uwzględniono również stężenia kontrolne pożywki (100  $\mu$ l), rozpuszczalnika DMSO/etanol oraz związków odniesienia: **6**, **40**, **69**, **69a**. Stosowałem dwukrotne powtórzenie dla każdego z badanych stężeń na płytce, oraz wykonanie tych samych stężeń na minimum trzech płytkach. Płytki z komórkami inkubowałem 48h w cieplarni (37,5 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Po tym czasie do każdego dołka dodawałem 20  $\mu$ l roztworu MTT o stężeniu 5mg/ml H<sub>2</sub>O i następnie całość inkubowałem kolejne 3 h. Kolejno do każdego dołka dodawałem 100  $\mu$ l izopropanolu z dodatkiem 0,4 N HCl i płytki wytrząsałem przez 15 min w celu rozpuszczenia kryształków formazanu. Spektrofotometryczny odczyt absorbancji wykonywałem przy długości fali 570 nm, wykorzystując czytnik mikropłytek (PerkinElmer, Vicxtor™ X4, 2030 Multilabel Reader) i program PerkinElmer 2030 Manager.

##### 4.9.4.2. PBMC

Komórki izolowałem wg procedury opisanej w pkt 4.9.3 i umieszczałem na płytkach 96-dokłkowych płaskodennych w ilości  $10^5$ /dołek w 100  $\mu$ l pożywki. Następnie do każdego dołka dodawałem rozcieńczenia związków, wg schematu opisanego w punkcie 4.9.4.1. Limfocyty stymulowałem monoklonalnymi przeciwciałami anti-CD3/anti-CD28 w ilości 1  $\mu$ l/dołek. Tak przygotowane płytki inkubowałem 48 h w cieplarni (37,5 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Po tym czasie do każdego dołka dodawałem 20  $\mu$ l roztworu MTT o stężeniu 5 mg/ml H<sub>2</sub>O i następnie całość inkubowałem kolejne 3 h. Kolejno do każdego dołka dodawałem 100 $\mu$ l izopropanolu z dodatkiem 0,4 N HCl i płytki wytrząsałem przez 15 min. w celu rozpuszczenia kryształków formazanu. Spektrofotometryczny odczyt absorbancji wykonywałem przy



długości fali 570 nm, wykorzystując czytnik mikroplacytek (PerkinElmer, Vicxtor™ X4, 2030 Multilabel Reader) i program PerkinElmer 2030 Manager.

#### **4.9.5. Test inkorporacji tymidyny znakowanej trytem**

Test stosowany jest w celu określenia stopnia proliferacji. Płytki 96-dokłkowe okrągłodenne przygotowywane zostały analogicznie do przedstawionego w pkt. 4.9.4.1. Płytki inkubowałem 72 h w cieplarni (37,5 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Po tym czasie dodawałem sterylny roztwór TdR-3H w pożywce (1950 μl pożywki+50 μl TdR-3H) w ilości 20 μl/dołek i inkubowałem kolejne 18 h. Po tym czasie komórki zbierałem na filtry celulozowe wykorzystując harvester komórek firmy Skatron, umieszczałem w pojemnikach do pomiaru scyntylicyjnego i pozostawiałem do wysuszenia. Po wysuszeniu do pojemników z filtrami dodawałem płynu scyntylicyjnego, do momentu całkowitego zanurzenia filtrów z komórkami. Tak otrzymane próbki do badań poddawałem pomiarowy radioaktywności przy użyciu czytnika scyntylicyjnego fazy płynnej firmy Beckman, model LS 6000IC z parametrem odczytu ustawionego na 5 min/próbka.

## 5. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Celem mojej rozprawy doktorskiej była synteza oraz badania biologiczne *in vitro* nowych analogów kwasu mykofenolowego z pochodnymi adenozyiny jako potencjalnych leków immunosupresyjnych stosowanych w przypadku odrzucania przeszczepów narządów.

Zaprojektowałem i otrzymałem nowe analogi MPA w wyniku połączenia wiązaniem amidowym grupy karboksylowej cząstki MPA z grupą aminową:

- aminoalkilowe pochodnych adenozyiny
- aminokwasowe pochodne adenozyiny

Tak otrzymane związki, łącznie z amidowymi pochodnymi adenozyiny poddałem badaniom *in vitro* w celu określenia potencjalnych właściwości biologicznych wykorzystując testy cytotoksyczności oraz proliferacyjne.

Pierwszym etapem syntez było utworzenie aminoalkilowych pochodnych adenozyiny, wykorzystując reakcję substytucji nukleofilowej pomiędzy rybozydem 6-chloropuryny a różnej długości diaminami alifatycznych.

Etap obejmujący otrzymywanie aminokwasowych pochodnych adenozyiny przeprowadziłem wykorzystując reakcję estryfikacji Yamaguchi pomiędzy Fmoc chronionymi aminokwasami a adenozyiną z osłoną izopropylidenową. Poprzez wprowadzenie modyfikacji poprzez dodanie kolejnej porcji odczynnika Yamaguchi, wzrosła wydajność reakcji.

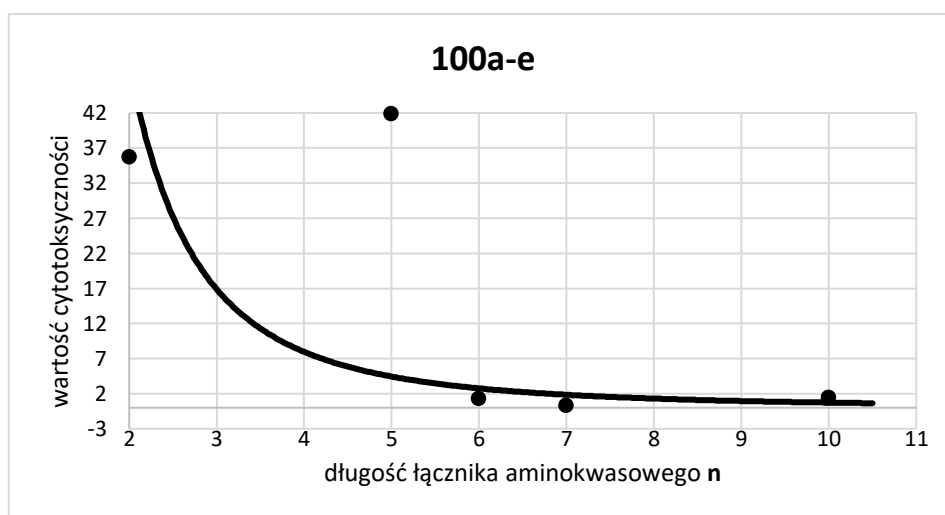
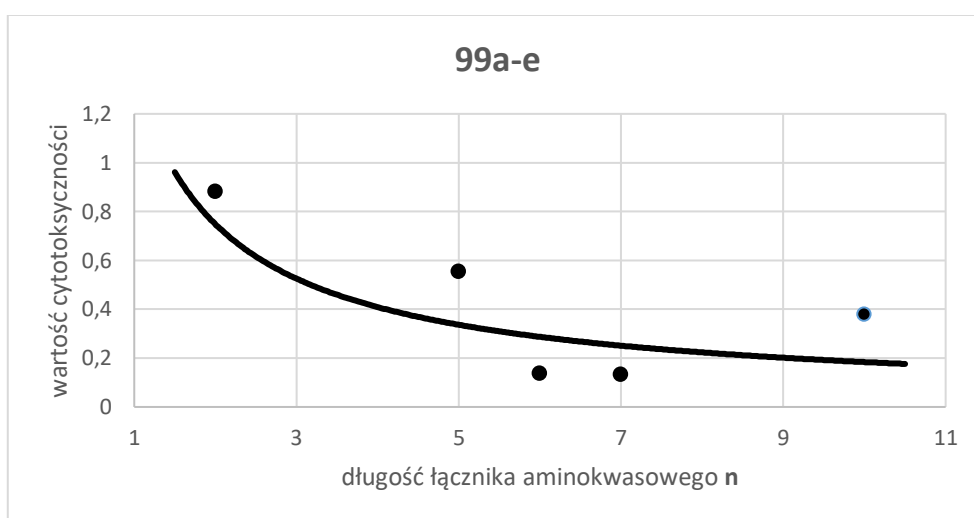
W celu utworzenia wiązania amidowego pomiędzy MPA, a pochodnymi adenozyiny sprawdziłem szereg odczynników kondensujących (EDCI, EEDQ, DPPA, DCC, TBTU, T3P, metoda mieszanych bezwodników) i opierając się na uzyskanych wynikach wytypowałem te, które dawały najwyższą wydajność połączoną z wysoką czystością otrzymanych produktów końcowych. Najkorzystniejszą okazała się metoda oparta o EDCI i DMAP, cechująca się najwyższą wydajnością oraz powodująca doładniejsze i prostsze oczyszczanie produktu. Otrzymane związki rozdzielałem i oczyszczałem wykorzystując kolumnę chromatograficzną oraz płytki TLC. Struktury związków końcowych potwierdziłem za pomocą widm  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR oraz spektrometrii mas, a ich czystość sprawdziłem przy użyciu HPLC.

Biorąc pod uwagę wyniki badań biologicznych określiłem wpływ łączników (długość, struktura) na aktywność immunosupresyjną.

Na podstawie przeprowadzonych prac można sformułować następujące wnioski:

- Badane amidowe pochodne adenozyne **97a-h** oraz ich odpowiednie koniugaty z MPA **98a-h** wykazały większą cytotoksyczność względem odpowiednio adenozyne oraz MPA w teście MTT. Jedynym odstępstwem były związki **98a,b,e,f,g,h** względem komórek PBMC.
- Nie stwierdziłem istotnej korelacji między długością łącznika diaminy a wykazywaną aktywnością biologiczną.
- Związki **97a-h** oraz **98a-h** są bardziej aktywne niż adenozyne zarówno wobec linii komórkowej Jurkat, jak i PBMC.
- Najwyższą cytotoksycznością w tej grupie charakteryzował się związek **97d**, dla którego wartości  $IC_{50}$  są znacznie niższe niż dla adenozyne i MPA, zarówno w stosunku do komórek Jurkat ( $IC_{50}=9,93 \mu M$ ), jak i aktywowanych limfocytów PBMC ( $IC_{50}=10,78 \mu M$ ).
- Modyfikacja MPA o amidowe pochodne adenozyne w teście MTT wykazała wzrost toksyczności wobec komórek Jurkat. Tą samą korelację zauważyłem w przypadku amidoalkilowych pochodnych adenozyne względem adenozyne.
- Amidoalkilowe pochodne adenozyne wykazały większą toksyczność w teście MTT wobec PBMC niżeli adenozyne. Odwrotną sytuację zauważyłem w przypadku koniugatów MPA opartych o aminoalkilowe pochodne adenozyne z wyjątkiem związków **98c, 98d**.
- Przebadanie związków w testach MTT oraz TdR-3H umożliwiło ewaluację związków o możliwie wysokiej aktywności proliferacyjnej przy równocześnie niskiej toksyczności. Na tej podstawie wyselekcjonowałem związki: **97a, 98b** oraz **98g**.
- Koniugaty MPA zawierające aminokwasowe pochodne adenozyne z osłoniętymi grupami hydroksylowymi wykazywały większą cytotoksyczność niż z wolnymi grupami hydroksylowymi. Można wywnioskować, że usunięcie zabezpieczenia 2',3'-*O*-izopropylidenu z grup hydroksylowych zmniejszyły cytotoksyczność związków.
- Stwierdziłem korelację, że wzrost długości łącznika aminokwasowego między aktywnymi cząsteczkami adenozyne i MPA powodowało zwiększenie cytotoksyczności związków. Jednakże zależność ta nie dotyczyła związków **99e** i **100e**.
- Związek **100a** wykazywał około 100-krotną wobec linii komórek Jurkat i około 10-krotnie niższą toksyczność w porównaniu do MPA.
- Testy antyproliferacyjne wykazały, że wszystkie badane związki są bardziej aktywne w porównaniu do MPA wobec linii komórkowej Jurkat. Natomiast odwrotną sytuację można zaobserwować w przypadku linii PBMC.

- Osłona grup hydroksylowych przy użyciu osłony 2',3'-*O*-izopropylidenowej zwiększała aktywność antyproliferacyjną związków **99a-e** w porównaniu do analogów bez osłony **100a-e**.
- Najbardziej aktywnym okazał się związek **99d**.
- Test stabilności analogów przeprowadzony na linii komórkowej Jurkat w oparciu o związki **99b**, **100b** i dla porównania MPA wykazał, że modyfikacja MPA aminokwasowymi pochodnymi adenozyiny przyspieszyła aktywność metaboliczną, a osłona 2',3'-*O*-izopropylidenowa wzmocniła jeszcze ten efekt.
- Po obliczeniu wskaźnika selektywności (SI), najbardziej obiecującym związkiem okazał się **100e**. Mimo niższej wartości  $EC_{50}$  w porównaniu z MPA wobec PBMC ta pochodna okazała się mniej toksyczna wobec linii Jurkat i PBMC.



**Wykres 3.** Wykresy zależności długości łańcucha aminokwasowego **n** a zmianą wartości cytotoksyczności na przykładzie związków **99a-e**, **100a-e**.

## 6. SUMMARY

Transplantology is a branch of science that helps when the treatment of cells, tissues and organs is ineffective and the only possible option for rescuing patients is transplantation. After surgery, the body reacts to the transplant by activating the immune system and can lead to rejection. In this situation, it is used immunosuppressive therapy which reduces the activity of the immune system. The patient undergoes pharmacological treatment by administration drugs from the time of surgery to the patient's death. One of the most commonly used drugs is the MPA. Mycophenolic acid is a long-standing immunosuppressive drug that is available in the treatment of acute rejection in the form of mycophenolate mofetil and mycophenolate sodium. However, like every medicine has its limitations and side effects, and therefore scientists are trying to improve its effect and overcome side effects by modifying it by creating new analogues.

The objective of this dissertation was to plan, synthesize and examine biological activity of innovative mycophenolic acid analogues, containing amino acid/amine adenosine derivatives. The chemical part of the work involved synthesis of: amino adenosine derivatives and their MPA-based analogues, amino acid adenosine derivatives and their conjugates with MPA analogues. Synthesis of amino adenosine derivatives was accomplished according to the method described by Bressi. Amino acid adenosine derivatives were obtained by Yamaguchi esterification with few modifications using Fmoc-protected amino acids with adenosine with 2',3' hydroxyl groups protected by isopropylidene. To form an amide bond between MPA and adenosine derivatives few methods were tested: EDCI/HOBt, EEDQ, DPPA/Et<sub>3</sub>N, DCC, TBTU, T3P, mixed anhydride method. The highest yields and purities of new products were achieved with EDCI/DMAP for amino-adenosine and EDCI/HOBt for amino acids-adenosine MPA analogues.

Novel mycophenolic acid conjugates and amino adenosine derivatives were examined in biological tests *in vitro* to evaluate immunosuppressive properties of the compounds. To determine cytotoxicity was used MTT viability assay and for antiproliferative activity the [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation test. Both tests were performed on lymphoid cell line Jurkat and peripheral blood cells (PBMC) from healthy donors. Based on the tests I have set parameters IC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub> and selectivity index; the activity of newly analogues was compared to adenosine, MPA respectively. This allowed to investigate structure-activity relationships (SAR) of new compounds.

Based on obtained tests results two aminoadenosine-MPA and two amino acid-adenosine-MPA analogues were selected for *in vivo* tests.

## 7. DOROBEK NAUKOWY

### Publikacje oryginalne:

1. Prejs M., Cholewiński G., Siebert A., Trzonkowski P., Dzierzbicka K., New conjugates of mycophenolic acid and their antiproliferative activity. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 2016, 18, 1057-1062.
2. Prejs M., Cholewiński G., Trzonkowski P., Kot-Wasik A., Dzierzbicka K., Synthesis and antiproliferative activity of new mycophenolic acid conjugates. *Pharmacol. Rep.*, 2017, (w recenzji)
3. Cholewinski G., Malachowska-Ugarte M., Siebert A., Prejs M., Dzierzbicka K. Modifications of total synthesis of mycophenolic acid. *Curr. Chem. Lett.*, 2017, (w recenzji)

### Publikacje naukowe:

1. Cholewiński G., Iwaszkiewicz-Grześ D., Prejs M., Głowacka A., Dzierzbicka K., Synthesis of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) inhibitors. *J. Enz. Inh. Med. Chem.*, 2014, 30, 550-563.
2. Siebert A., Prejs M., Cholewiński G., Dzierzbicka K., New analogues of mycophenolic acid. *Mini-Rev. Med. Chem.*, 2017, 17, 734-745.

### Udział w sympozjach i konferencjach naukowych:

1. Prejs M., Dzierzbicka K., Cholewiński G., *Synteza pochodnych adenozyiny*, 57 Zjazd PTChem, 14-18.09.2014, Częstochowa.
2. Prejs M., Dzierzbicka K., Cholewiński G., Trzonkowski P., *Novel of mycphenolic acid conjugates containing adenosine as potential immunosuppressants*, 16th Tetrahedron Symposium, 16-19.06.2015, Berlin, Niemcy.
3. Prejs M., Dzierzbicka K., Cholewiński G., *Estrowe pochodne adenozyiny*, 58 Zjazd Naukowy PTChem, 21-25.09.2015, Gdańsk.
4. Prejs M., Dzierzbicka K., Cholewiński G., *Metody tworzenia wiązania estrowego w syntezie pochodnych adenozyiny*, Progress in Organic Synthesis, 23-25.06.2016, Gdańsk.
5. Prejs M., Dzierzbicka K., Cholewiński G., Trzonkowski P., Synthesis and biological evaluation of new adenosine amino acid derivatives and their conjugates with mycophenolic acid, 17th Tetrahedron Symposium 28.06-1.07.2016, Kelia Sitges, Hiszpania.
6. Prejs M., Dzierzbicka K., Cholewinski G., Siebert A., Trzonkowski P., New conjugates of mycophenolic acid and amino acids derivatives of adenosine as prospective immunosuppressive drugs. *18th Tetrahedron Symposium*, Elsevier, 27-30.06.2017, [P3.31] Budapeszt, Węgry.

## 8. LITERATURA

- [1] A. Mika, P. Stepnowski, Current methods of the analysis of immunosuppressive agents in clinical materials: A review. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2016**, *127*, 207-231.
- [2] D. Iwaszkiewicz-Grześ, G. Cholewiński, A. Kot-Wasik, P. Trzonkowski, K. Dzierzbicka, Synthesis and biological activity of mycophenolic acid-amino acid derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, **2013**, *69*, 863-871.
- [3] J. Bressi, J. Choe, M. Hough, F. Buckner, W. Van Voorhis, Ch. Verlinde, W. Hol, M. Gelb, Adenosine Analogues as Inhibitors of *Trypanosoma brucei* phosphoglycerate kinase: elucidation of a novel binding Mode for a 2-amino- $N^6$ -substituted adenosine. *J. Med. Chem.*, **2000**, *43*, 4135-4150.
- [4] H. Wu, J. Pagadala, C. R. Yates, D. Miller, R. I. Mahato, Synthesis and characterization of an anti-apoptotic immunosuppressive compound for improving the outcome of islet transplantation. *Bioconjugate Chem.*, **2013**, *24*, 2036-2044.
- [5] S. Yu, D. Hou, P. Chen, Q. Zhang, B. Lv, Y. Ma, F. Liu, H. Liu, E. J. Song, D. Yang, J. Liu, Adenosine induces apoptosis through TNFR1/RIPK1/P38 axis in colon cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2015**, *460*, 759-765.
- [6] M. Samsel, K. Dzierzbicka, Therapeutic potential of adenosine analogues and conjugates. *Pharmacol. Rep.*, **2011**, *63*, 601-617.
- [7] E. J. Moticka, *A Historical Perspective on Evidence-Based Immunology*, **2016**, 317-327, <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-398381-7.00036-8>.
- [8] R. S. Figueiredo, C. Wilson, Modern immunosuppression. *Surgery*, **2014**, *32*, 344-350.
- [9] J. Gołąb, M. Jakóbisiak, W. Lasek, T. Stokłosa, *Immunologia*, PWN: Warszawa, **2011**.
- [10] K. Dzierzbicka, G. Cholewiński, D. Iwaszkiewicz-Grześ, P. Trzonkowski, Poszukiwanie nowych leków immunosupresyjnych. *Wiad. Chem.*, **2011**, *65*, 59-92.
- [11] P. Chandak, Ch. Callaghan, The immunology of organ transplantation. *Surgery*, **2014**, *32*, 325-332.
- [12] E. Enkvist, Synthesis of adenosine-peptide conjugates for biological applications, Tartu University Press, **2007**.
- [13] G. E. Knight, G. Burnstock, Identification of P1 and P2 purinoceptors in the aorta of the lizard (*Agama* sp.). *Comp. Biochem. Physiol.*, **2001**, *128*, 413-423.
- [14] S. Sachdeva, M. Gupta, Adenosine and its receptors as therapeutic targets: An overview. *Saudi Pharm. J.*, **2013**, *21*, 245-253.



- [15] G. Cholewiński, D. Iwaszkiewicz-Grześ, M. Prejs, A. Głowacka, K. Dzierzbicka, Synthesis of the inosine 5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2015**, *30*, 550-563.
- [16] L. Antonioli, B. Csóka, M. Fornai, R. Colucci, E. Kókai, C. Blandizzi, G. Haskó, Adenosine and inflammation: what's new on the horizon? *Drug Discov. Today*, **2014**, *19*, 1051-1068.
- [17] G. Haskó, P. Pacher, Regulation of macrophage function by adenosine. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, **2012**, *32*, 865-869.
- [18] S. Ryzhov, S. V. Novitskiy, R. Zaynagetdinov, A. E. Goldstein, D. P. Carbone, I. Biggioni, M. M. Dikov, I. Feoktistov, Host A<sub>2B</sub> adenosine receptors promote carcinoma growth. *Neoplasia*, **2008**, *10*, 987-995.
- [19] J. Sychala, Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol. Ther.*, **2000**, *87*, 161-173.
- [20] T. V. Dunwiddie, S. A. Masino, The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.*, **2001**, *24*, 31-55.
- [21] L. Cappellacci, R. Petrelli, P. Franchetti, P. Vita, P. Kusumanchi, M. Kumar, H. N. Jayaram, B. Zhou, Y. Yen, M. Grifantini, Synthesis and biological activity of novel N<sup>6</sup>-substituted and 2,N<sup>6</sup>-disubstituted adenine ribo- and 3'-C-methyl-ribonucleosides as antitumor agents. *Eur. J. Med. Chem.*, **2011**, *46*, 1499-1504.
- [22] A. El-Tayeb, S. Gollos, Synthesis and structure-activity relationships of 2-hydrazinyladenosine derivatives as A<sub>2A</sub> adenosine receptor ligands. *Bioorg. Med. Chem.*, **2013**, *21*, 436-447.
- [23] Y. Jiao, X. Wang, W. Lu, Z. Yang, Q. Zhang, A novel approach to improve the pharmacokinetic properties of 8-chloro-adenosine by the dual combination of lipophilic derivatisation and liposome formulation. *Eur. J. Pharm. Scien.*, **2013**, *48*, 249-258.
- [24] M. Samsel, K. Dzierzbicka, P. Trzonkowski, Synthesis and antiproliferative activity of conjugates of adenosine with muramyl dipeptide and nor-muramyl dipeptide derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2014**, *24*, 3587-3591.
- [25] R. Swami, I. Singh, M. K. Jeengar, V. G. M. Naidu, W. Khan, R. Sistla, Adenosine conjugated lipidic nanoparticles for enhanced tumor targeting. *Int. J. Pharm.*, **2015**, *486*, 287-296.
- [26] G. Vistoli, A. Brizzolari, E. Faioni, C. Razzari, E. Santaniello, Naturally occurring N<sup>6</sup>-substituted adenosines (cytokinin ribosides) are *in vitro* inhibitors of platelet aggregation: An



in silico evaluation of their interaction with the P2Y<sub>12</sub> receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2014**, *24*, 5652-5655.

[27] B. Gosio, Ricerche batteriologiche e chimiche sulle alterazioni del mais. *Rivista d'Igiene e Sabita publica Ann.*, **1896**, *7*, 825-868.

[28] P. W. Clutterbuck, H. Raistick, Studies in the biochemistry of micro-organisms: The molecular constitution of the metabolic products of *Penicillium brevi-compactum* dierckx and related species. II. Mycophenolic acid. *Biochem. J.*, **1933**, *27*, 654-667.

[29] D. F. Jones, R. H. Moore, G. C. Crawley, Microbial modification of mycophenolic acid. *J. Chem. Soc. C.*, **1970**, *12*, 1725-1737.

[30] R. Bentley, Mycophenolic Acid: A One hundred year odyssey from antibiotic to immunosuppressant. *Chem. Rev.*, **2000**, *100*, 3801-3826.

[31] G. Cholewiński, M. Małachowska-Ugarte, K. Dzierzbicka, The chemistry of mycophenolic acid-synthesis and modifications towards desired biological activity. *Curr. Med. Chem.*, **2010**, *17*, 1926-1941.

[32] A. Prémaud, A. Rousseau, G. Johnson, C. Canivet, P. Gandia, F. Muscari, J. M. Peron, L. Rostain, P. Marquet, N. Kamar, Inhibition of T-cell activation and proliferation by mycophenolic acid in patients awaiting liver transplantation: PK/PD relationships. *Pharm. Res.*, **2011**, *11*, 432-438.

[33] D. Faugaret, R. Lemoine, C. Baron, Y. Lebranchu, F. Velge-Roussel, 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.

[34] J. A. Digits, L. Hedstrom, Species-specific inhibition of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase by mycophenolic acid. *Biochemistry*, **1999**, *38*, 15388-15397.

[35] M. D. Sintchak, E. Nimmesgern, The structure of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and the design of novel inhibitors. *Immunopharmacology*, **2000**, *47*, 163-184.

[36] M. Behrend, Mycophenolate mofetil (Cellcept). *Exp. Opin. Investig. Drugs*, **1998**, *7*, 1509-1519.

[37] M. Shipkova, W. V. Armstrong, E. Wieland, P. D. Niedmann, E. Schütz, G. Brenner-Weiss, M. Voihsel, F. Braun, M. Oellerich, Identification of glucoside and carboxyl-linked glucuronide conjugates of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil. *Br. J. Pharmacol.*, **1999**, *126*, 1075-1082.

[38] A. C. Allison, E. M. Eugui, Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology*, **2000**, *47*, 85-118.

- [39] <http://www.roche.pl/home/produkty/charakterystyki-produktow-leczniczych-i-ulotki.html>.
- [40] K. G. Moder, Mycophenolate mofetil: new applications for this immunosuppressant. *Ann. Allergy. Asthma. Immunol.*, **2003**, *90*, 15-20.
- [41] V. C. Cox, M. H. Ensom, Mycophenolate mofetil for solid organ transplantation: does the evidence support the need for clinical pharmacokinetic monitoring? *The Drug Monit.*, **2003**, *25*, 137-157.
- [42] A. C. Allison, E. M. Eugui, Purine metabolism and immunosuppressive effects of mycophenolate mofetil (MMF). *Clin. Transplant.*, **1996**, *10*, 77-84.
- [43] H. W. Sollinger, Mycophenolates in transplantation. *Clin. Transplant.*, **2004**, *18*, 485-492.
- [44] A. J. Birch, J. J. Wright, A total synthesis of mycophenolic acid. *Chem. Commun.*, 1969, 788-789.
- [45] J. W. Patterson, G. T. Huang, The orthoester claisen rearrangement in the synthesis of mycophenolic acid. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1991**, 1579-1580.
- [46] J. W. Patterson, The synthesis of mycophenolic acid from 2,4-dihydroxybenzoic acid. *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 4542-4548.
- [47] R. A. de la Cruz, F. X. Talamás, A. Vázquez, J. M. Muchowski, Total synthesis of mycophenolic acid. *Can. J. Chem.*, **1997**, *75*, 641-645.
- [48] L. Canonica, B. Rindone, E. Santaniello, C. Scolastico, A total synthesis of mycophenolic acid, some analogues and some biogenetic intermediates. *Tetrahedron*, **1972**, *28*, 4395-4404.
- [49] R. L. Danheiser, S. K. Gee, J. J. Perez, Total synthesis of mycophenolic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 806-810.
- [50] A. Covarrubias-Zúñiga, A. González-Lucas, A total synthesis of mycophenolic acid. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 2881-2882.
- [51] A. Covarrubias-Zúñiga, J. Diaz-Dominguez, J. S. Olguin-Urbe, 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.
- [52] A. Covarrubias-Zúñiga, A. Gonzalez-Lucas, M. M. Dominguez, Total synthesis of mycophenolic acid. *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 1989-1994.
- [53] P. A. Plé, A. Hamon, G. Jones, A convergent synthesis of mycophenolic acid. *Tetrahedron*, **1997**, *53*, 3395-3400.
- [54] S. Anindya, S. Shrikumar, K. A. Prakash, S. Pampapayhy, T. S. Pradeep, Manufacture and purification of mycophenolic acid. Patent WO 0164931, **2003**.

- [55] K. Vilmos, C. Zoltan, Process for preparation of mycophenolic acid and ester derivatives thereof. Patent WO 2005105768, **2007**.
- [56] A. Jekkel, I. Barta, A. Kónya, J. Sütő, S. Boros, Gy. Horváth, G. Ambrus, Microbiological transformation of mycophenolic acid. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **2001**, *11*, 423-426.
- [57] A. Jekkel, I. Barta, S. Boros, J. Sütő, Gy. Horváth, Zs. Szabó, G. Ambrus, Microbial transformation of mycophenolic acid Part II. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2002**, *19-20*, 209-214.
- [58] J. W. Patterson, The synthesis of mycophenolic acid. *Tetrahedron*, **1993**, *49*, 4789-4798.
- [59] P. A. Brookes, J. Cordes, A. J. P. White, A. G. M. Barrett, Total synthesis of mycophenolic acid by a palladium-catalyzed decarboxylative allylation and biomimetic aromatization sequence. *Eur. J. Org. Chem.*, **2013**, *2013*, 7313-7319
- [60] <https://www.cellcept.com/> data odwiedzenia witryny: 27.09.2017.
- [61] F. Alani, J. A. Grove, W. A. Anderson, M. Moo-Young, Mycophenolic acid production in solid-state fermentation using a packed-bed bioreactor. *Biochem. Eng. J.*, **2009**, *44*, 106-110.
- [62] M. R. Laftavi, F. Hai, H. Laftavi, L. Feng, M. Said, S. Patel, R. Kohli, M. Alnimri, M. Dayton, O. Pankewycz, Mycophenolic acid dose reductions result in poor long-term renal allograft survival: comparison between mycophenolate sodium and mycophenolate mofetil. *Transplant Proc.*, **2011**, *43*, 478-481.
- [63] M. Salvadori, E. Bertoni, K. Budde, H. Holzer, G. Civati, B. Lien, W. Arns, Superior efficacy of enteric-coated mycophenolate vs mycophenolate mofetil in *de novo* transplant recipients: pooled analysis. *Transplant. Proc.*, **2010**, *42*, 1325-1328.
- [64] <http://www.pharma.us.novartis.com/product/pi/pdf/myfortic.pdf> data odwiedzenia witryny 27.09.2017.
- [65] F. Qiong-Ying, Y. Xia, L. Zheng-Hui, L. Yan, L. Ji-Kai, F. Tao, Z. Bao-Hua, Mycophenolic acid derivatives from cultures of the mushroom *Laetiporus sulphureus*. *Chin. J. Nat. Med.*, **2014**, *12*, 685-688.
- [66] M. Malachowska-Ugarte, G. Cholewiński, K. Dzierzbicka, P. Trzonkowski, Synthesis and biological activity of novel mycophenolic acid conjugates containing nitro-acridine/acridone derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, *54*, 197-201.
- [67] S. Mitsuhashi, J. Takenaka, K. Iwamori, N. Nakajima, M. Ubukata, Structure-activity relationships for inhibition of inosine monophosphate dehydrogenase and differentiation

induction of K562 cells among the mycophenolic acid derivatives. *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, *18*, 8106-8111.

[68] K. W. Pankiewicz, K. B. Lesiak-Watanabe, K. A. Watanabe, S. E. Patterson, H. N. Jayaram, J. A. Yalowitz, M. D. Miller, M. Seidman, A. Majumdar, G. Prehna, B. M. Goldstein, Novel mycophenolic adenine bis(phosphonate) analogues as potential differentiation agents against human leukemia. *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 703-712.

[69] K. Felczak, L. Chen, D. Wilson, J. Williams, R. Vince, R. Petrelli, H. N. Jayaram, P. Kusumanchi, M. Kumar, K. W. Pankiewicz, Cofactor-type inhibitors of inosine monophosphate dehydrogenase via modular approach: targeting the pyrophosphate binding sub-domain. *Bioorg. Med. Chem.*, **2011**, *19*, 1594-1605.

[70] K. Felczak, K. W. Pankiewicz, Rehab of NAD(P)-dependent enzymes with NAD(P)-based inhibitors. *Curr. Med. Chem.*, **2011**, *18*, 1891-1908.

[71] K. W. Pankiewicz, K. Felczak, From ribavirin to NAD analogues and back to ribavirin in search for anticancer agents. *Heterocycl. Commun.*, **2015**, *21*, 249-257.

[72] K. W. Pankiewicz, L. Petrelli, R. Singh, K. Felczak, Nicotinamide adenine dinucleotide based therapeutics, update. *Curr. Med. Chem.*, **2015**, *22*, 3991-4028.

[73] L. Chen, D. J. Wilson, N. P. Labello, H. H. Jayaram, K. W. Pankiewicz, Mycophenolic acid analogs with a modified metabolic profile. *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, *16*, 9340-9345.

[74] L. Chen, D. Wilson, H. N. Jayaram, K. W. Pankiewicz, Dual inhibitors of IMP-dehydrogenase and histone deacetylases for cancer treatment. *J. Med. Chem.*, **2007**, *50*, 6685-6691.

[75] X. Wang, Y. Lin, Y. Zeng, X. Sun, T. Gong, Z. Zhang, Effects of mycophenolic acid-glucosamine conjugates on the base of kidney targeted drug delivery. *Inter. J. Pharma.*, **2013**, *456*, 223-234.

[76] N. Yang, Q. Wang, W. Wang, J. Wang, F. Li, S. Tan, M. Cheng, The synthesis and *in vitro* immunosuppressive evaluation of novel isobenzofuran derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2012**, *22*, 53-56.

[77] L. Guazelli, F. D'Andrea, F. Giorgelli, G. Catelani, A. Panattoni, A. Luvisi, Synthesis of PAMAM dendrimers loaded with mycophenolic acid to be studied as new potential immunosuppressants. *J. Chem.*, **2015**, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/263072>.

[78] P. H. Nelson, S. F. Carr, B. H. Devens, E. M. Eugui, F. Franco, C. Gonzalez, R. C. Havley, D. G. Loughhead, D. J. Milan, E. Papp, J. W. Patterson, S. Rouhafza, E.B. Sjogren, D. B. Smith, R. A. Stephenson, F. X. Talamas, A-N. Waltos, R. J. Weikert, J. C. Wu,

Structure-Activity Relationships for Inhibition of Inosine Monophosphate Dehydrogenase by Nuclear Variants of Mycophenolic Acid. *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 4181-4196.

[79] M. E El-Araby, R. J. Bernacki, G.M. Makara, P. J. Pera, W. K. Anderson, Synthesis molecular modeling, and evaluation of nonphenolic indole analogs of mycophenolic acid. *Biorg. Med. Chem.*, **2004**, *12*, 2867-2879.

[80] G. Lai, W. K. Anderson, Synthesis of novel indole analogues of mycophenolic acid as potential antineoplastic agents. *Tetrahedron*, **2000**, *56*, 2583-2590.

[81] G. Cholewiński, D. Iwaszkiewicz-Grześ, P. Trzonkowski, K. Dzierzbicka, Synthesis and biological activity of ester derivatives of mycophenolic acid and acridines/acridones as potential immunosuppressive agents. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2016**, *31*, 974-982.

[82] D. Iwaszkiewicz-Grzes, G. Cholewinski, A. Kot-Wasik, P. Trzonkowski, K. Dzierzbicka, Investigations on the immunosuppressive activity of derivatives of mycophenolic acid in immature dendritic cells. *Int. Immunopharmacol.* **2017**, *44*, 137-142.

[83] A. Siebert, M. Prejs, G. Cholewinski, K. Dzierzbicka, New analogues of mycophenolic acid. *Mini Rev. Med. Chem.* **2017**, *17*, 734-745.

[84] L. Hedstrom, IMP Dehydrogenase: structure, mechanism and inhibition. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2903-2928.

[85] K. Felczak. R. Vince, K. W. Pankiewicz, NAD-based inhibitors with anticancer potential. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2014**, *24*, 332-336.

[86] K. Sunohara, S. Mitsuhashi, K. Shigetomi, M. Ubukata, 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.

[87] X. Wang, Y. Lin, Y. Zeng, X. Sun, T. Gong, Z. Zhang, Effects of mycophenolic acid-glucosamine conjugates on the base of kidney targeted drug deliver. *Int J. Pharm.*, **2013**, *456*, 223-234.

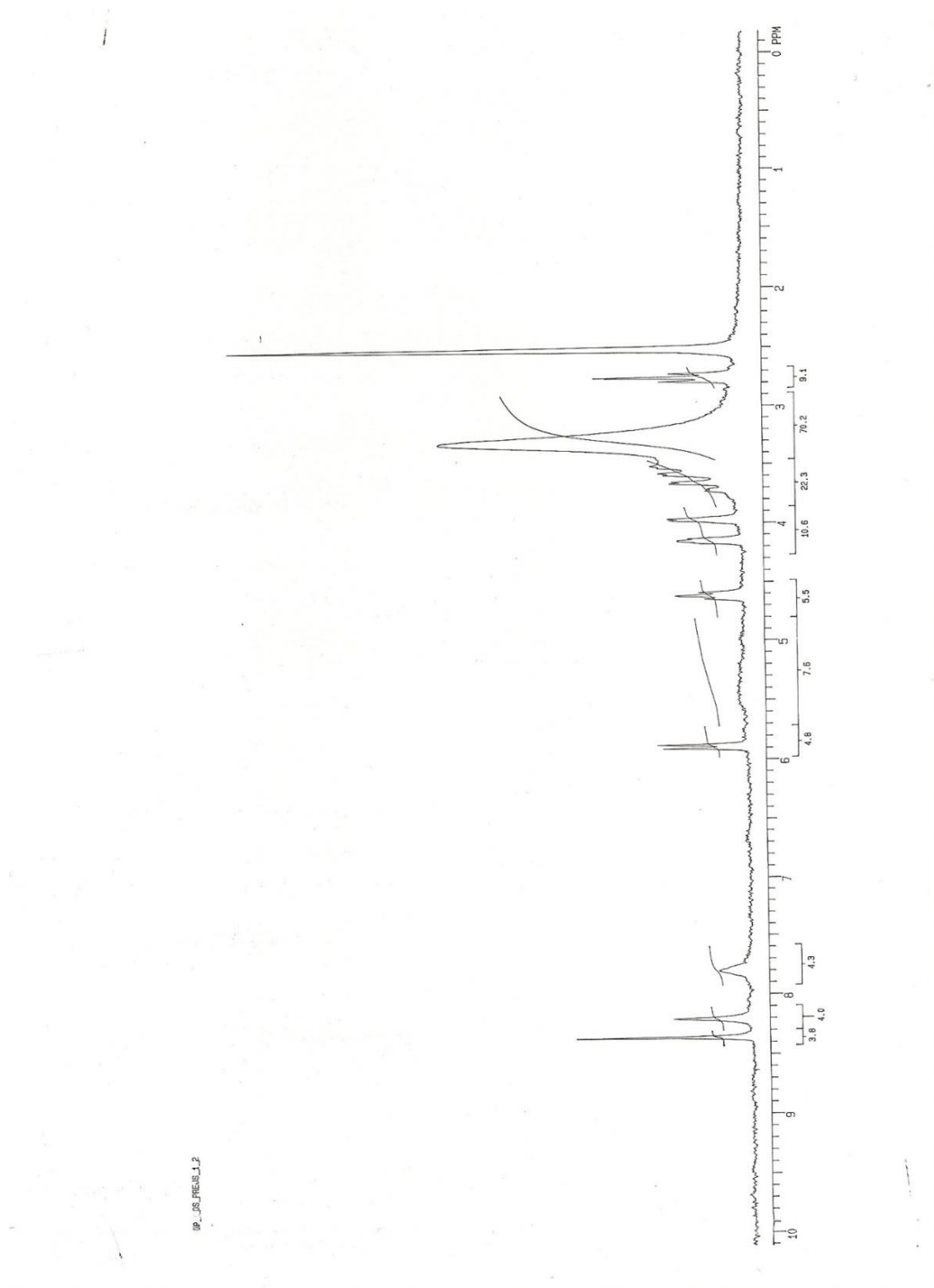
[88] Y. Peng, Y. Dong, R. I. Mahato, Synthesis and characterization of novel mycophenolic acid-quinic acid conjugate serving as immunosuppressant with decreased toxicity. *Mol. Pharm.*, **2015**, *12*, 4445-4453.

[89] Z. Chen, Z. Zheng, H. Huang, Y. Song, X. Zhang, J. Ma, B. Wang, Ch. Zhang, J. Ju, 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.

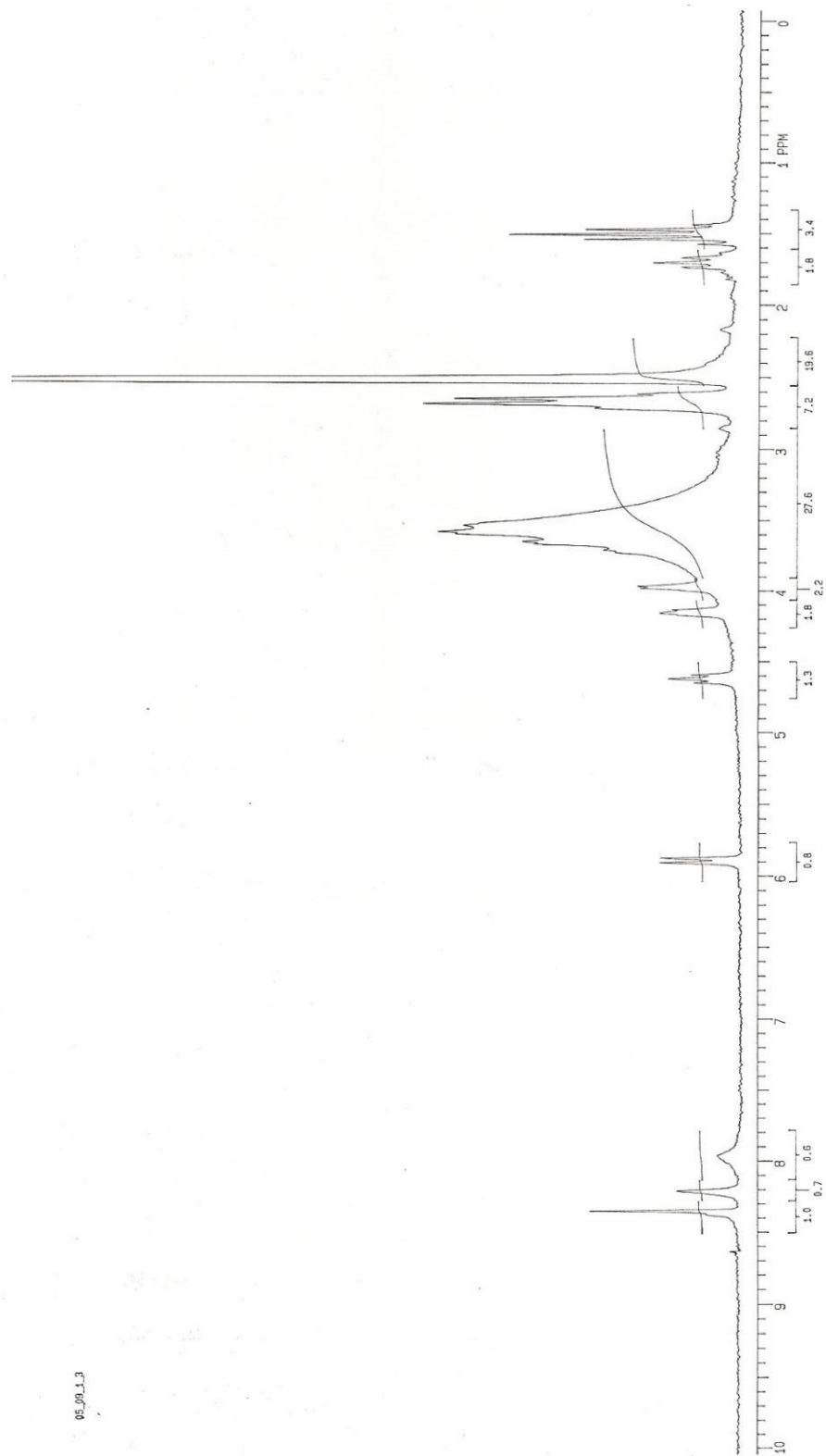
- [90] J. Inanaga, K. Hirata, H. Saeki, T. Katsuki, M. Yamaguchi, A rapid esterification by means of mixed anhydride and its application to large-ring lactonization. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1979**, 52, 1989-1993.
- [91] I. Dhimitruka, J. SantaLucia Jr., Investigation of the Yamaguchi esterification mechanism. Synthesis of the Lux-S enzyme inhibitor using an improved esterification method. *Org. Lett.*, **2006**, 8, 47-50.
- [92] A. Isidro-Llobet, M. A. Alvarez, F. Albericio, Amino acid-protecting groups. *Chem. Rev.*, **2009**, 109, 2455-2504.
- [93] J. Weyermann, D. Lochmann, A. Zimmer, A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int. J. Pharm.*, **2005**, 288, 369-376.
- [94] J. C. Stockert, A. Blazquez-Castro, M. Canete, R. W. Horobin, A. Villanueva, MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem.*, **2012**, 114, 785-796.
- [95] A. C. Collier, Ch. A. Pristos, The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT assay. *Biochem. Pharmacol.*, **2013**, 66, 281-287.
- [96] T. Mosmann, Rapidly colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.*, **1983**, 65, 55-63.
- [97] K. Dzitko, D. Dudzinska, M. Grzybowski, H. Długowska, The utility of MTT and XTT colorimetric tests in the studies conducted *in vitro* with *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Wiad. Parazytol.*, **2010**, 56, 145-152.
- [98] J. Krzystoń-Russjan, I. Książek, E. Anuszevska, Porównanie użyteczności testów MTT i EZ4U stosowanych do oceny cytotoksyczności ksenobiotyków. *Farm. Pol.*, **2009**, 65, 395-402.
- [99] F. Denizot, R. Lang, Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods.*, **1986**, 83, 271-277.
- [100] A. Pollack, H. Moulis, D. B. Greenstein, N. L. Block, G. L. Irvin, Cell kinetic effects of incorporated <sup>3</sup>H-thymidine on proliferating human lymphocytes: flow cytometric analysis using DNA/nuclear protein method. *Cytometry*, **1985**, 6, 428-436.
- [101] K. Duque, P. Rakic, Different effects of BrdU and <sup>3</sup>H-Thymidine incorporation into DNA on cell proliferation, position and fate. *J. Neurosci.*, **2011**, 31, 15205-15217.
- [102] E. L. Anuszevska, Badanie aktywności cytotoksycznej produktów leczniczych i wyrobów medycznych, *Gazeta Farmaceut.*, **2010**, 5, 36-38.

## 9. Widma $^1\text{H}$ NMR, $^{13}\text{C}$ NMR przykładowych związków

$^1\text{H}$  NMR  $N^6$ -(2-aminoetylo)adenozyny **97a**

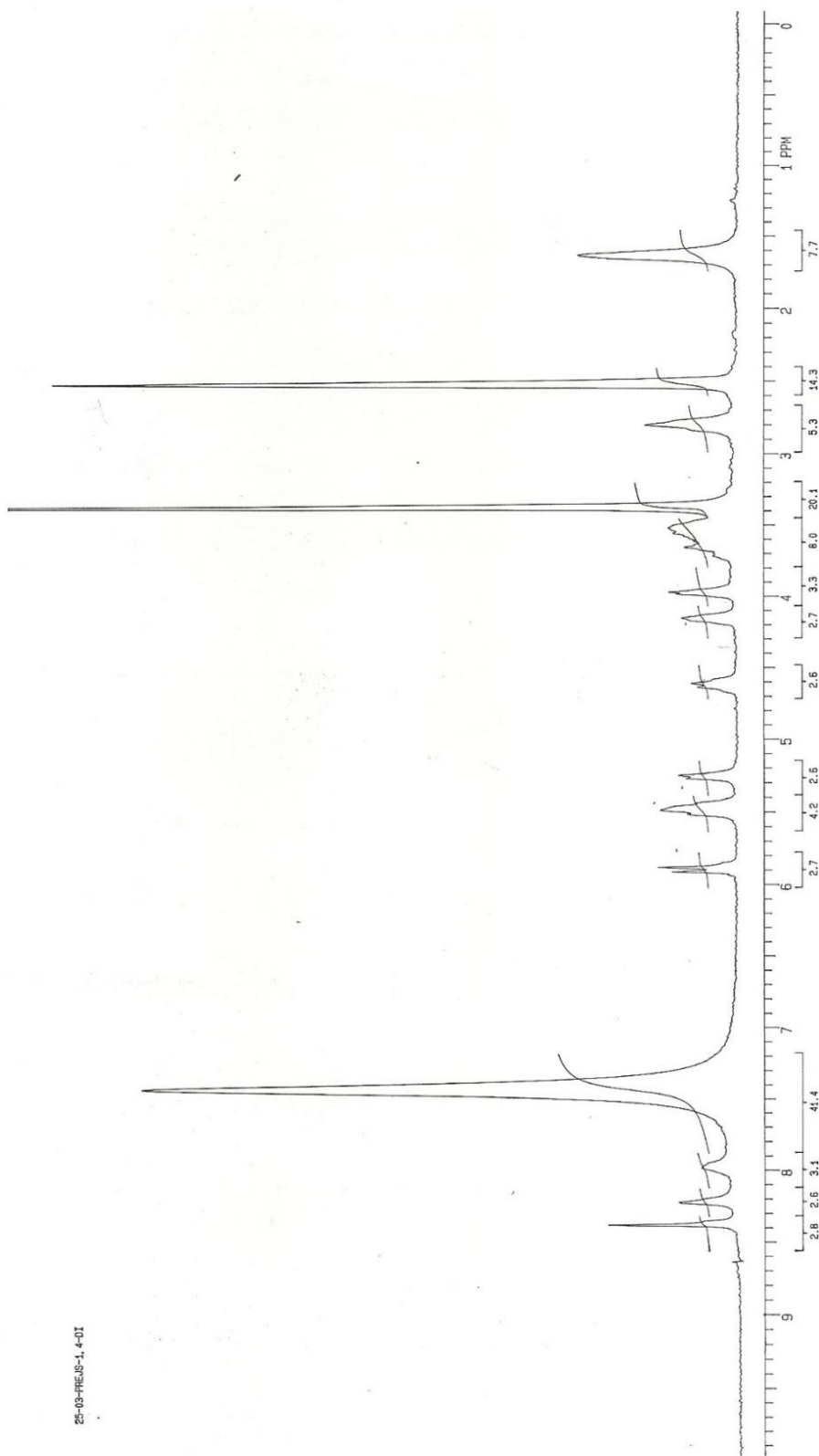


$^1\text{H}$  NMR  $N^6$ -(3-aminopropyl)adenozyny **97b**

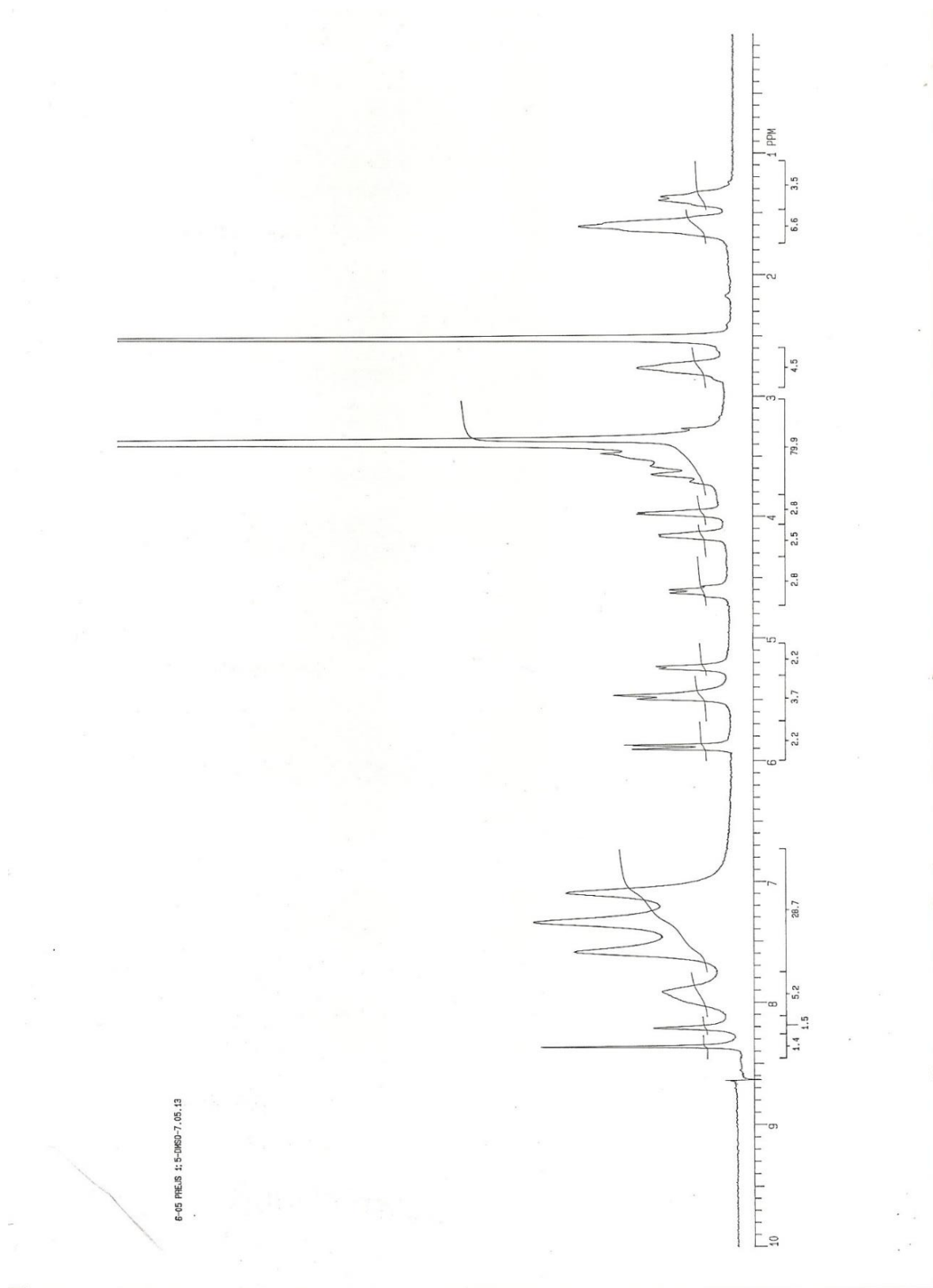




$^1\text{H}$  NMR  $N^6$ -(4-aminobutylo)adenozyny **97c**

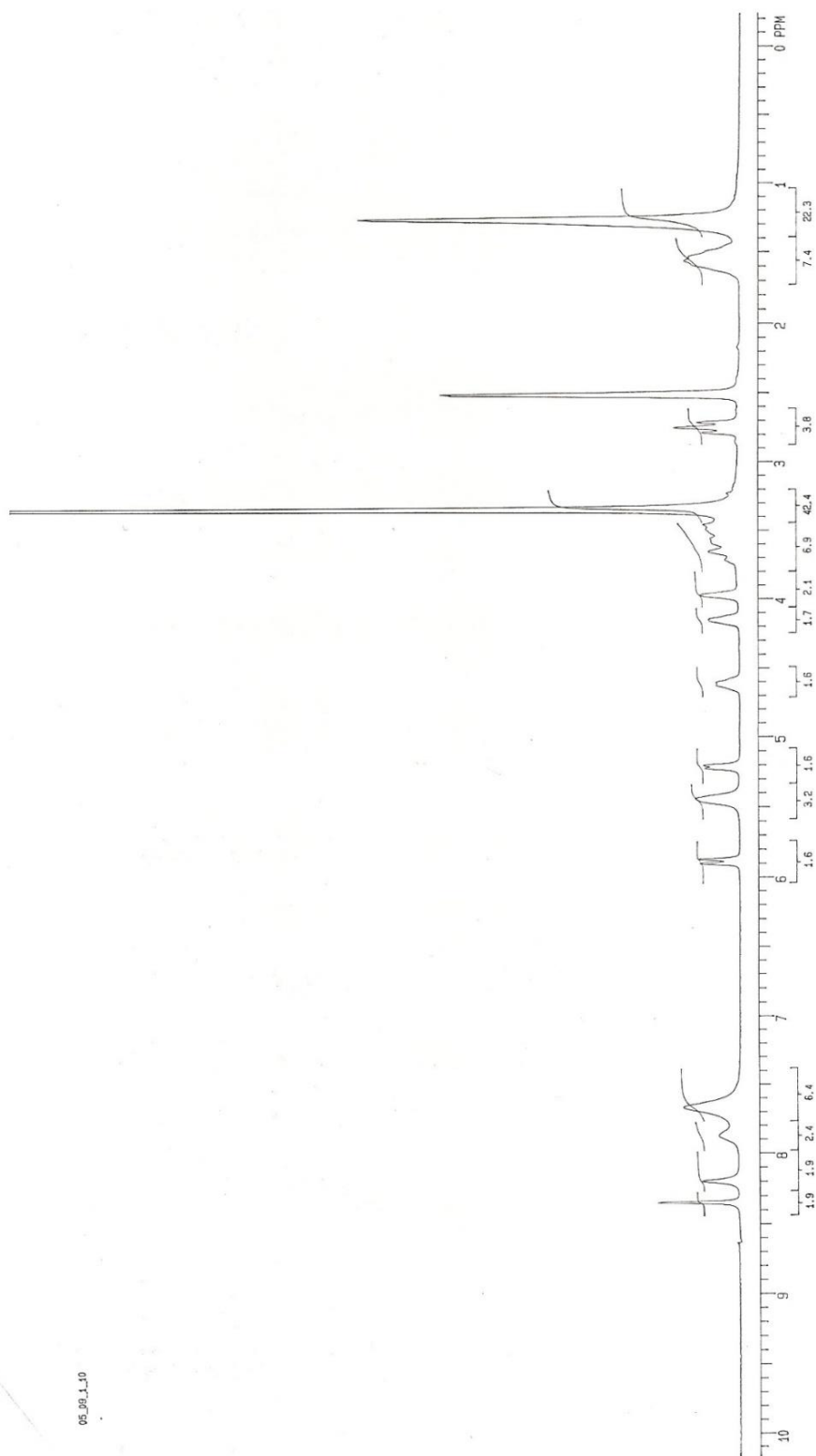


$^1\text{H}$  NMR  $N^6$ -(5-aminopentyl)adenozyny **97d**





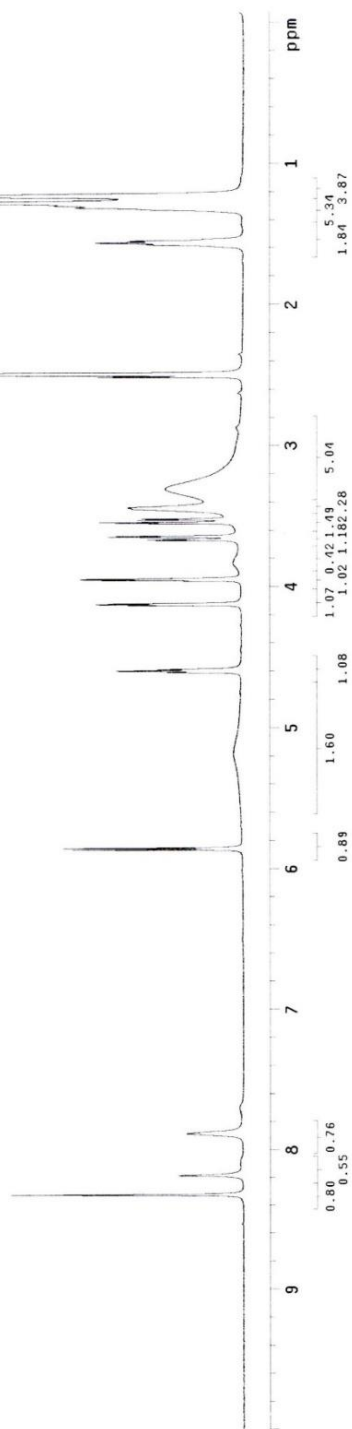
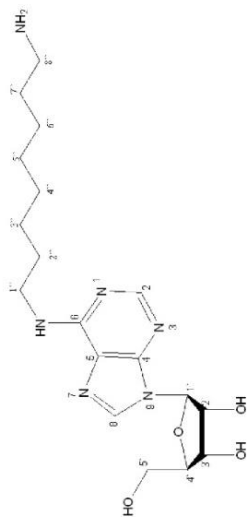
$^1\text{H}$  NMR  $N^6$ -(10-aminodecylo)adenozyny **97g**



05\_09\_1\_10

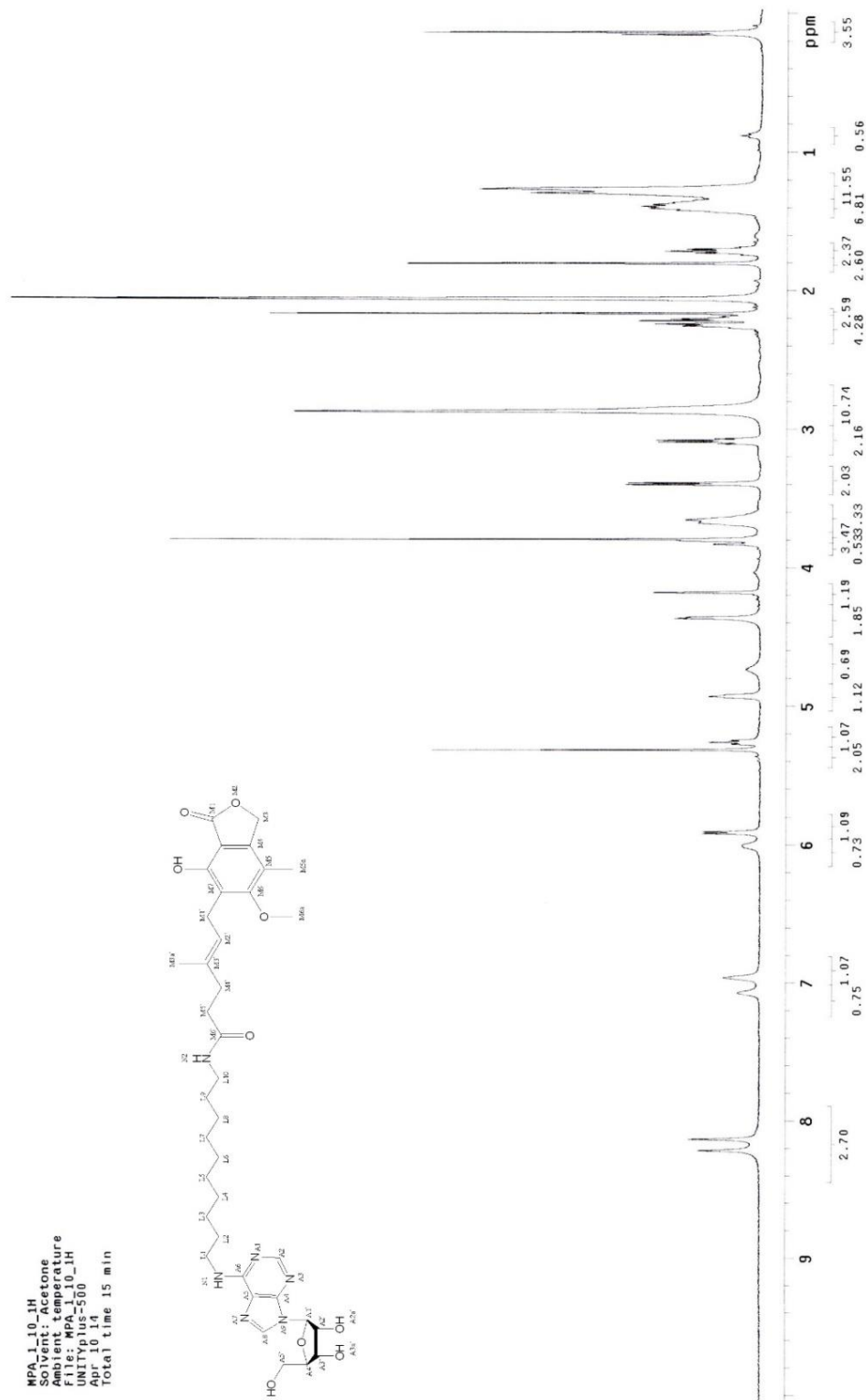
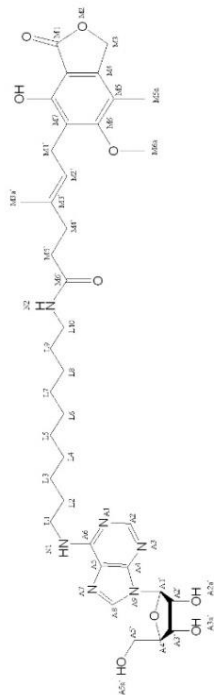
$^1\text{H}$  NMR  $N^6$ -(8-aminooktylo)adenozyny **97f**

1\_8\_AM  
Solvent: DMSO  
Temperature: 300  
UNITYplus-500  
May 30 14  
Total time 15 min



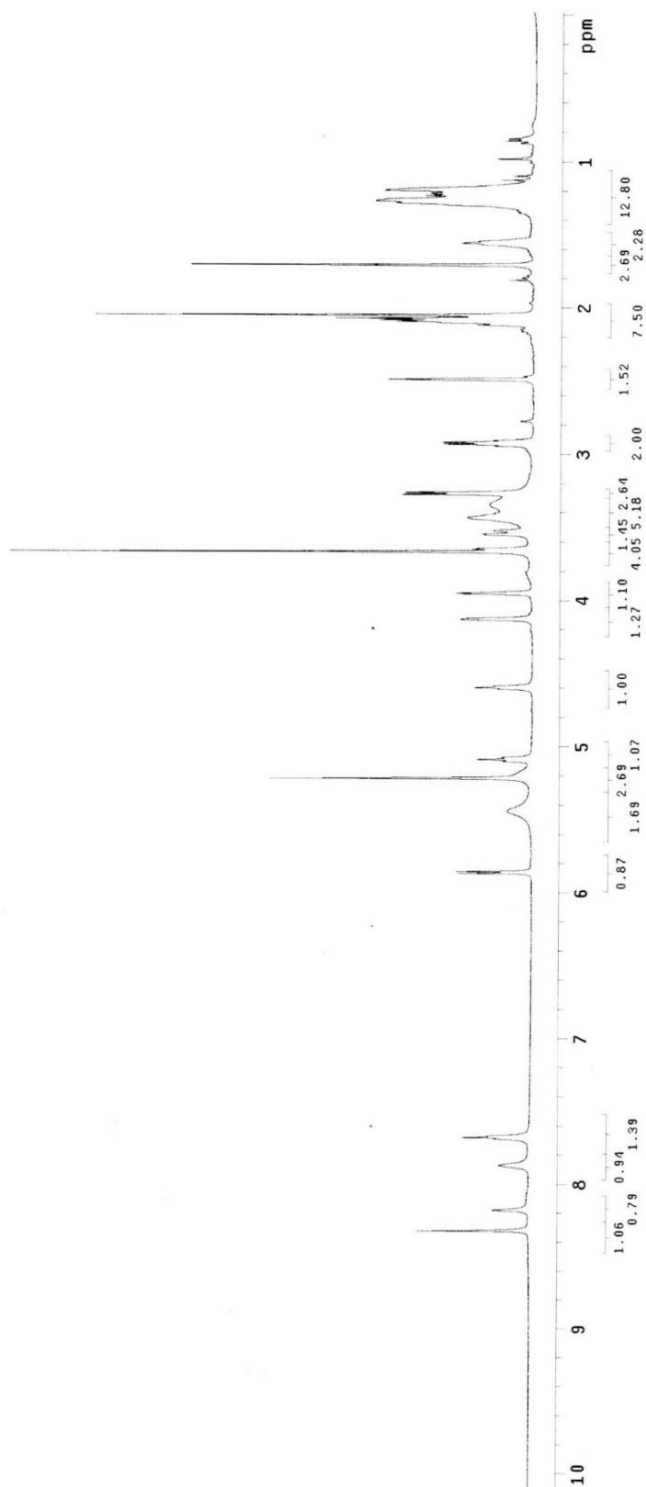
$^1\text{H NMR}$  *N*-mykofenoilo-*N*<sup>6</sup>-(10-aminodecylo)adenozyny **98g**

MPA\_1\_10\_1H  
 Solvent: Acetone  
 Ambient temperature  
 File: MPA\_1\_10\_1H  
 UNITYplus-500  
 01.10.14  
 Total time 15 min

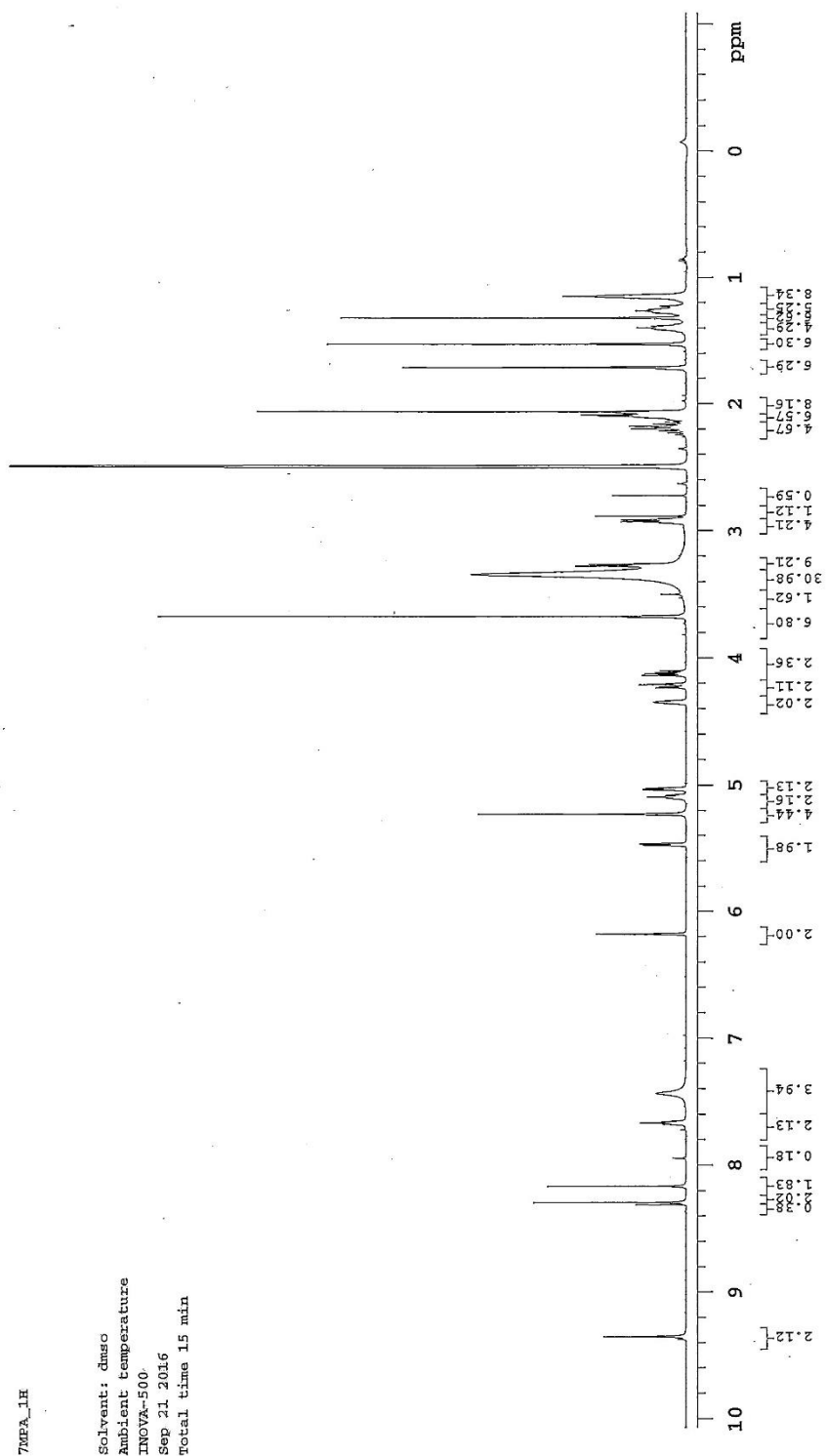


$^{13}\text{C}$  NMR *N*-mykofenoiło-*N*<sup>6</sup>-(8-aminooktyło)adenozyny **98f**

1.8. MPA, 13C  
Solvent: DMSO  
Ambient temperature  
UNITYplus-500  
Jun 9 14  
Total time 15 min



$^1\text{H}$  NMR Ester 2',3'-*O*-izopropylidenoadozylo-5'-wego kwasu *N*-mykofenoilo-7-aminoheptanowego **99c**





<sup>13</sup>C NMR Ester adenozył-5'-owy kwasu *N*-mykofenoilo-6-aminoheksanowego **100b**

6MFA\_bisco\_13C

Solvent: dmsc  
Ambient temperature  
INOVA-500  
Sep 28 2016  
Total time 1.6 hr, 45 min

