



Imię i nazwisko autora rozprawy: Agnieszka Siebert
Dyscyplina naukowa: Chemia

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim: „**Synteza nowych aminokwasowych i peptydowych analogów kwasu mykofenolowego oraz ich aktywność biologiczna i mikrobiologiczna**”.

Tytuł rozprawy w języku angielskim: „**Synthesis of new amino acid and peptide analogs of mycophenolic acid and their biological and microbiological activity**”.

Promotor	Drugi promotor
<i>podpis</i>	<i>podpis</i>
prof. dr hab. inż. Janusz Rachoń	
Promotor pomocniczy	Kopromotor
<i>podpis</i>	<i>podpis</i>
dr inż. Grzegorz Cholewiński	

*Składam serdeczne podziękowania
Moim Promotorom:
Prof. Januszowi Rachoniowi oraz
dr inż. Grzegorzowi Cholewińskiemu
za opiekę merytoryczną, poświęcony czas, cenne rady,
a także miłą atmosferę podczas powstawania niniejszej pracy,*

*Prof. Krystynie Dzierzbickiej
i Prof. Piotrowi Trzonkowskiemu
za wsparcie naukowe, wszelką udzieloną pomoc i życzliwość,*

*Koleżankom i Kolegom z Katedry Chemii Organicznej
oraz z Zakładu Immunologii Klinicznej i Transplantologii
za wspaniałą atmosferę, współpracę i pomoc,*

*Rodzicom za wykształcenie, inspirację,
a także nigdy niegasnącą wiarę we mnie,*

Przyjaciółom i Siostrze za ciepłe słowa i mobilizację,

*W szczególności dziękuję Mojemu Mężowi
za cierpliwość, zrozumienie oraz nieustanne wsparcie.*

SPIS TREŚCI

SPIS TREŚCI.....	3
SPIS SKRÓTÓW.....	9
STRESZCZENIE.....	13
WSTĘP	15
1. Kwas mykofenolowy	19
1.1. MPA jako inhibitor IMPDH	19
1.2. Otrzymywanie MPA	22
1.2.1. Biosynteza MPA.....	22
1.2.2. Synteza chemiczna MPA.....	22
1.3. Właściwości biologiczne MPA i jego analogów	26
1.3.1. Działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybowe.....	26
1.3.2. Działanie przeciwwirusowe.....	27
1.3.3. Działanie przeciwnowotworowe i immunosupresyjne.....	27
1.4. Proleki MPA stosowane klinicznie.....	36
1.5. Metabolizm <i>in vivo</i> mykofenolanów	37
2. Tuftsyna	40
2.1. Właściwości biologiczne tuftsyny	41
2.2. Przegląd najnowszych analogów tuftsyny.....	42
3. Odczynniki kondensujące w tworzeniu wiązania amidowego	49
3.1. Karbodiimidy	50
3.2. Mieszane bezwodniki	52
3.3. Związki wspomagające reakcję kondensacji	53
3.4. Odczynniki fosfoniowe.....	55
3.5. Odczynniki amoniowe/uroniowe	57
3.6. Inne odczynniki kondensujące.....	59
CEL PRACY.....	61
BADANIA WŁASNE	63
1. Prace syntetyczne.....	63
1.1. Synteza aminokwasowych pochodnych MPA	63



1.1.1.	Synteza aminokwasowych pochodnych MPA w postaci estrów metylowych 199-205	63
1.1.2.	Synteza aminokwasowych pochodnych MPA z wolną grupą karboksylową 206-211	65
1.2.	Synteza peptydowych pochodnych kwasu mykofenolowego	65
1.2.1.	Synteza tetrapeptydów: tuftsyny 220 i retro-tuftsyny 229	65
1.2.2.	Synteza pentapeptydów, pochodnych tuftsyny 237-242 i retro-tuftsyny 250-255	
1.2.3.	Synteza analogów kwasu mykofenolowego z pochodnymi tuftsyny i retro-tuftsyny	69
2.	Badania biologiczne.....	73
2.1.	Omówienie wyników aktywności immunosupresyjnej.....	73
2.1.1.	Oznaczenie aktywności cytotoksycznej badanych związków 199-211, 270-276 i 285-291 wobec linii komórkowych Jurkat i PBMC wykorzystując metodę MTT	74
	Aminokwasowe analogi MPA	75
	Peptydowe analogi MPA	78
2.1.2.	Oznaczenie aktywności antyproliferacyjnej badanych związków 199-211, 270-276 i 285-291 wobec linii komórkowych Jurkat i PBMC wykorzystując barwnik VPD450	80
	Aminokwasowe analogi MPA	80
	Peptydowe pochodne MPA.....	84
2.1.3.	Selekcja pochodnych MPA o najkorzystniejszych parametrach	87
2.1.4.	Oznaczenie aktywności antyproliferacyjnej związków 199-21, 273, 274, 285, 287 i 289 wobec komórek PBMC wykorzystując barwnik VPD450 w obecności GMP.....	89
2.1.5.	Oznaczenie szybkości zużywania wybranych związków przez komórki Jurkat z wykorzystaniem HPLC-MS	92
2.2.	Badania przeciwnowotworowe <i>in vitro</i> na liniach komórkowych czerniaka i neuroblastomy.....	93
2.2.1.	Wyznaczenie IC ₅₀ i analiza aktywności przeciwnowotworowej MPA oraz wybranych pochodnych aminokwasowych i peptydowych, za pomocą testu XTT	93
2.2.2.	Struktura vs aktywność biologiczna.....	97
2.3.	Badania mikrobiologiczne.....	97
2.3.1.	Wyznaczenie MIC i analiza aktywności przeciwbakteryjnej MPA i otrzymanych pochodnych za pomocą metody mikrorozcieńczeń w bulionie	98

2.3.2.	Struktura vs aktywność mikrobiologiczna	102
	CZEŚĆ EKSPERYMENTALNA.....	104
1.	Część syntetyczna	105
1.1.	Materiały stosowane podczas syntezy analogów MPA.....	105
1.2.	Synteza aminokwasowych analogów MPA w postaci estrów metylowych.....	105
1.2.1.	EDCI/DMAP.....	105
1.2.1.1.	Synteza estru metylowego <i>N</i> -mykofenoilo-L-asparaginy 199	106
1.2.1.2.	Synteza estru metylowego <i>N</i> -mykofenoilo-L-treoniny 200	106
1.2.1.3.	Synteza estru metylowego <i>N</i> -mykofenoilo-D-treoniny 201	107
1.2.1.4.	Synteza estru metylowego <i>N</i> -mykofenoilo-L-argininy 203	107
1.2.1.5.	Synteza estru metylowego <i>N</i> -mykofenoilo-D-argininy 204	107
1.2.2.	T3P/TEA	108
1.2.2.1.	Synteza estru metylowego <i>N</i> -mykofenoilo-L-izoleucyny 202	108
1.2.2.2.	Synteza estru metylowego <i>N</i> -mykofenoiloaminomalonianu 205	109
1.3.	Synteza aminokwasowych analogów kwasu mykofenolowego z wolną grupą karboksylową.....	109
1.3.1.	Synteza <i>N</i> -mykofenoilo-L-asparaginy 206	109
1.3.2.	Synteza <i>N</i> -mykofenoilo-L-treoniny 207	110
1.3.3.	Synteza <i>N</i> -mykofenoilo-D-treoniny 208	110
1.3.4.	Synteza <i>N</i> -mykofenoilo-L-izoleucyny 209	111
1.3.5.	Synteza <i>N</i> -mykofenoilo-L-argininy 210	111
1.3.6.	Synteza <i>N</i> -mykofenoilo-D-argininy 211	111
1.4.	Synteza peptydów.....	112
1.4.1.	Synteza pochodnych tuftsyny	112
1.4.1.1.	Tetrapeptyd Boc-Thr-Lys(Fmoc)-Pro-Arg(NO ₂)-OMe	112
1.4.1.2.	Deprotekcja osłony Boc	114
1.4.1.3.	Deprotekcja osłony Fmoc.....	114
1.4.2.	Pentapeptydy pochodne tuftsyny	114
1.4.2.1.	Metoda mieszanych bezwodników.....	114
1.4.2.2.	Procedura z wykorzystaniem EDCI	114
1.4.2.3.	Pentapeptydy	115
1.4.3.	Synteza pochodnych retro-tuftsyny.....	116
1.4.3.1.	Tetrapeptyd Boc- Arg(NO ₂)-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OMe.....	116
1.4.3.2.	Deprotekcja osłony Boc	118

1.4.3.3.	Deprotekcja osłony Fmoc.....	118
1.4.4.	Pentapeptydy pochodne retro-tuftsyny	118
1.4.4.1.	Metoda mieszanych bezwodników	118
1.4.4.2.	Procedura z wykorzystaniem EDCI	118
1.4.4.3.	Procedura z wykorzystaniem EEDQ.....	119
1.4.4.4.	Pentapeptydy	119
1.5.	Synteza peptydowych pochodnych MPA.....	120
1.5.1.	Synteza peptydowych pochodnych MPA zawierających w swojej strukturze analogi tuftsyny.....	120
1.5.1.1	Procedura z wykorzystaniem EDCI/DMAP	120
1.5.1.2.	Procedura z wykorzystaniem EEDQ.....	120
1.5.1.3.	Procedura z wykorzystaniem T3P.....	121
1.5.1.4.	Pochodne MPA i analogów tuftsyny 263-269	121
1.5.1.5.	Usunięcie osłony Fmoc z peptydowych analogów MPA zawierających tuftsynę.....	122
1.5.2.	Synteza peptydowych pochodnych MPA zawierających w swojej strukturze analogi retro-tuftsyny.....	126
1.5.2.1.	Procedura z wykorzystaniem EDCI×2/TEA×3	127
1.5.2.2.	Procedura z wykorzystaniem EDCI×5/TEA×2	127
1.5.2.3.	Procedura z wykorzystaniem EDCI/DMAP.....	127
1.5.2.4.	Procedura z wykorzystaniem EEDQ×2/Py×2	127
1.5.2.5.	Procedura z wykorzystaniem EEDQ×5/Py×5	128
1.5.2.6.	Procedura z wykorzystaniem T3P	128
1.5.2.7.	Pochodne MPA i analogów retro-tuftsyny 278-284.....	128
1.5.2.8.	Usunięcie osłony Fmoc z peptydowych analogów MPA zawierających retro-tuftsynę	130
2.	Część biologiczna	135
2.1.	Materiały stosowane w badaniach biologicznych	135
2.2.	Badania aktywności immunosupresyjnej	136
2.2.1.	Linie komórkowe	136
2.2.2.	Podłoża hodowlane	136
2.2.3.	Hodowla linii komórkowej Jurkat.....	136
2.2.3.1.	Pasażowanie linii komórkowej.....	136
2.2.3.2.	Rozmrażanie linii komórkowej	136

2.2.3.3.	Mrożenie linii komórkowej	136
2.2.4.	Izolacja komórek PBMC	136
2.2.5.	Przygotowanie rozcieńczeń analogów MPA	137
2.2.6.	Stosowane w badaniach testy	137
2.2.6.1.	Test kolorymetryczny MTT	137
2.2.6.2.	Test proliferacyjny z wykorzystaniem VPD450	138
2.2.6.3.	PBMC w obecności GMP	139
2.3.	Badania aktywności przeciwnowotworowej	139
2.3.1.	Linie komórkowe	139
2.3.1.1.	Czerniak Ab chomika Bomirskiego	139
2.3.1.2.	Czerniak A375 człowieka.....	139
2.3.1.3.	Neuroblastoma SHSY5Y człowieka	140
2.3.2.	Związki referencyjne.....	140
2.3.3.	Przygotowanie związków do testów	140
2.3.4.	Test cytotoksyczności XTT.....	140
2.4.	Badania aktywności przeciwmikrobiologicznej.....	140
2.4.1.	Szczepy bakteryjne.....	140
2.4.2.	Związki referencyjne.....	140
2.4.3.	Przygotowanie związków do testów	140
2.4.4.	Oznaczanie minimalnego stężenia hamującego (MIC).....	141
	PODSUMOWANIE.....	142
	SUMMARY.....	146
	Bibliografia	150
	Załącznik 1. Widmo ¹ H NMR związku MPA-L-Thr-OMe 200	169
	Załącznik 2. Widmo ¹³ C NMR związku MPA-L-Thr-OMe 200	170
	Załącznik 3. Widmo MS związku MPA-L-Thr-OMe 200	171
	Załącznik 4. Chromatogram związku MPA-L-Thr-OMe 200	172
	Załącznik 5. Widmo ¹ H NMR związku MPA-L-Ile-OMe 202	173
	Załącznik 6. Widmo ¹³ C NMR związku MPA-L-Ile-OMe 202	174
	Załącznik 7. Widmo MS związku MPA-L-Ile-OMe 202	175
	Załącznik 8. Chromatogram związku MPA-L-Ile-OMe 202	176
	Załącznik 9. Widmo ¹ H NMR związku MPA-L-Thr-OH 207	177
	Załącznik 10. Widmo ¹³ C NMR związku MPA-L-Thr-OH 207	178

Załącznik 11. Widmo MS związku MPA-L-Thr-OH 207	179
Załącznik 12. Chromatogram związku MPA-L-Thr-OH 207	180
Załącznik 13. Widmo ¹ H NMR związku MPA-L-Ile-OH 209	181
Załącznik 14. Widmo ¹³ C NMR związku MPA-L-Ile-OH 209	182
Załącznik 15. Widmo MS związku MPA-L-Ile-OH 209	183
Załącznik 16. Chromatogram związku MPA-L-Ile-OH 209	184
Załącznik 17. Widmo ¹ H NMR związku MPA-T-Gly 271	185
Załącznik 18. Widmo ¹³ C NMR związku MPA-T-Gly 271	186
Załącznik 19. Widmo COSY związku MPA-T-Gly 271	187
Załącznik 20. Widmo HMBC związku MPA-T-Gly 271	188
Załącznik 21. Widmo HSQC związku MPA-T-Gly 271	189
Załącznik 22. Widmo ROESY związku MPA-T-Gly 271	190
Załącznik 23. Widmo TOCSY związku MPA-T-Gly 271	191
Załącznik 26. Widmo MS związku MPA-T-Gly 271	192
Załącznik 27. Chromatogram związku MPA-T-Gly 271	193
Załącznik 28. Widmo ¹ H NMR związku MPA-RT 285	194
Załącznik 29. Widmo ¹³ C NMR związku MPA-RT 285	195
Załącznik 30. Widmo MS związku MPA-RT 285	196
Załącznik 31. Chromatogram związku MPA-RT 285	197
Załącznik 32. Widmo ¹ H NMR związku MPA-RT-Leu 290	198
Załącznik 33. Widmo ¹³ C NMR związku MPA-RT-Leu 290	199
Załącznik 34. Widmo COSY związku MPA-RT-Leu 290	200
Załącznik 35. Widmo HMBC związku MPA-RT-Leu 290	201
Załącznik 36. Widmo HSQC związku MPA-RT-Leu 290	202
Załącznik 37. Widmo ROESY związku MPA-RT-Leu 290	203
Załącznik 38. Widmo TOCSY związku MPA-RT-Leu 290	204
Załącznik 39. Widmo MS związku MPA-RT-Leu 290	205
Załącznik 40. Chromatogram związku MPA-RT-Leu 290	206

SPIS SKRÓTÓW

AcMPAG	- mykofenolan glukuronianu acetylu
AMP	- adenozy-no-5'-monofosforan
ATP	- adenozy-no-5'-trifosforan
AZA	- azatiopryna
AZT	- 3'-azydo-3'-deoksyty-mida, azydotymidyna
Boc	- <i>tert</i> -butoksykarbonyl
BOP	- heksafluorofosforan benzotriazolo-1-iloksy-tris(dimetyloamino)fosfoniowy
CCA	- kwas α -cyjano-4-hydroksycynamonowy
CHIKV	- chikunguna, choroba wirusowa przenoszona przez komary
CIA	- model reumatoidalnego zapalenia stawów
COESY	- spektroskopia korelacyjna (ang. C orrelation S pectroscopy)
COMU	- heksafluorofosforan 1-[1-cyjano-2-etoksy-2-oksoetylidenoaminooksy)dimetyloaminomorfolino]uroniowy
DC	- komórki dendrytyczne
DCC	- <i>N,N'</i> -dicykloheksylokarbodiimid
DEPBT	- 3-(dietoksyfosforyloksy)-1,2,3-benzotriazyna-4(3 <i>H</i>)-on
DHB	- kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy
DIC / DIPCDI	- diizopropylokarbodiimid
DMAD	- acetylenodikarboksylanu dimetylu
DMAP	- dimetyloaminopirydyna
DMEM	- podłoże hodowlane z wysoką zawartością glukozy
DMF	- <i>N,N</i> -dimetyloformamid
DPPA	- difenylofosforyloazydek



EC ₅₀	- stężenie hamujące (stężenie powodujące zahamowanie proliferacji 50% komórek w stosunku do kontroli)
EDCI	- chlorowodorek 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu
EDQM	- Europejska Dyrekcja ds. Jakości Leków (ang. E uropean D irectorate for the Q uality of M edicines)
EEDQ	- <i>N</i> -etoksykarbonylo-2-etoksy-1,2-dihydrochinolina
E-IMP-NAD	- kompleks enzym-IMP-NAD
EtOAc	- octan etylu
F	- test Fishera
FBS	- płodowa surowica wołowa (ang. F etal B ovine S erum)
FDA	- Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (ang. F ood and D rug A dministration)
Fmoc	- fluorenylo-9-metoksykarbonyl
GDP	- guanozyno-5'-difosforan
GMP	- guanozyno-5'-monofosforan
GTP	- guanozyno-5'-trifosforan
H5N1	- wirus ptasiej grypy
HCTU	- heksafluorofosforan 2-(6-dichloro-1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametyloamoniowy
HDAC	- deacetylaza histonowa
HDMC	- <i>N</i> -tlenek heksafluorofosforanu <i>N</i> -[(5-chloro-1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)dimetyloaminomorfolino]uronowego
HMBC	- heterojądrowa korelacja dalekiego zasięgu (ang. H eteronuclear M ultiple B ond C oherence)
HMPA	- heksametylofosforoamid
HOAt	- 1-hydroksy-7-azobenzotriazol
HOBt	- <i>N</i> -hydroksybenzotriazol
HOObt	- hydroksy-3,4-dihydro-4-okso-1,2,3-benzotriazyna
HOSu	- <i>N</i> -hydroksysukcynoimid
HPLC	- wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. H igh- P erformance L iquid C hromatography)
HSQC	- heterojądrowa korelacja sygnałów protonów (ang. H eteronuclear S ingle Q uantum C orrlation)

IC ₅₀	- stężenie hamujące (stężenie powodujące cytotoksyczność 50% komórek w stosunku do kontroli) (ang. Inhibitory Concentration)
IFN	- interferon
IL-1, 2, 4, 6, 10	- interleukina 1, 2, 4, 6, 10
IMP	- 5'-monofosforan inozyny
IMPDH	- dehydrogenaza inozyno-5'-monofosforanu
KDIGO	- (ang. Kidney Disease Improving Global Outcomes)
LAP	- aminopeptydaza leucynowa
LPS	- lipopolisacharydu
MAP	- wielokrotny peptyd antygenowy (ang. Multiple Antigen Peptide)
<i>m</i> -CPBA	- kwas <i>m</i> -chloronadbenzoesowy
MDCK	- komórki psiej nerki Madin Darby
MERS-CoV	- szczep koronawirusa powodujący ciężką infekcję dróg oddechowych i niewydolność nerek
MIC	- minimalne stężenie inbitujące (ang. Minimal Inhibitory Concentration)
MMF	- mykofenolan mofetylu
MPA	- kwas mykofenolowy
MPAG	- mykofenolan glukuronianu fenylu
MPS	- mykofenolan sodu
MS	- spektrometria mas
mTOR	- inhibitory sygnału proliferacji (ang. Mammalian Target Of Rapamycin)
MTT	- bromek 3-(4,5-dimetylo-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazolu
NAD	- dinukleotyd nikotynamidoadeninowy
NAD ⁺ /NADH	- dinukleotyd nikotynamidoadeninowy (forma ułeniona/forma zredukowana)
NB	- neuroblastoma
NBS	- <i>N</i> -bromosukcynoimid
NK	- komórki NK, naturalni zabójcy (ang. Natural Killers)
NMM	- <i>N</i> -metylomorfolina
NMR	- spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. Nuclear Magnetic Resonance)

Nrp-1	- neuropilina 1
p	- istotność statystyczna
PKPP	- fosforybozylpirofosforan
PPi	- nieorganiczny pirofosforan
SAR	- zależność struktura-aktywność
SARS-coV	- wirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego
SI	- współczynnik selektywności
T3P	- bezwodnik propylofosforanowy (ang. Propylphosphonic Anhydride)
TATU/HATU	- tetrafluoroboran/ heksafluorofosforan 2-(7-aza-1 <i>H</i> -benzotriazolo-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametyloamoniowy
TBTU/HBTU	- tetrafluoroboran/heksafluorofosforan <i>O</i> -benzotriazolo-1-yl- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametylomocznik
temp. pok.	- temperatura pokojowa
temp. top.	- temperatura topnienia
TFA	- kwas trifluorooctowy
TFFH	- heksafluorofosforan tetrametylofluoroformamidyniowy
THF	- tetrahydrofuran
TLC	- chromatografia cienkowarstwowa (ang. Thin Layer Chromatography)
TMEDA	- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametyletylenodiamina
TNF- α	- czynnik martwicy nowotworów (ang. Tumor Necrosis Factor)
TOCSY	- korelacyjna spektroskopia zupełna (ang. Total Correlation Spectroscopy)
VEGF	- czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (ang. Vascular Endothelial Growth Factor)
VPD450	- fioletowy barwnik proliferacyjny (ang. Violet Proliferation Dye)
XMP	- 5'-monofosforan ksantyny
XTT	- sól sodowa 2,3-bis(2-metoksy-4-nitro-5-sulfofenylo)-2 <i>H</i> -tetrazolo-5-karboksyanilidu

STRESZCZENIE

Kwas mykofenolowy (MPA) oraz jego dwie stosowane klinicznie pochodne: mykofenolan sodu (MPS, CellCept) i mykofenolan mofetylu (MMF, Myfortic) są jednymi z najczęściej używanych leków hamujących proliferację limfocytów. Immunosupresanty te stosowane są zwłaszcza w przypadku transplantacji narządów unaczynionych takich jak: wątroba, serce i nerki [1] [2] [3]. Kwas mykofenolowy znalazł również zastosowanie w leczeniu chorób autoimmunologicznych. MPA jest niekompetycyjnym i odwracalnym inhibitorem dehydrogenazy inozyno-5'-monofosforanu, głównie izoformy II, która obecna jest w aktywowanych limfocytach i komórkach nowotworowych [4]. Obok aktywności immunosupresyjnej, farmaceutyk wykazuje również właściwości przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe a także przeciwnowotworowe. Niestety stosowanie omawianych środków immunosupresyjnych niesie ze sobą ryzyko upośledzenia układu immunologicznego, co może się objawiać wieloma efektami ubocznymi (m.in.: infekcjami bakteryjnymi, grzybicznymi, wirusowymi oraz dolegliwościami układu pokarmowego, moczowopłciowego, krwionośnego czy nerwowego) [5]. Odpowiedzialnym za ten stan jest proces glukuronidacji kwasu mykofenolowego, w wyniku którego powstają dwa główne metabolity: farmakologicznie nie aktywny 7-*O*-glukuronid MPA (MPAG) oraz farmakologicznie aktywny acylowany glukuronid (AcMPAG) [6] [7]. Chcąc zwiększyć selektywność oraz zminimalizować działanie uboczne kwasu mykofenolowego, nieustannie podejmowane są próby modyfikacji struktury MPA, które pozwoliłyby na otrzymanie leku lepiej tolerowanego przez organizm.

W ramach realizacji swojej pracy doktorskiej zaprojektowałam i przeprowadziłam syntezę nowych, oryginalnych struktur aminokwasowych i oligopeptydowych analogów MPA. W celu otrzymania aminokwasowych pochodnych kwasu mykofenolowego utworzyłam wiązanie amidowe pomiędzy częścią MPA a estrami aminokwasów takimi jak: L-kwas asparaginowy, L-treonina, D-treonina, L-izoleucyna, L-arginina, D-arginina oraz kwas aminomalonowy. Do syntezy tego typu związków posłużyłam się odczynnikami kondensującymi tj. EDCI/DMAP oraz T3P/TEA. Następnie przeprowadziłam hydrolizę estrów metylowych aminokwasowych

pochodnych MPA, wykorzystując wodorotlenek litu. Kolejną grupę otrzymanych przeze mnie związków stanowiły oligopeptydowe koniugaty MPA. Pochodne te zawierały w swojej strukturze tetrapeptydy takie jak tuftsyna, retro-tuftsyna oraz ich modyfikacje powstałe w wyniku utworzenia wiązania izopeptydowego na grupie ϵ -aminowej lizyny, wykorzystując: glicynę, α -alaninę, β -alaninę, walinę, leucynę i izoleucynę. Syntezę peptydów: tuftsyny i retro-tuftsyny przeprowadziłam w oparciu o metodę mieszanych bezwodników opisaną przez Dzierzbicką i wsp. [8] [9] [10] wykorzystując chloromrówczan izobutyli i NMM. Do połączenia tetra- i pentapeptydów z cząsteczką MPA użyłam odczynników sprzęgających tj.: T3P/TEA (pochodne tuftsyny) i EDCI/DMAP (pochodne retro-tuftsyny). Struktury i czystość wszystkich otrzymanych przeze mnie związków potwierdziłam metodami: $^1\text{H NMR}$ $^{13}\text{C NMR}$, MS i MS-HPLC. Dodatkowo wybrane związki scharakteryzowałam za pomocą technik: COSY, HMBC, HSQC, ROESY i TOCSY.

W celu sprawdzenia właściwości immunosupresyjnych otrzymanych pochodnych przeprowadziłam badania biologiczne, obejmujące testy żywotności (MTT) oraz aktywności antyproliferacyjnej (VPD450, cytometria przepływowa). Badania te przeprowadziłam na limfoidalnej linii komórkowej T-Jurkat oraz mononuklearnych komórkach krwi obwodowej (PBMC) pochodzących od zdrowych dawców. Wykonane testy umożliwiły mi wyznaczenie wartości IC_{50} i EC_{50} oraz dalej współczynnika selektywności SI. Na podstawie wartości tego współczynnika byłam w stanie porównać stosunek cytotoksyczności do aktywności MPA vs stosunek cytotoksyczności do aktywności wszystkich badanych związków. Analiza tych danych umożliwiła wyselekcjonowanie związków (**200**, **201** i **285**) o najniższej toksyczności przy jednocześnie najwyższej aktywności antyproliferacyjnej. Przeprowadziłam także testy potwierdzające selektywność działania otrzymanych przeze mnie związków wobec IMPDH poprzez badanie aktywności antyproliferacyjnej (VPD450, cytometria przepływowa) wobec komórek PBMC z dodatkiem guanozyno-5'-monofosforanu. Wyniki tych badań umożliwiły stwierdzenie, że otrzymane przeze mnie związki wykazują taki sam mechanizm działania jak kwas mykofenolowy co potwierdza ich aktywność inhibującą wobec IMPDH.

Aktywność przeciwnowotworową kwasu mykofenolowego oraz kilku wybranych aminokwasowych **200**, **201**, **203**, **204**, **207**, **208**, **210** i **211** oraz peptydowych **270** i **285** analogów MPA oceniliśmy wobec komórek dwóch linii czerniaka amelanotycznego o różnym pochodzeniu: linia Ab czerniaka chomika Bomirskiego, linia A375 ludzkiego czerniaka oraz wobec komórek neuroblastomy SHSY5Y. Jako związki referencyjne użyliśmy dwóch chemoterapeutyków: dakarbazyny i cisplatyny. Zauważyliśmy wyższą aktywność MPA w stosunku do obu linii czerniaka amelanotycznego niż dakarbazyna oraz porównywalną aktywność MPA do cisplatyny w stosunku do komórek neuroblastomy SHSY5Y. Pochodne kwasu mykofenolowego z estrem metylowym treoniny **200** i **201** wykazały wyższą aktywność wobec linia Ab czerniaka chomika Bomirskiego niż dakarbazyna.

Sprawdziliśmy również działanie przeciwbakteryjne otrzymanych związków przeciw sześciu szczepom referencyjnym: *Staphylococcus aureus* MSSA ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300, *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978,

Escherichia coli ATCC 8739, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (ESBL), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 oraz trzem klinicznym: *Staphylococcus aureus* MSSA, *Klebsiella pneumoniae* ESBL+ i *Klebsiella pneumoniae* ESBL-. Pochodne **199**, **200**, **202**, **203**, **205**, **273**, **286** i **288** odznaczały się największą aktywnością przeciw *S. aureus*, z wyróżnieniem większej wrażliwości szczepu MSSA niż MRSA. W przypadku *K. pneumoniae* zwiększonym działaniem przeciwbakteryjnym charakteryzowały się związki **203**, **273**, **286** i **288** w porównaniu z macierzystym MPA oraz stosowanymi antybiotykami: kanamycyną i ampicyliną.

WSTĘP

Wszystkie organizmy żywe, od najbardziej prymitywnej bakterii, przez rośliny do człowieka, rozwinęły system obronny przeciw infekcjom. Ponad 150 lat temu ludzkość zadała sobie pytanie „Dlaczego nie zawsze umiera się z powodu infekcji?” [11]. Wszyscy ludzie codziennie narażeni są na działanie milionów potencjalnych patogenów, poprzez dotyk, połykanie czy wdychanie. Współcześnie wiadomo, że organizm wykształcił system reakcji opornościowo-obronnych na patogeny i inne substancje obce. Zdolność unikania infekcji zależy od układu immunologicznego (odpornościowego). Organizm narażony na patogeny wypracował nieswoisty/wrodzony system odpornościowy [12]. Za nieswoistą obronę odpowiadają czynniki komórkowe, takie jak monocyty, makrofagi, neutrofile, eozynofile, bazofile, komórki NK, komórki tuczne i cytokiny. Mechanizmy odporności nieswoistej mogą działać praktycznie natychmiast po kontakcie z antygenem i często wystarczają do eliminacji patogenu. Niemniej jednak, ich działanie nie jest tak precyzyjne jak w przypadku mechanizmów swoistych i nie zawsze daje możliwość usunięcia obcych antygenów. Ponadto odporność nieswoista nie może wytworzyć pamięci immunologicznej. Do elementów odporności adaptacyjnej (nabytej, swoistej) zaliczane są przeciwciała oraz limfocyty T i B. Na wytworzenie tego typu odporności potrzebne jest kilka dni, lecz mechanizmy raz uruchomione skutecznie zwalczają patogeny. Działanie jest ukierunkowane na antygeny charakterystyczne dla poszczególnych drobnoustrojów [12] [13] [14].

Proces modulacji układu immunologicznego nazywamy immunomodulacją, która polega na wzmacnianiu odporności oraz czynności samonaprawczych organizmu, ale także ich osłabieniu w razie nadmiernej reakcji immunologicznej [15]. Immunomodulatory jako substancje wywierające określony wpływ na system immunologiczny można podzielić na: środki: immunostymulujące (o działaniu pobudzającym) oraz środki immunosupresyjne (o działaniu tłumiącym).

Immunoterapia stosowana jest w leczeniu nowotworów oraz chorób autoimmunologicznych a także podczas transplantacji [16]. Immunoterapia nowotworowa polega na leczeniu chorób nowotworowych poprzez wzmacnianie

naturalnych mechanizmów obronnych organizmu w walce z rakiem. Terapia ta wykorzystuje substancje wytworzone przez organizm bądź w laboratorium w celu poprawy lub przywrócenia funkcji układu odpornościowego. Immunoterapia nowotworowa może działać przez zatrzymanie bądź spowolnienie wzrostu komórek rakowych, wyeliminowanie przerzutów komórek nowotworowych do innych organów lub wspomaganie układu odpornościowego do efektywniejszego działania i niszczenia komórek rakowych [13]. W przypadku chorób autoimmunologicznych układ odpornościowy atakuje i ostatecznie niszczy własne tkanki. Leczenie polega między innymi na stosowaniu leków immunosupresyjnych w celu zmniejszenia aktywności układu immunologicznego [14].

Transplantologia jest stosunkowo młodą dziedziną medycyny klinicznej zajmującą się problematyką chirurgicznego przeszczepiania komórek, tkanek i narządów. Pierwsza zakończona sukcesem operacja przeszczepienia narządu miała miejsce w 1954 roku kiedy to Murray, Merrill i Harrison w ramach przeprowadzonej izotransplantacji, dokonali transferu nerki między bliźniętami monozygotycznymi [17]. W Polsce powodzeniem zakończył się przeszczep wykonany w 1966 roku przez Nielubowicza oraz Orłowskiego [18]. Obecnie implantacje organów wykonywane są rutynowo, przede wszystkim u osób cierpiących na krańcową niewydolność takich narządów jak nerki, serce, wątroba, trzustka, płuca czy jelita [19] [20] [21] [22] [23]. Stosując transplantację komórek krwiotwórczych obecnych w szpiku, krwi obwodowej lub pępowinowej, istnieje możliwość wyleczenia białaczki [19] [24] [25]. Złożone przeszczepy wielotkankowe stosowane są podczas rozległych poparzeń czy uszkodzeń mechanicznych [19] [26] [27]. Z danych EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines) wynika, że w 2016 roku w Europie zostało przeszczepionych ponad 33 tysiące narządów [28]. Transplantacja stanowi często jedyną skuteczną formę terapii, ratującą bądź przedłużającą ludzkie życie, poprawiającą jego jakość oraz umożliwiającą powrót do pełnej sprawności. Jednak przeszczep allogeniczny wywołuje silną reakcję odpornościową – odrzucanie – w wyniku której odrzucany organ jest niszczone [2]. W proces odrzucenia zaangażowane są m. in. limfocyty T o fenotypie CD4+, CD8+, przeciwciała produkowane przez limfocyty T oraz inne prozapalne leukocyty [29] [30] [31]. Możemy wyróżnić odrzut nadostry, ostry i przewlekły, które różnią się między sobą czasem wystąpienia odpowiedzi immunologicznej. Odrzucanie nadostre pojawia się już kilka minut po operacji i wiąże się z usunięciem przeszczepu. Odrzucenie ostre pojawia się po upływie kilku tygodni od implantacji. Najtrudniejsze do opanowania jest odrzucenie przewlekłe, które ujawnia się kilka miesięcy od operacji i jest związane z wykształceniem oporności wobec przeszczepionego organu [31] [5] [19]. W tym przypadku kluczowe znaczenie ma terapia immunosupresyjna, która rozpoczyna się przed implantacją i kontynuuje po przeszczepie do końca życia. Stałą przyjętą zasadą jest kojarzenie ze sobą związków chemicznych o różnych mechanizmach działania immunosupresyjnego. Zazwyczaj jest to mieszanina leków np. związku z grupy glikokortykosteroidów (hamujący produkcję cytokin biorących udział w aktywacji komórek), inhibitor kalcyneuryny (lek łączący się z immunofiliną) oraz inhibitor proliferacji limfocytów [2]. Intencją takiego postępowania jest minimalizacja toksyczności oraz występujących działań niepożądanych. Podawane leki

immunosupresyjne, powinny być selektywne, aby zmniejszyć ryzyko nadmiernej immunosupresji, co może prowadzić do infekcji bakteryjnych, wirusowych, grzybiczych a także zwiększenia ryzyka nowotworzenia [32].

Dostępne na rynku farmaceutycznym związki o działaniu immunosupresyjnym można podzielić na trzy główne grupy: [1] [2] [3].

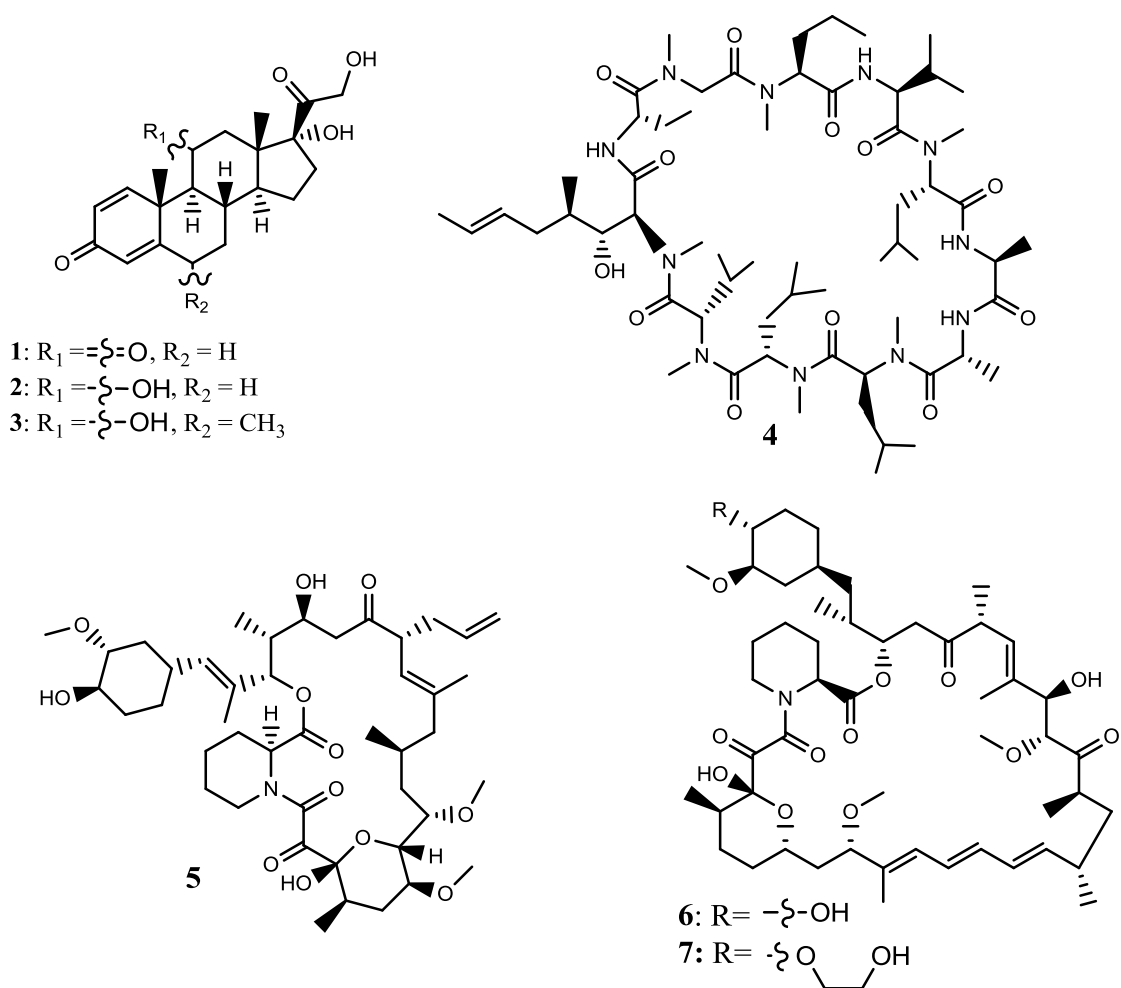
- leki zmniejszające produkcję cytokin

- Glikokortykosteroidy: prednizon **1** (*Encorton*), prednizolon **2** (*Encortolon*), metyloprednizolon **3** (*Advantan*)
- Inhibitory kalcyneuryny: cyklosporyna **4** (*Cyclaid*), takrolimus **5** (*Tacni*),
- Inhibitory mTOR: sirolimus **6** (*Rapamecyna*), ewerolimus **7** (*Certican*)

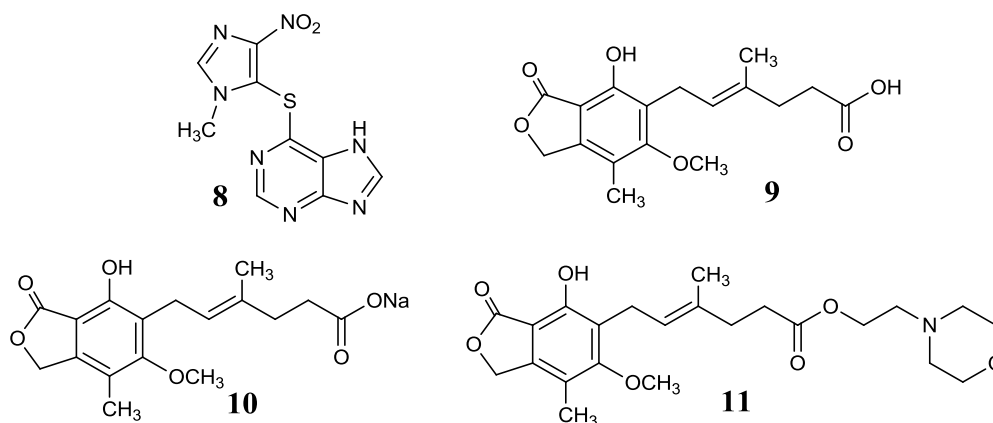
- preparaty białkowe

- Przeciwciała monoklonalne (anty CD25) skierowane wobec receptorów IL-2: daklizumab (*Zenapax*), bazyliksymab (*Simulect*)
- Przeciwciała lityczne, których funkcja polega na „zabijaniu” limfocytów: muromonab-CD3 (*Orthoclone*), rituximab (*Rituxan*), alemtuzumab (*Campath*)
- Poliklonalne surowice antylimfocytarne: tymoglobulina (*Thymoglobuline*)

- leki antyproliferacyjne: azatiopryna **8** (*Azathiopiryne*), kwas mykofenolowy **9**/sól sodowa kwasu mykofenolowego **10** (*Myfortic*), mykofenolan mofetylu **11** (*Cell Cept*)



Rysunek 1. Struktury stosowanych leków immunosupresyjnych zmniejszających produkcję cytokin **1-7**.



Rysunek 2. Struktury stosowanych leków antyproliferacyjnych **8-11**.

Do połowy lat 90-tych ubiegłego wieku wśród leków hamujących proliferację komórek, stosowana była głównie azatiopryna **8** (AZA). Znalazła ona zastosowanie w terapii po transplantacji nerki. Została ona jednak wyparta przez kwas mykofenolowy **9** oraz jego pochodne – MPS **10** i MMF **11**. Po zatwierdzeniu przez FDA w 1995 roku związki te stały się szybko jednymi z najczęściej stosowanych immunosupresantów, zwłaszcza w przypadku transplantacji narządów unaczynionych – wątroby, serca i nerek [1] [2] [3]. Ponadto kwas mykofenolowy **9** wykazuje nie tylko właściwości immunosupresyjne ale też przeciwnowotworowe, przeciwbakteryjne i przeciwwirusowe. Niestety stosowanie środków immunosupresyjnych niesie ze sobą konsekwencje. Najbardziej znamieny w skutkach jest brak selektywności, wywołujący ogólną supresję i upośledzenie układu immunologicznego. Tak obniżona odporność organizmu może nie chronić przed infekcjami bakteryjnymi, wirusowymi czy grzybicznymi. Zostaje również zwiększone prawdopodobieństwo nowotworzenia. [5]. Chcąc zminimalizować skutki uboczne, bardzo wiele ośrodków naukowych na świecie nieustannie podejmuje próby zaprojektowania nowych lub modyfikacji już istniejących leków, które byłyby lepiej tolerowane przez organizm.

Tematem niniejszej pracy jest projektowanie, synteza oraz badania mikrobiologiczne i biologiczne nowych związków opartych na strukturze pochodnych aminokwasowych i oligopeptydowych (w tym pochodnych tuftsyny) kwasu mykofenolowego **9**. Tuftsyna jako naturalny peptyd, powstaje w wyniku proteolizy łańcucha ciężkiego immunoglobulin klasy G i działa jako immunomodulator aktywując komórki układu odpornościowego i stymulując odporność nieswoistą. Dodatkowo peptyd ten wykazuje aktywność przeciwnowotworową, przeciwbakteryjną, przeciwgrzybiczą oraz przeciwwirusową [33]. W rozprawie przedstawiłam nowe, oryginalne struktury chemiczne otrzymanych pochodnych MPA oraz sposób ich połączenia, który powinien umożliwić zmniejszenie toksyczności ogólnej MPA a także zwiększyć jego aktywność immunosupresyjną, przeciwnowotworową poprzez działanie addytywne/synergistyczne reszt oligopeptydowych i cząsteczki kwasu mykofenolowego. Poprzez oddziaływanie fragmentu peptydowego z układem immunologicznym oraz blokowanie syntezy puryn przez MPA, co powoduje obumieranie limfocytów, możliwe jest zwiększenie specyficzności oraz efektywności nowych otrzymanych związków. Ponadto w pracy doktorskiej przedstawiam badania

mikrobiologiczne związku macierzystego MPA oraz otrzymanych pochodnych na kilku wybranych szczepach bakteryjnych.

Pomimo, iż do tej pory otrzymano szereg pochodnych kwasu mykofenolowego to nadal trwają poszukiwania nowych analogów, które mogą przybliżyć nas do otrzymania skutecznych leków, w tym immunosupresyjnych, przeciwnowotworowych czy przeciwbakteryjnych o ograniczonych działaniach ubocznych, nie podlegających eliminacji z komórki np. w wyniku działania mechanizmów oporności wielolekowej.

1. Kwas mykofenolowy

Kwas mykofenolowy (MPA) **9** (Rysunek 2) został wyizolowany po raz pierwszy 1893 roku jako naturalny, produkt metabolizmu grzybów z rodzaju *Penicillium*. [34] [35] [36]. Odkrycia kwasu mykofenolowego dokonał włoski lekarz Bartolomeo Gosio podczas badań nad etiologią pelagry [37]. Struktura MPA została określona wiele lat później przez Clutterbucka i Raistricka [38]. MPA zawiera układ ftalidowy, w którym pierścień aromatyczny podstawiony jest grupą hydroksylową, metylową, metoksyłową oraz sześciowęglowym łańcuchem z wiązaniem podwójnym o konfiguracji *trans* i wolną grupą karboksylową (Rysunek 2) [38].

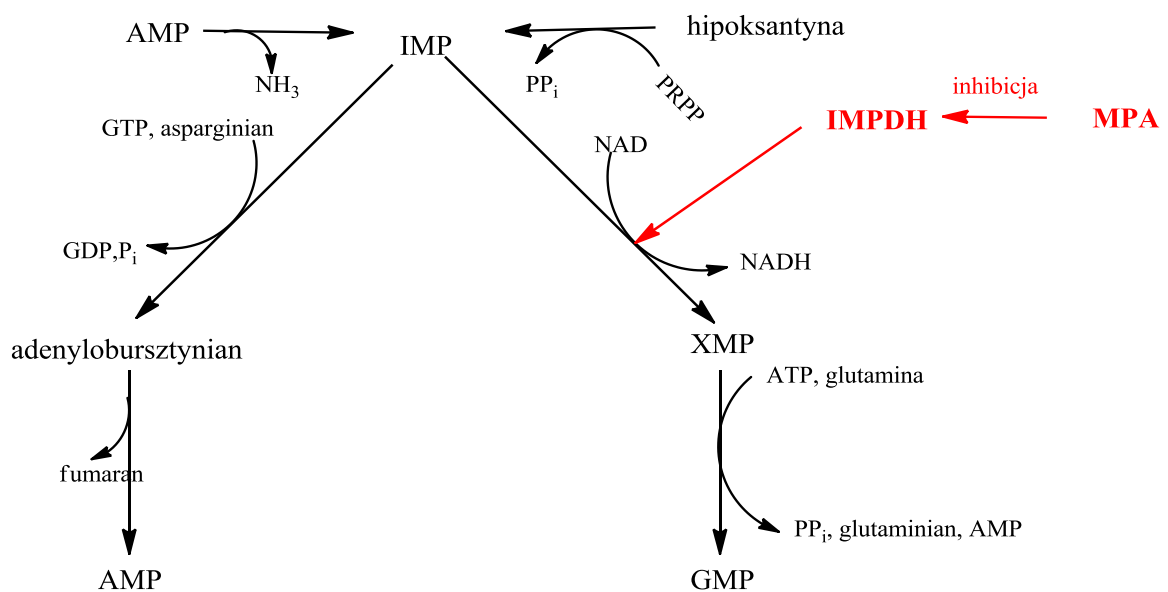
Kwas mykofenolowy wykazuje szerokie spektrum aktywności biologicznej [4]. MPA w medycynie zasłynął jako lek immunosupresyjny, hamujący proliferację limfocytów T. Stosowany jest zarówno podczas ostrego jak i przewlekłego odrzutu przeszczepu oraz należy do grupy najczęściej przepisywanych immunosupresantów [39] [40] [41] [4]. W wytycznych KDIGO (Kidney Disease. Improving Global Outcomes) 2009 roku zaleca się aby lekiem pierwszego wyboru z medykamentów antyproliferacyjnych były mykofenolany [42].

1.1. MPA jako inhibitor IMPDH

Dehydrogenaza inozyno-5'-monofosforanu jest enzymem należącym do grupy oksydoreduktaz. Ponieważ katalizuje on kluczowy moment biosyntezy *de novo* nukleotydów purynowych, jest on celem molekularnym dla leków immunosupresyjnych, do których zaliczany jest kwas mykofenolowy. Biosynteza nukleotydów purynowych odgrywa istotną rolę w proliferacji limfocytów [43]. Podczas nadmiernego namnażania się limfocytów T i B, co jest charakterystyczne dla zaburzeń układu immunologicznego, dochodzi do zwiększenia aktywności IMPDH, powodując otrzymanie większej ilości nukleotydów guaninowych [44]. Natomiast w wyniku zahamowania aktywności IMPDH zmniejsza się ilość nukleotydów guaninowych, powodując zmniejszenie ilości nukleotydów adeninowych. Sytuacja ta jest konsekwencją dwustopniowej przemiany monofosforanu inozyny (IMP) w adenozyno-5'-monofosforan (AMP), w której guanozyno-5'-trifosforan pełni rolę kofaktora

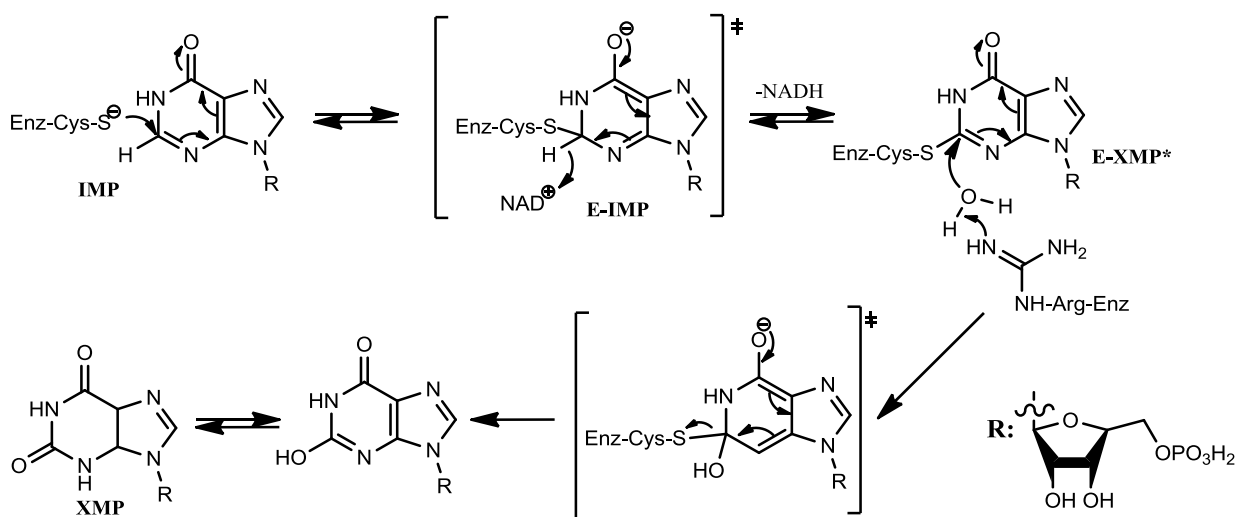
(Schemat 1). W wyniku zmniejszenia ilości nukleotydów dochodzi do zaburzenia syntezy DNA i RNA co prowadzi do apoptozy [4].

Dehydrogenaza inozyno-5'-monofosforanu jest homotetramerem o masie cząsteczkowej 56 kDa i zbudowanym z 514 reszt aminokwasowych [45] [46]. Enzym występuje w postaci dwóch izoform –I oraz –II posiadających w 84% identyczną sekwencję [46] [47]. Izoforma I występuje w prawidłowych komórkach, kontrolując takie procesy jak angiogeneza, regulacja translacji czy wiązanie DNA. Wybiórcza inhibicja aktywności izoformy I jest wystarczająca do zatrzymania wzrostu komórek śródbłonna, co skutkuje hamowaniem unaczynienia nowotworu [48]. Natomiast izoforma II dominuje w komórkach gwałtownie proliferujących takich jak aktywowane limfocyty [49], komórki nowotworowe [50] czy zainfekowane wirusem [51]. Kwas mykofenolowy skutecznie hamuje aktywność obu izoenzymów z pięciokrotną przewagą inhibicji izoformy drugiej [4].



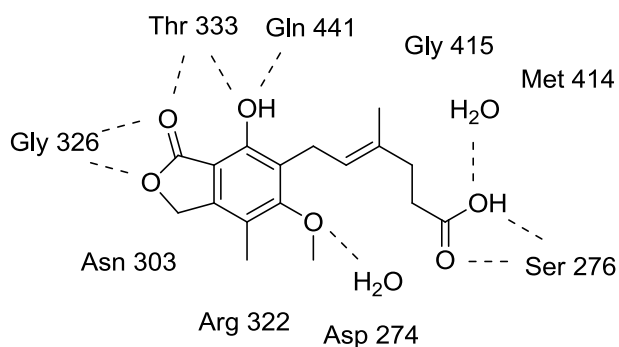
Schemat 1. Ścieżki biosyntezy nukleotydów purynowych [40].

Dehydrogenaza inozyno-5'-monofosforanu katalizuje NAD-zależną reakcję utleniania IMP do XMP, który przekształcany jest w GMP z wykorzystaniem glutaminy jako donora grupy aminowej. Katalizowana przez IMPDH reakcja rozpoczyna się nukleofilowym atakiem siarki, należącym do Cys331 z centrum aktywnego enzymu na pozycję C2 pierścienia purynowego inozyno-5'-monofosforanu w wyniku czego powstaje kowalencyjny produkt pośredni E-IMP. Następnie w wyniku przeniesienia protonu E-IMP przekształca się w E-XMP*, który ulega hydrolizie (Schemat 2). Etapem decydującym o szybkości reakcji jest odłączenie XMP [43] [52] [53].



Schemat 2. Mechanizm reakcji katalizowanej przez IMPDH [38].

Analizując struktury krystalograficzne stwierdzono, że MPA wiąże się z wcześniej utworzonym kompleksem E-IMP-NAD⁺, a dokładniej do jego subdomeny N oraz części subdomeny P. Ponadto pomiędzy cząsteczką MPA a enzymem IMPDH występują liczne wiązania wodorowe i interakcje *Van der Waalsa*. Atomy tlenu pierścienia laktonowego tworzą wiązania wodorowe z Thr333 i Gly326 należącymi do enzymu. Grupa fenolowa oddziałuje z Thr 333 i Gln 441. Konfiguracja *trans* wiązania podwójnego w łańcuchu bocznym MPA umożliwia interakcje grupy karboksylowej z Ser 276 [52] [43] (Rysunek 3). W rezultacie modyfikacje tej grupy polarnej stanowią jedną z najbardziej obiecujących zmian w celu otrzymania nowych analogów MPA o ulepszonych właściwościach terapeutycznych [54] [55].



Rysunek 3. Intereakcje MPA 9 z enzymem IMPDH [55].

Kwas mykofenolowy jako inhibitor IMPDH powoduje redukcję puli nukleotydów guaninowych, głównie GTP w komórkach [56]. Skutkuje to: zatrzymaniem cyklu komórkowego w fazie G1, zahamowaniem proliferacji limfocytów oraz dojrzewania komórek dendrytycznych, zahamowaniem produkcji przeciwciał stymulowanych mitogenami i antygenami, indukcję apoptozy aktywowanych limfocytów T. Następuje również inhibicja proliferacji limfocytów T oraz ich migracji do przeszczepu [57] [58] [56]. Dzięki wyczerpaniu nukleotydów guanozyny dochodzi do zmniejszenia możliwości odrzucenia organu po przeszczepie.

1.2. Otrzymywanie MPA

Kwas mykofenolowy może być otrzymywany na drodze procesów biotechnologicznych, wykorzystujących namnażanie komórek mikroorganizmów produkujących MPA a także na drodze syntezy chemicznej. Druga z wymienionych metod prowadzi nie tylko do otrzymania samego kwasu mykofenolowego, ale również pozwala na wprowadzanie modyfikacji w strukturze omawianego farmaceutyku.

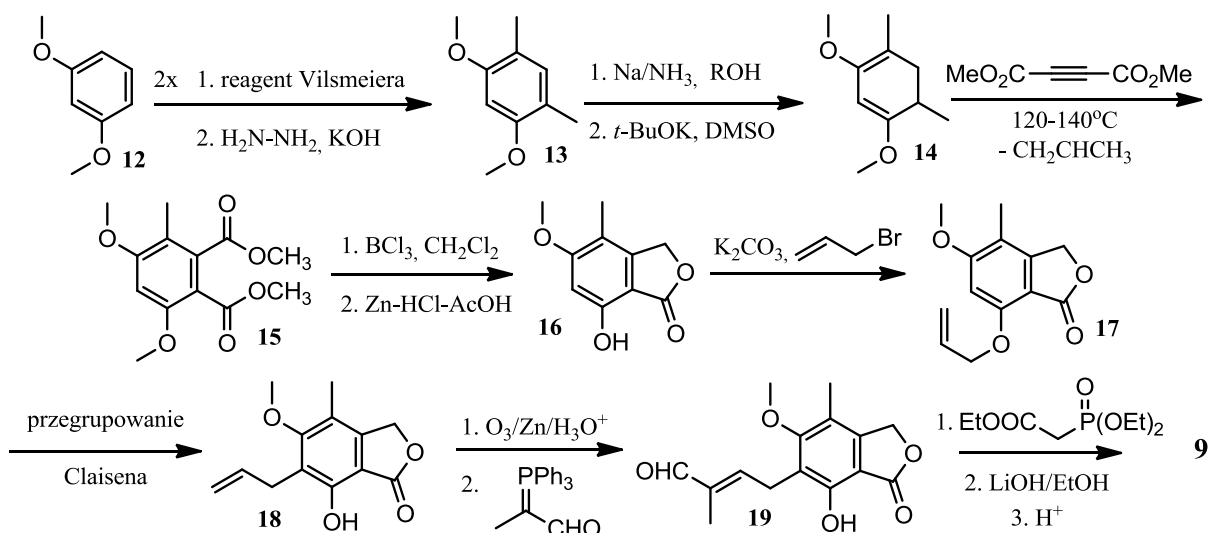
1.2.1. Biosynteza MPA

Kwas mykofenolowy może być otrzymywany jako metabolit grzybów z rodzaju *Penicillium*, wyróżnia się: *P. brevicompactum*, *P. raqneforti* oraz *P. stoloniferum* [34] [35] [36]. MPA może być również produkowany przez inne rodzaje szczepów takie jak: *Byssochlamys nivea* [34]. Izolowane są również naturalne analogi MPA z szczepów grzybów *Penicillium SOF07* [59] oraz z *Laetiporus sulphureu* [60]. Biosynteza MPA obejmuje dwa podstawowe szlaki charakterystyczne dla metabolitów: poliketydowy (dający początek układowi ftalidowemu) oraz izoprenoidowy (alifatyczny łańcuch boczny MPA) [61].

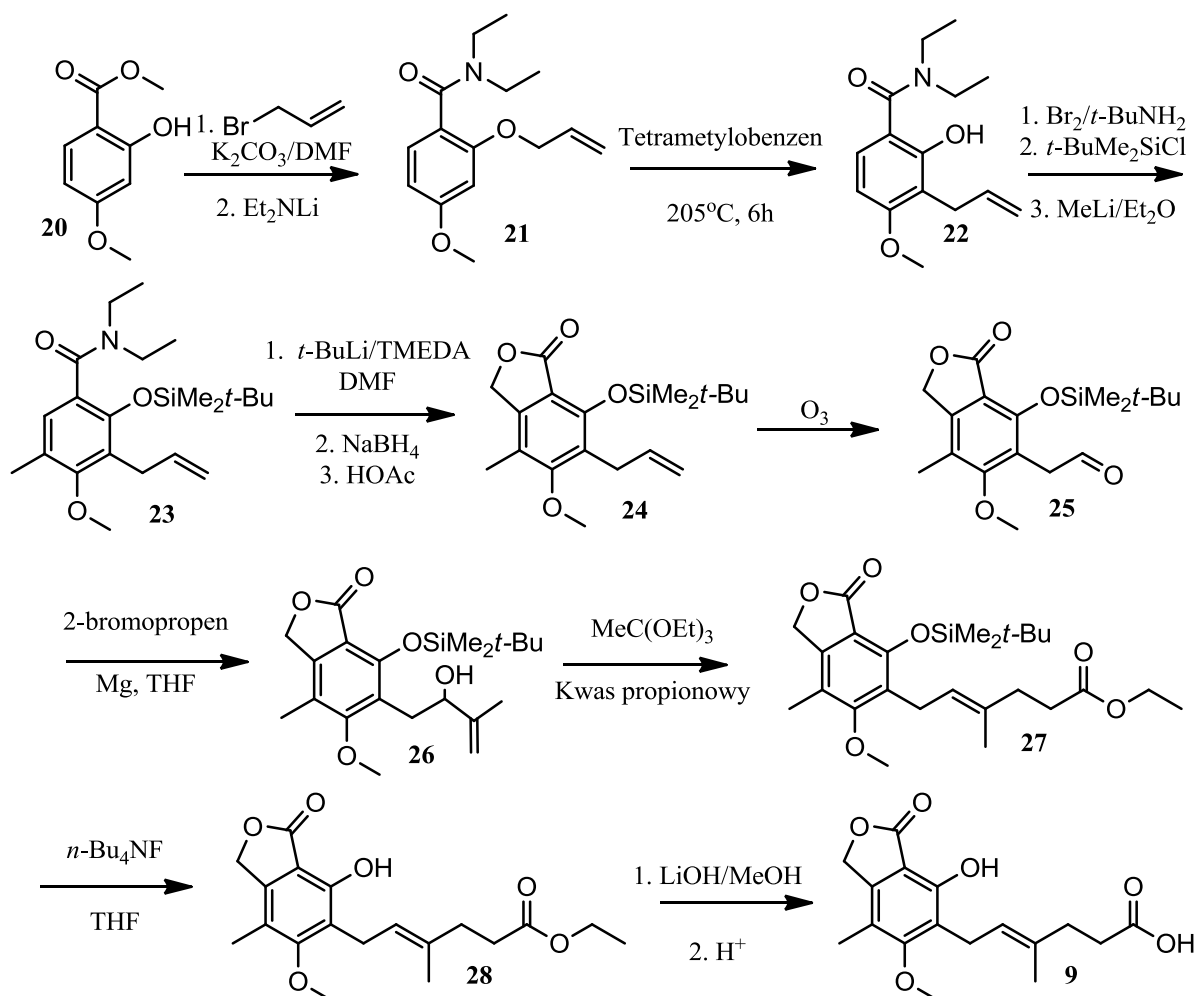
1.2.2. Synteza chemiczna MPA

Synteza kwasu mykofenolowego ma przewagę nad biosyntezą, ze względu na umożliwianie korzystnych modyfikacji w strukturze MPA. Opracowanie metody chemicznej, (która mogłaby być stosowana w przemyśle) opisywanego farmaceutyku nie było łatwe ze względu na jego skomplikowaną strukturę. W celu jak największego obniżenia kosztów stosuje się proste, komercyjnie dostępne substraty, jednak synteza kwasu mykofenolowego jest bardzo pracochłonna i żmudna [62] [4]. W literaturze chemicznej do tej pory opisanych zostało już wiele metod syntezy MPA m.in. syntezy: Bircha i Wrighta [63], Canonica [64], Danheisera [65], Pattersona [66], de la Cruza [67], Ple [68] oraz Covarrubiasa-Zuninga [69] [70].

W laboratorium kwas mykofenolowy po raz pierwszy otrzymali Birch i Wright w 1969 roku [63]. Schemat 3 przedstawia opracowaną przez nich ścieżkę syntetyczną. Wychodząc z eteru dimetylowego rezorcynolu **12** pierwszy etap stanowi reakcja formylowania Vilsmeiera-Haacka oraz redukcja Wolffa-Kiznera. Kolejno związek **13** zostaje poddany reakcji Bircha, w której jako reduktor wykorzystano sól w ciekłym amoniaku, otrzymując dihydropochodną, która potraktowana *tert*-butanolanem potasu w DMSO izomeryzuje tworząc związek **14**. Najważniejszym etapem jest cykloaddycja Aldera-Rickerta acetylenodikarboksylanu dimetylu (DMAD) z 1,3-dimetoksy-4,6-dimetylcykloheksa-1,3-dienem **14** prowadząca do estrowej pochodnej kwasu ftalowego **15**. Następne etapy polegają na uformowaniu układu ftalidowego **16**: redukcja jednej z grup estrowych do alkoholu wykorzystując trichlorek boru i następcza cyklizacja. Kolejny etap to *O*-alkilowanie związku **16** za pomocą bromku allilu i przegrupowania Claisena eteru **17** do fenolu **18**. Następny etap to ozonoliza związku **18** i reakcja Wittiga oraz reakcji Hornera-Wadswortha-Emmons, karbonylowego produktu ozonolizy, prowadząca ostatecznie do estru kwasu mykofenolowego. Ostatni etap tej syntezy to zasadowa hydroliza prowadząca do MPA **9** [63].



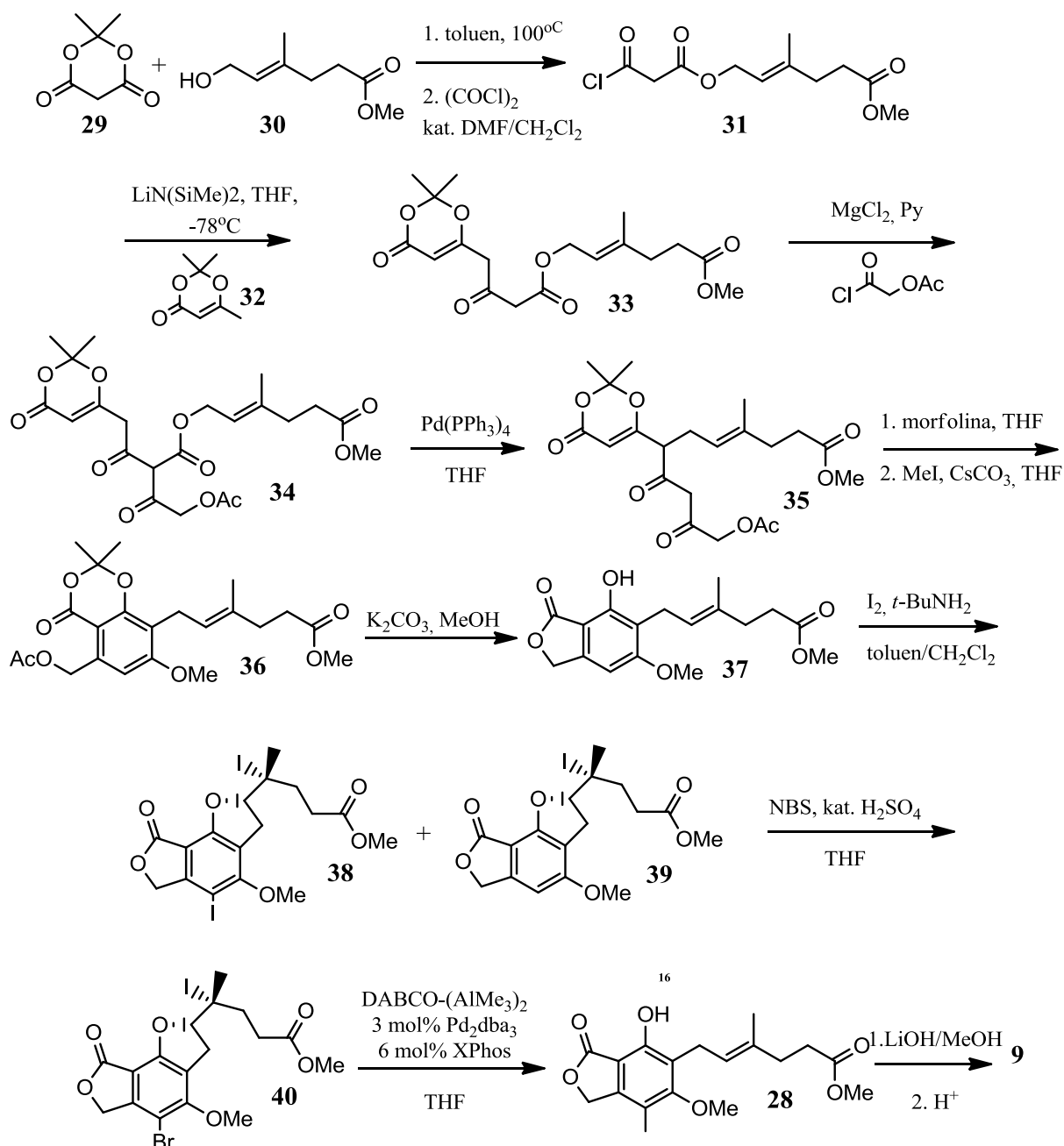
Jedną z najbardziej popularnych metod otrzymywania MPA jest synteza Pattersona (Schemat 4) [66]. W syntezie tej 2-hydroksy-4-metoksybenzoesan metylu **20** traktowany bromkiem allilu wobec K_2CO_3 daje produkt alkilowany, który traktowany Et_2NLi daje *N,N*-dimetylo-4-metoksy-2-(prop-2-enylo)benzamid **21**. Następnie w wyniku przegrupowania Claisena związek **21** przekształca się w fenol **22**. Reakcja prowadzona jest w tetrametylobenzenie. W kolejnym etapie przeprowadza się bromowanie tego związku a następnie metylowanie poprzedzone osłonięciem grupy hydroksylowej. Otrzymany związek **23** formyluje się za pomocą dimetyloformamidu, a następnie redukuje do alkoholu przy użyciu hydroboranu sodu. Cyklizacja związku **23** katalizowana przez kwas octowy prowadzi do **24**, który następnie poddano ozonolizie otrzymując aldehyd **25**. Następnie za pomocą bromku 2-propylenomagnezu związek **25** przekształcono w alkohol allilowy **26**. W wyniku przegrupowania [3,3]-sigmatropowego otrzymano alken o konfiguracji *trans* **27**, który poddany deprotekcji i zasadowej hydrolizie prowadzi do otrzymania kwasu mykofenolowego **9** [66].



Schemat 4. Synteza MPA zaproponowana przez Pattersona [66].

W naszej grupie badawczej opracowaliśmy modyfikacje wyżej wymienionej syntezy. Wykorzystaliśmy tanie i powszechnie dostępne rozpuszczalniki takie jak: tetralina, nitrobenzen czy 3,4-dimetylochlobenzen jako rozpuszczalniki do przeprowadzenia reakcji przegrupowania Claisena (**21** do **22**), co pozwoliło na podwyższenie wydajności tego etapu z 15% (procedura Pattersona z dostępnym izomerem 1,2,4,5-tetrametylobenzenu jako rozpuszczalnikiem) do 73% w przypadku tetraliny, 72% dla nitrobenzenu i 56% dla 3,4-dimetylochlobenzenu [71].

Chcąc zastąpić reakcję ozonolizy w syntezie zaproponowanej przez Pattersona spróbowano wykorzystać utlenienie alkenu **24** za pomocą *m*-CPBA w CH_2Cl_2 . Podobną procedurę wykorzystał Ple i wsp. [68]. Reakcja przebiegała z 80% wydajnością i prowadziła do otrzymania epoksydu. Niestety epoksyd okazał się na tyle stabilny, że nie udało się go poddać dalszej konwersji za pomocą $NaIO_4$ do pożądanego aldehydu. W związku z tym spróbowano poddać alken utlenianiu za pomocą nadmanganianu potasu i nadjodanu sodu. W wyniku tak przeprowadzonej reakcji otrzymano aldehyd **25** z 73% wydajnością [71].



Schemat 5. Synteza MPA zaproponowana przez Brookesa [72].

Najnowszą z metod otrzymywania MPA jest synteza opisana przez Brookesa i wsp. w 2013 roku (Schemat 5) [72]. W reakcji kwasu Meldruma **29** z estrem metylowym kwasu 6-hydroksy-4-metyloheks-4-enowego **30** otrzymano pochodną kwasu malonowego, która następnie traktowana chlorkiem oksalilu w DMF prowadzi do chlorku kwasowego **31**. W następnym etapie związek **31** w reakcji z solą litową dioksynonu **32** daje ester **33**. Kolejnym krokiem jest reakcja estru **33** z chlorkiem acetoksyacetylu, w wyniku której powstaje związek **34**. Następnym etapem są reakcje dekarboksylacji (katalizowana palladem) i alkenylacji, które to zachodzą regioselektywnie i prowadzą do diketodioksanonu **35** [73]. Związek **35** traktowany morfoliną w tetrahydrofuranie a następnie jodkiem metylu wobec węglanu cezu w THF prowadzi do pochodnej **36**, która pod wpływem węglanu potasu w metanolu daje pochodną **37**. W dalszych etapach następuje bromowanie i metylowanie w pozycji 4

pierścienia benzenowego. W tym celu zabezpieczono wiązanie podwójne związku **37** w reakcji z jodem i *tert*-butyloaminą, otrzymując mieszaninę diastereoizomerów **38** i **39**. Otrzymany jodoeter **39** jest bromowany za pomocą NBS w obecności kwasu siarkowego dając związek **40**, który jest metylowany kompleksem DIBACO-(AlMe₃)₂. Otrzymany mykofenolan metylu **28** poddano hydrolizie monohydratem wodorotlenku litu otrzymując MPA **9** [72].

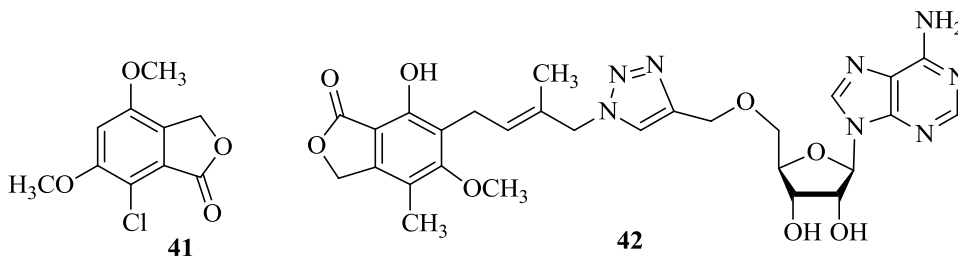
1.3. Właściwości biologiczne MPA i jego analogów

Jak już wcześniej wspomniałam kwas mykofenolowy charakteryzuje się szerokim spektrum aktywności biologicznej, której mechanizm polega na inhibicji enzymu IMPDH. W poniższych podrozdziałach przedstawiam najważniejsze właściwości MPA, a także jego analogów.

1.3.1. Działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybowe

MPA to jeden z najwcześniej poznanych związków o działaniu antybiotycznym. Przyczyną zainteresowania i wyizolowania kwasu mykofenolowego było odkrycie, że szczep grzyba *Penicillium brevicompactum* produkuje materiał hamujący wzrost *Staphylococcus aureus* (gronkowiec złocisty). Teraz już wiadomo, że aktywnym związkiem odpowiedzialnym za inhibicję gronkowca był MPA. Co więcej zauważono, że wyizolowany metabolit grzybowy wykazuje aktywność przeciwbakteryjną przeciwko *anthrax bacterium* (laseczkom wąglika) [37] [74].

Znacznie później w 1968 roku stwierdzono, że MPA wykazuje właściwości przeciwgrzybowe w stosunku do *Cryptococcus neoformans* (grzybica, atakująca ośrodkowy układ nerwowy, płuca, skórę i tkankę podskórną) i *Blastomyces dermatitidis* (drożdżyca, choroba Gilchrista). Zauważono również aktywność względem kilku gatunków *Trichophyton* (grzybica skóry, paznokci itd.) [37].



Rysunek 4. Struktura 7-chloro-4,6-dimetoksy-1(3*H*)-izobenzofuranu **41** i koniugatu MPA z dinukleotydem nikotynoamidoadeninowym (NAD) **42**.

Również, niektóre pochodne MPA odznaczają się aktywnością przeciwdrobnoustrojową. Związek 7-chloro-4,6-dimetoksy-1(3*H*)-izobenzofuran **41** (Rysunek 4) wyizolowany z hodowli grzyba *Leucoagaricus carneifolia* wykazywał selektywną aktywność przeciw *Botrytis cinerea* (gronkowiec szary) z minimalnym stężeniem zahamowania wzrostu (MIC) wynoszącym 20 µg/ml [75].

Pankiewicz i wsp. w 2014 roku otrzymali szereg koniugatów MPA z dinukleotydem nikotynoamidoadeninowym (NAD), z pośród których np. związek **42** (Rysunek 4), charakteryzował się aktywnością antibakteryjną w stosunku do *Mycobacterium tuberculosis* (prątka gruźlicy) (*K*_i wynoszące 1,5-2,2 µM) [76].

1.3.2. Działanie przeciwwirusowe

W ostatnich latach stwierdzono działanie antywirusowe kwasu mykofenolowego, polegające na hamowaniu replikacji niektórych wirusów *in vitro* i potęgowaniu efektu inhibicji guanozynowych pochodnych leków takich jak: acyklowir, penciklowir i ganciklowir. Ponadto kwas mykofenolowy może również wspomagać leczenie ludzkiego wirusa niedoboru odporności [77]. MPA i rybawiryna, (oba inhibitory IMPDH) wzmacniają również aktywność, analogów guanino- i diaminopurynowych nukleozydów, przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu B [78]. Połączenie również dwóch inhibitorów SARS-coV (wirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego): 6-merkaptopuryna (6MP) i 6-tioguanina (6TG) z lekiem immunosupresyjnym – kwasem mykofenolowym pozwoliło na skuteczne zahamowanie koranowirusa MERS-CoV (nowy szczep koranowirusa powodujący ciężką infekcję dróg oddechowych i niewydolność nerek) [79].

Ponadto MPA wykazuje aktywność antywirusową przeciwko np.: wirusowi Denge (choroba przenoszona przez komary) [80], reowirusom ptasim [77], rotawirusom (infekcje enterocytów jelita cienkiego będącymi przyczyną zapalenia żołądka i jelit u dzieci) [81] oraz chikunguny (CHIKV) (choroba wirusowa przenoszona przez komary) [82]. Natomiast mykofenolan mofetylu poprzez swoje supresyjne działanie na IMPDH wykazał inhibicję replikacji ptasiej grypy H5N1 na linii komórkowej MDCK (komórki psiej nerki Madin Darby) oraz myszy [83].

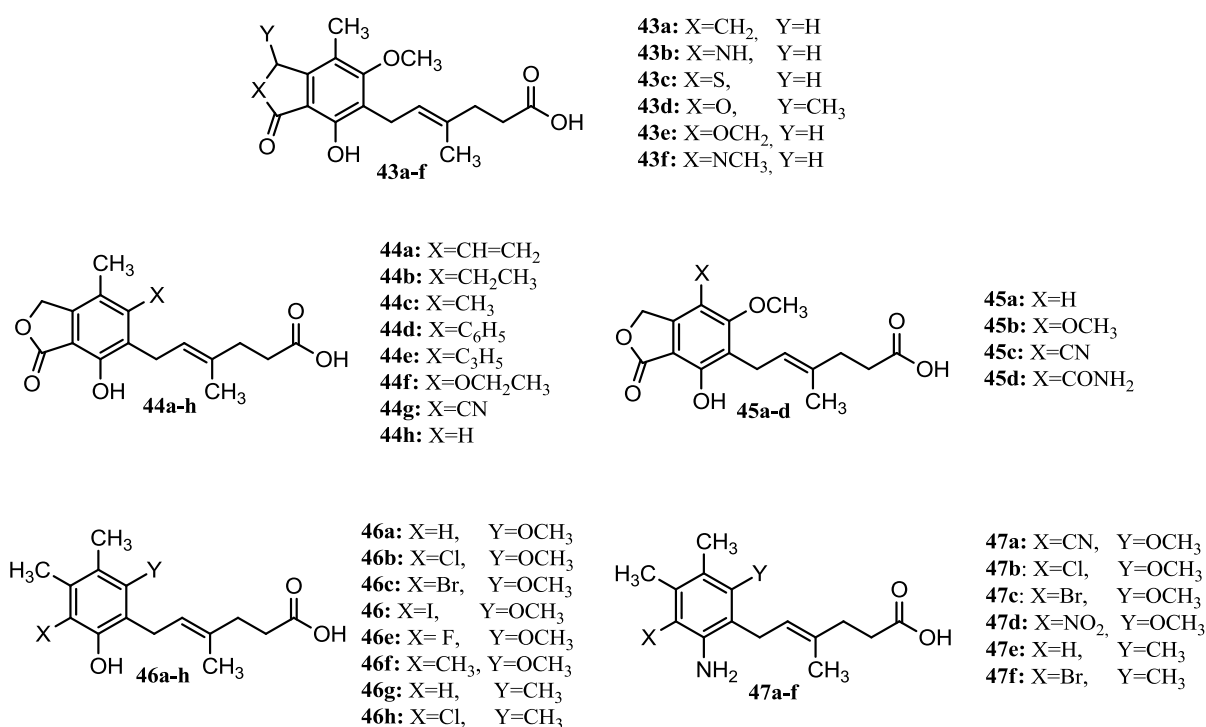
1.3.3. Działanie przeciwnowotworowe i immunosupresyjne

Pierwsze wzmianki na temat działania immunosupresyjnego kwasu mykofenolowego pojawiły się w 1969 roku. Planterose doniósł o działaniu immunosupresyjnym tego związku w przypadku mięsaka mysiego [84]. Tego samego roku Mitsui i Suzuki zaobserwowali, że MPA zmniejsza reakcję immunologiczną u myszy, którym podano owcze eryocyty [85]. Dalsze testy przeprowadzone na szczurach ujawniły, że MPA silnie hamuje reakcje ostrego jak i przewlekłego odrzucania przeszczepu serca [86].

Obecnie MPA stosowany jest jako środek immunosupresyjny. Jednak ze względu na fakt, że jest on silnym inhibitorem IMPDH głównie izoformy II, która znajduje się oprócz aktywowanych limfocytów również w komórkach nowotworowych, lek mógłby znaleźć również potencjalnie zastosowanie jako chemoterapeutyk. Niestety jego niekorzystny metabolizm, który dezaktywuje farmaceutyk znacznie ogranicza wykorzystanie jego właściwości przeciwnowotworowych [87].

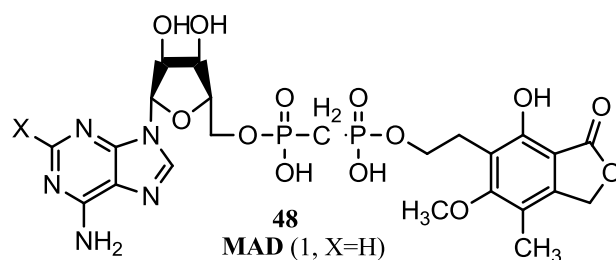
Do tej pory przeprowadzano różne modyfikacje pierścienia laktonowego **43a-f** i aromatycznego **44a-h**, **45a-d** MPA (Rysunek 5). Jednak wszystkie utworzone pochodne okazały się słabszymi inhibitorami IMPDH II w porównaniu z opisywanym związkiem macierzystym. Jedynie zastąpienie grupy metoksylowej jednostką winylową **44a**, etylową **44b** czy metylową **44c** prowadziła do otrzymania związku o podobnej bądź wyższej aktywności w stosunku do MPA. Tworzono monocykliczne fenole **46a-h** z których chlorofenolowa pochodna **46b** okazała się najaktywniejsza inhibitorem enzymu IMPDH. Wprowadzenie w miejsce grupy fenolowej – funkcję aminowa nie przyniosło korzystnych rezultatów. Monocykliczne aminy **47a-f** charakteryzowały się

30-krotnym spadkiem aktywności biologicznej [88]. W 2010 roku zespół Mitsuhashiego [89] ustalił, że grupa hydroksylowa, jak również metylowa w pierścieniu aromatycznym oraz wiązanie *trans* w łańcuchu bocznym jest niezbędne do zachowania aktywności biologicznej kwasu mykofenolowego. Grupy te wchodzi w interakcje z aminokwasami należącymi do IMPDH (Rysunek 3), a wiązanie *trans* powoduje odpowiednie ułożenie grupy karboksylowej. Obecnie większość projektowanych pochodnych kwasu mykofenolowego opiera się na modyfikacjach w sześciowęglowym łańcuchu bocznym, pozostawiając ugrupowanie ftalidowe nienaruszone [4]. Wiązanie wodorowe pomiędzy grupą karboksylową MPA a Ser276 należącą do IMPDH jest jedną z ważniejszych interakcji w kompleksie MPA-IMPDH. Badania potwierdzają, że modyfikacje tej polarnej grupy na końcu łańcucha MPA są najbardziej znaczące podczas projektowania nowych analogów kwasu mykofenolowego [62].



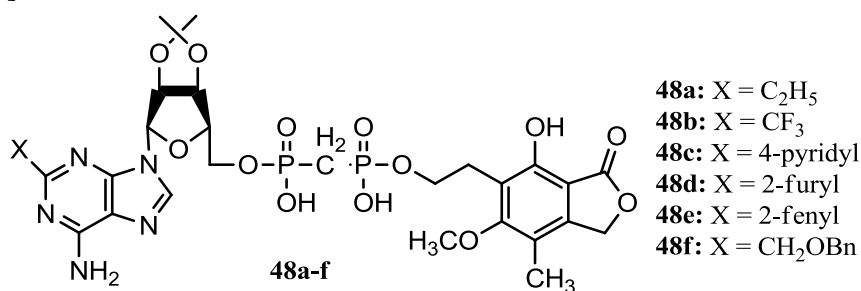
Rysunek 5. Modyfikacje wprowadzane do struktury MPA **9**: modyfikacje w pierścieniu laktonowym **43a-f**, aromatycznym **44a-h** i **45a-d**, monocykliczne fonole **46a-h** oraz monocykliczne aminy **47a-f** [69].

W 2002 roku Pankiewicz i wsp. opisali nowy inhibitor (koniugat kwasu mykofenolowego i rybonukleozydu) MAD **48**, który okazał się interesującym związkiem do dalszej modyfikacji jako aktywny, selektywny i mniej toksyczny inhibitor IMPDH, odporny na glukuronidację pomimo swojej słabszej aktywności od MPA **9** [90].



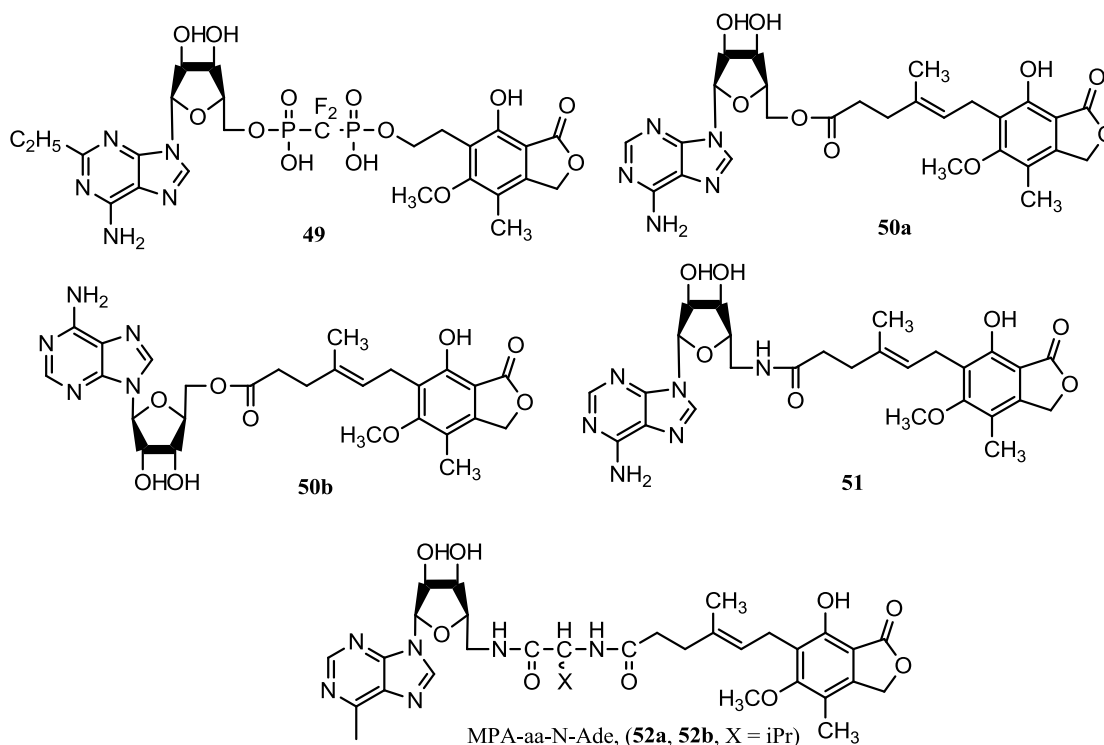
Rysunek 6. Struktura MAD **48** [90].

W 2014 roku Felczak i wsp. modyfikując strukturę MAD **48** otrzymali analogi **48a-f** (Rysunek 7), które poddali badaniom jako inhibitory IMPDH oraz inhibitory proliferacji nowotworowych linii komórkowych takich jak K562, HeLa oraz HT29. Stwierdzono, że związki **48a-f** znacznie silniej hamowały IMPDH od MAD **48**, a najlepszym inhibitorem okazał się analog 4-pirydylo MAD **48c**. Podczas badań inhibicji proliferacji nowotworowych linii komórkowych, związek **48c** okazał się najaktywniejszy. Dla analogu 2-(2-furylo) MAD **48d** również uzyskano zadowalające wyniki [76].



Rysunek 7. Struktura nowych analogów MAD **48a-f** [76].

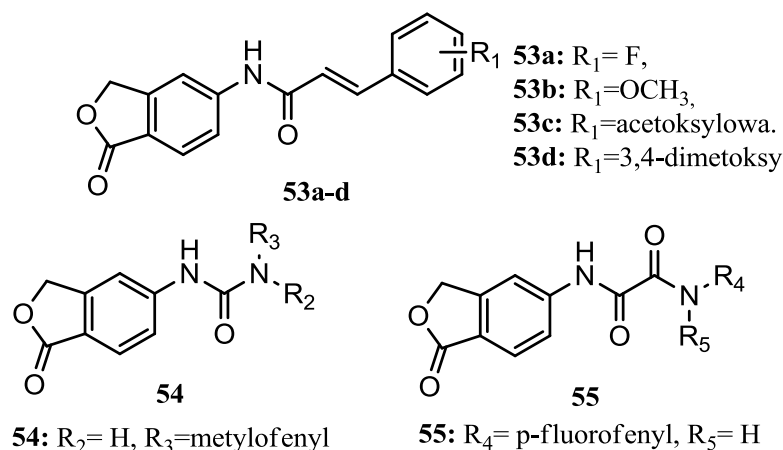
W literaturze chemicznej [91] opisano szereg tego typu analogów, w których łącznik P-CH₂-P zastąpiono izosteryczną grupą P-CF₂-P, analog **49** (Rysunek 8). Felczak i wsp. [76] otrzymali ester MPA i adenozyiny **50a**, jego anomer **50b**, mykofenolowy amid adenozyiny **51** oraz diamidy mykofenolo-L- i mykofenolo-D-waliloadenozyiny **52a** i **52b**.



Rysunek 8. Struktury difosfoniowej pochodnej MAD **49** [91], estru adenozyiny kwasu mykofenolowego **50a** i jego anomeryczna forma **50b** (L-adenozyna), mykofenolowy amid adenozyiny **51** oraz mykofenolowy-(L) i (D)-diamidwalilo-adenozyny **52a** i **52b** [76].

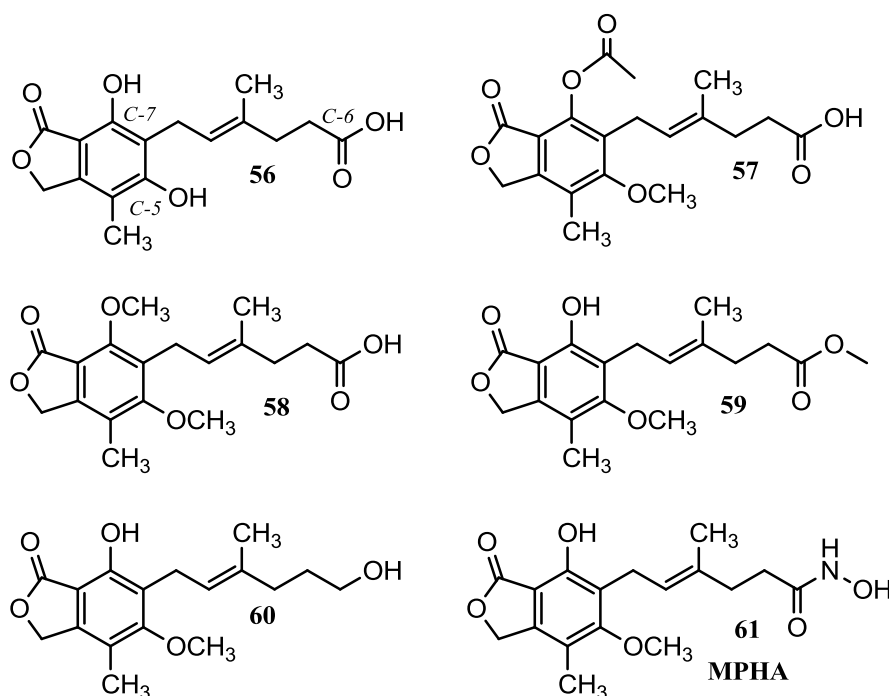
Związki **52a-b** okazały się silniejszymi inhibitorami IMPDH niż MPA. Żaden z uzyskanych diamidów nie wykazywał hamowania linii nowotworowych w warunkach *in vitro* w przeciwieństwie do pochodnych **50a-b**. Charakteryzowały się one wysoką aktywnością hamowania proliferacji linii komórkowych, zwłaszcza linii K562 [76].

Yang i wsp. [92] otrzymali serię izobenzofuranowych pochodnych (**53a-d**) opartych na strukturze MPA (Rysunek 9). Z grupy α,β -nienasyconych amidów, najlepszą aktywnością w stosunku do limfocytów T odznaczały się związki, które w swojej strukturze zawierały atom fluoru (**53a**), grupę metoksyową (**53b**) czy też acetoksyową (**53c**) w pozycji *meta*. Bardzo dobre wyniki otrzymano również dla pochodnej 3,4-dimetoksyfenylowej MPA (**53d**). Otrzymano również pochodną mocznika i MPA **54**, ale nie wykazywała ona zadawalających wyników w testach biologicznych. Ostatnią badaną grupą związków były diamidowe pochodne MPA. Najwyższą aktywnością antyproliferacyjną charakteryzowała się pochodna *p*-fluorofenylowa **55** [92].

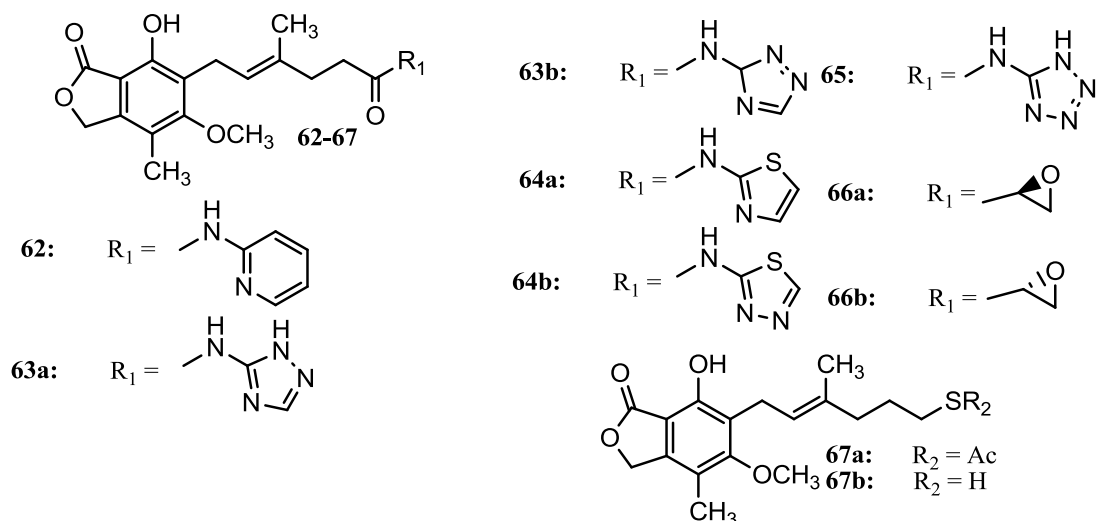


Rysunek 9. Struktury związków **53a-d**, **54** i **55** [92].

Mitsubishi i wsp. [89] zaprojektowali 6 nowych pochodnych MPA **56-61**, wprowadzając modyfikacje na węglach C-5, C-7 i C-6 (Rysunek 10). Żadna z otrzymanych pochodnych nie okazała się lepszym inhibitorem IMPDH niż MPA. Jednak przeprowadzone badania SAR ujawniły, że modyfikowane na węglach C-5, C-7 i C-6 są ważne dla zachowania aktywności przeciwko IMPDH. Ponadto stwierdzono, że modyfikacja w związku **54** (demetylacja 5-OMe) spowodowała zwiększenie hydrofilowości. Interesującym analogiem MPA okazał się mykofenolan kwasu hydroksamowego (MPHA) **61**. Udowodniono, że jest on nie tylko inhibitorem IMPDH, o podobnej aktywności co MPA **9**, ale również hamuje deacetylazę histonową (HDECs). Enzymy te są celem molekularnym dla leków przeciwnowotworowych, gdyż katalizują usuwanie grupy acetylowej z lizyny w histonach [93]. Chcąc, zachować aktywność inhibitującą w stosunku do obu enzymów Sunohara i wsp. [94] otrzymali nowe heterocykliczne amidowe analogi MPA a także epoksydowe oraz tiolowe pochodne **62-67** (Rysunek 11).



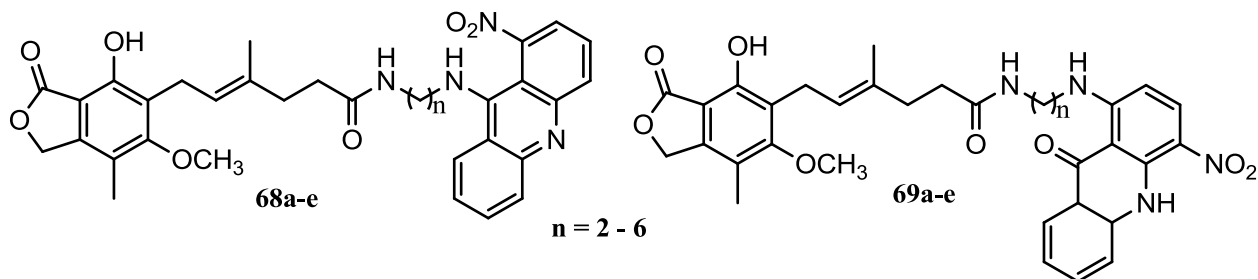
Rysunek 10. Struktury pochodnych **56-61** modyfikowanych na węglach C-5, C-6 i C-7 [89].



Rysunek 11. Struktury nowych pochodnych MPA 62-67 [94].

Po przeprowadzeniu badań aktywności antyproliferacyjnej *in vitro* wobec komórek K562, stwierdzono, że na uwagę zasługują związki **63a**, i **66a-b**. Pochodne MPA **63a** i **66b** wykazały silną aktywność hamującą wobec IMPDH. Natomiast związek **66a** nie tylko jest inhibitorem IMPDH ale również nieznacznie hamuje enzym HDAC [94].

Małachowska-Ugarte i wsp. [95] w 2012 roku otrzymali koniugaty 1-nitroakrydyny/4-nitroakrydonu z MPA **68a-e** i **69a-e** (Rysunek 12).

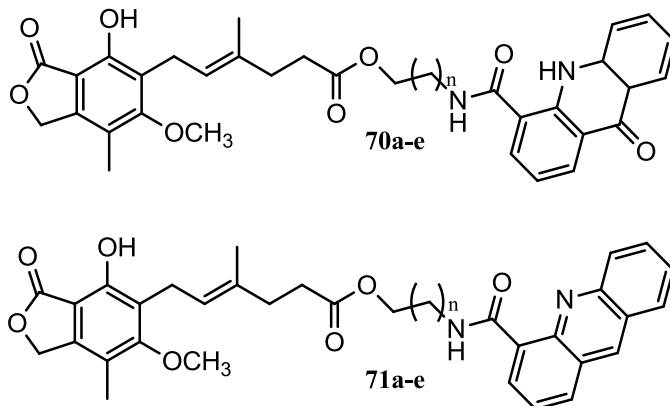


Rysunek 12. Struktury koniugatów 1-nitroakrydyny/4-nitroakrydonu MPA **68a-e** i **69a-e** [95].

Przeprowadzono badania aktywności antyproliferacyjnej oraz cytotoksycznej otrzymanych związków na aktywowanych limfocytach oraz liniach komórkowych typu Jurkat, CCRF-CEM, Molt-4, HL-60, L-1210 i Yac-1. Wyniki testów wykazały, że w/w koniugaty uzyskane w wyniku połączenia MPA z pochodnymi nitroakrydyn **68a-e** są bardziej aktywne wobec wszystkich badanych linii komórkowych niż koniugaty MPA z nitroakrydonami **69a-e**. Pochodne MPA z 4-nitroakrydonem charakteryzowały się słabszą aktywnością w porównaniu z MPA, lub jej całkowitym brakiem. Pochodne **69a** i **68b-c** zostały wytypowane do dalszych badań *in vivo*, ze względu na swoją selektywność oraz najlepszą aktywność wobec komórek PBMC. Pochodne te mogłyby być zastosowane w charakterze immunosupresantów [95].

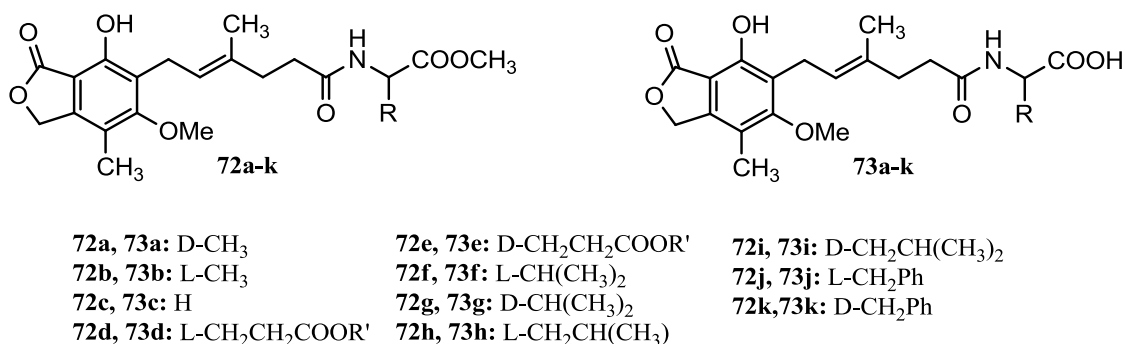
W tym samym zespole, otrzymano również analogi MPA połączone z akrydynami/akrydonami poprzez łącznik estrowy (Rysunek 12). Związki **70a-e** i **71a-e** zostały również pozbawione grupy nitrowej co potencjalnie miało zmniejszyć

cytotoksyczność a tym samym miały być one lepiej tolerowane przez organizm. Przeprowadzono badania na liniach komórkowych Jurkat oraz PBMC. Ponownie koniugaty akrydyny i MPA **71a-e** okazały się aktywniejsze niż pochodne akrydonu **70a-e**. Zaobserwowano również wpływ długości łącznika pomiędzy MPA a układem heterocyklicznym. Najbardziej obiecujące okazały się analogi **70b**, **70d**, **71a** i **71b** [96].



Rysunek 13. Struktury koniugatów akrydonu/akrydyny z MPA **70a-e** i **71a-e** [96].

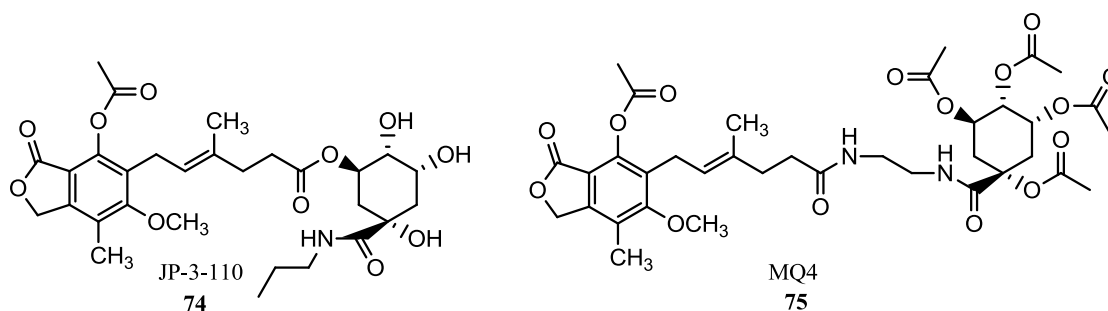
W Katedrze Chemii Organicznej Politechniki Gdańskiej [97] otrzymano również aminokwasowe pochodne MPA w postaci estrów metylowych **72a-k** oraz z wolną grupą karboksylową **73a-k** (Rysunek 14), poprzez utworzenie selektywnego wiązania amidowego pomiędzy grupą karboksylową MPA a resztą aminową estru metylowego aminokwasu.



Rysunek 14. Struktury aminokwasowych pochodnych MPA w postaci estrów metylowych **72a-k** i z wolną grupą karboksylową **73a-k** [97].

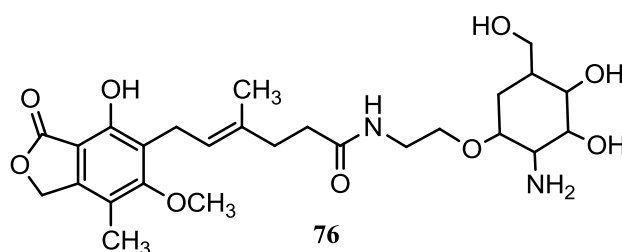
Do oceny cytotoxyczności *in vitro* użyto limfoidalnej linii komórkowych Jurkat oraz aktywowanych limfocytów PBMC. Analogi MPA z wolną grupą karboksylową **72a-k** okazały się bardziej toksyczne dla komórek. Zarówno związki **72a-k**, jak i **73a-k** wykazują porównywalną aktywność antyproliferacyjną do MPA, a także działają jako inhibitory IMPDH. Ich aktywność biologiczna zależy od rodzaju aminokwasu oraz ich konfiguracji. Ester metylowy *N*-mykofenoilo-L-feniloalaniny **72j**, kwas *N*-mykofenoilo-D-glutaminowy **73e** oraz *N*-mykofenoilo-L-leucyna **73h** charakteryzują się wysoką aktywnością antyproliferacyjną w porównaniu do MPA przy jednocześnie najniższej toksyczności. Dlatego zostały one wytypowane do badań *in vivo* jako nowe potencjalne immunosupresanty [97].

Ostatnio optymalną metodą leczenia insulinozależnej postaci cukrzycy jest transplantacja wysepek trzustkowych Langerhansa. Jednym z najskuteczniejszych immunosupresantów zabiegających odrzuceniu tego typu przeszczepu jest kwas mykofenolowy. Jednak jego długoterminowe przyjmowanie wiąże się z zaburzeniami uwalniania insuliny, co może prowadzić do niewydolności odpowiedzialnego za ten proces gruczołu [98]. W związku z tym Wu i wsp. [98] zaprojektowali koniugat (JP-3-110 **74**) MPA z pochodną kwasu chinowego – KZ41. Badania biologiczne wykazały porównywalną aktywność związku **74** do MPA podczas inhibicji PBMC a także lepszy profil toksykologiczny. Niestety związek JP-3-110 podatny jest na hydrolizę enzymatyczną a także charakteryzuje się małą stabilnością, co zdecydowanie ogranicza jego zastosowanie kliniczne [98]. Struktura **74** została zmodyfikowana przez Peng i wsp. [99], otrzymując amid (MQ4) **75**. MQ4 zgodnie z założeniem był bardziej stabilny, co pozwoliło na osiągnięcie stężenia terapeutycznego i immunosupresje. Dodatkowo substancja wykazuje mniejszą cytotoxycznosc, dzięki czemu zakwalifikowano ją dalszych badań *in vivo* [99].



Rysunek 15. Struktury koniugatów MPA i kwasu chinowego JP-3-110 **74** [98] i MQ4 **75** [99].

Nowy koniugat MPA z glukozaminą **76** został zaprojektowany aby ograniczyć efekty uboczne poprzez ukierunkowany system dostarczenia leków, w którym akumulacja leku będzie miała miejsce w nerce przy jednocześnie minimalnym stężeniu w innych narządach [100]. Związek **76** charakteryzuje się lepszą biodostępnością i mniejszą cytotoxycznoscą niż związek macierzysty. Po pomyślnie zakończonych badaniach *in vitro*, powinien zostać poddany dalszym testom *in vivo* na zwierzętach [100].

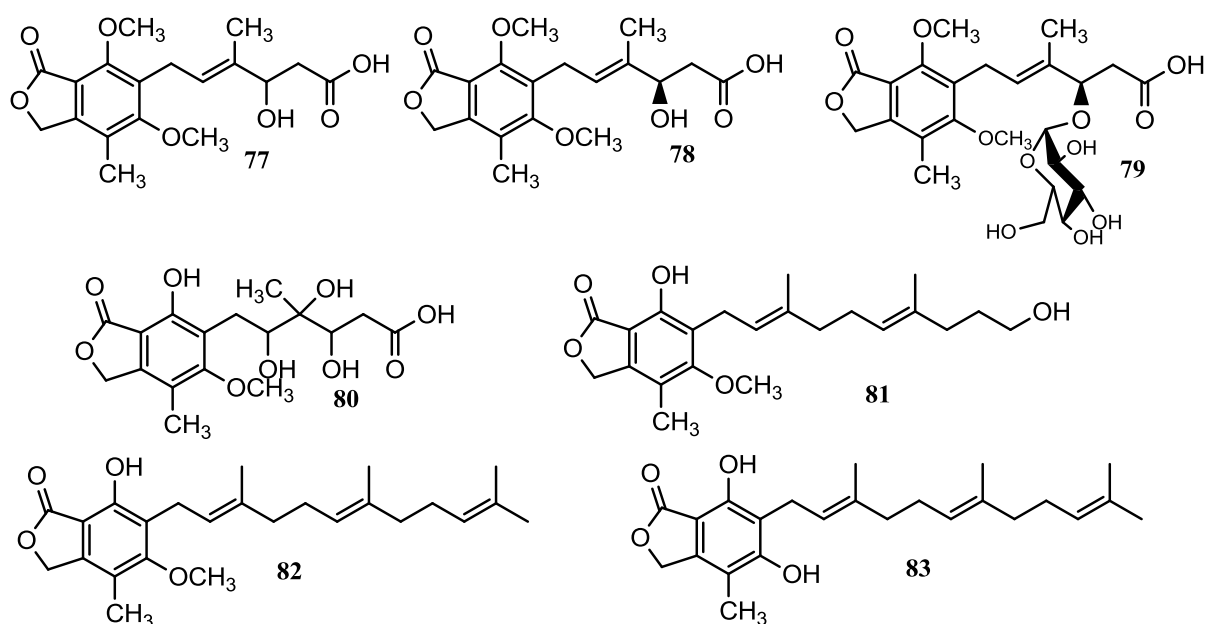


Rysunek 16. Struktura koniugatu MPA z glukozaminą **76** [100].

Pośród analogów MPA, nieliczną grupę stanowią pochodne wyizolowane ze źródeł naturalnych. W 2012 roku Chen i wsp. [59] wyizolowali nowe związki **77-80** bazujące na strukturze MPA z grzybów *Penicillium Sp. SOF07* obecnych w osadach morskich. Okazało się że ten rodzaj szczepu produkuje aktywne pochodne MPA

wykazujące cytotoksyczność przeciwko ludzkim liniom nowotworowym: HCT-15, A-549 i HEP-3B. Ujawniona aktywność biologiczna jest przypisana oddziaływaniom z IMPDH i hamowaniem jej funkcji enzymatycznych. Jednak okazały się one słabszymi inhibitorami tego enzymu niż macierzysty MPA. Największą skutecznością odznaczył się analog **77**, a najmniejszą **80**.

Kolejne trzy analogi **81-83** zostały wyizolowane z kultur muchomora z gatunku *Laetiporus sulphureu* i poddane testom sprawdzającym ich potencjał cytotoksyczny. Otrzymane pochodne przebadano na ludzkich liniach białaczki szpikowej HL-60, raka wątrobowokomórkowego SMMC-7721, raka płuc A-549, raka piersi MCF-7 oraz raka okrężnicy SW480. Jedynie analog **83** wykazał umiarkowaną zdolność do inhibicji IMPDH we wszystkich typach przebadanych linii komórkowych [60].



Rysunek 17. Struktury naturalnych pochodny MPA wyizolowanych z *Penicillium Sp. SOF07* **77-80** [59] i *Laetiporus sulphureu* **81-83** [60].

Ze względu na to, że kwas mykofenolowy posiada szerokie spektrum aktywności biologicznej, jest on bardzo interesującym obiektem badań. Do tej pory MPA stosowany jest jako immunosupresant. Niestety niekorzystny metabolizm zmusza do stosowania większych ilości farmaceutyku aby otrzymać wymagane stężenie terapeutyczne. Sytuacja taka skłania do projektowania jego nowych pochodnych, które będą charakteryzowały się większą skutecznością, trwałością i selektywnością oraz mniejszą toksycznością dla organizmu. Oprócz analogów kwasu mykofenolowego, w których modyfikowane są określone fragmenty jego struktury poprzez zmianę lub dodanie nowych podstawników, dużym zainteresowaniem cieszy się tworzenie koniugatów MPA z innymi aktywnymi biologicznie związkami. Celem tworzenia związków takiego typu jest uzyskanie efektu synergistycznego, potęgującego efekty terapeutyczne lub działającego na dwa odmienne cele terapeutyczne.

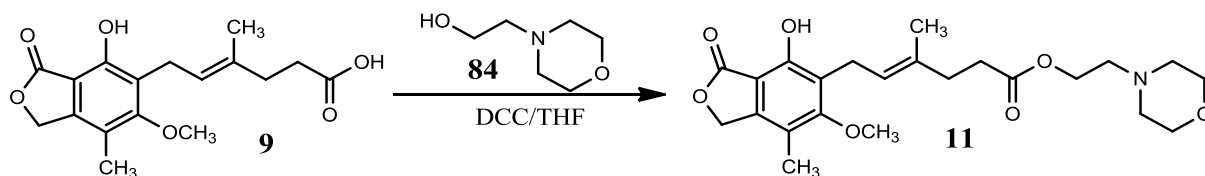
1.4. Proleki MPA stosowane klinicznie

MPA podawany jest do organizmu w postaci proleków MMF **11** i MPS **10**, gdyż podczas zażywania samej substancji czynnej MPA następuje nasilenie niepożądanych objawów a także zestryfikowanie cząsteczki MPA znacząco poprawia jego biodostępność [101].

Mykofenolan mofetylu (MMF) **11** (Rysunek 2) jest 2-morfolinoetylowym estrem kwasu mykofenolowego. Został wprowadzony na rynek farmaceutyczny przez firmę Roche pod nazwą handlową *CellCept*. Jest on najczęściej stosowanym analogiem MPA, podczas transplantacji organów, zarówno podczas ostrego jak i przewlekłego odrzucania przeszczepu [42]. Mykofenolan mofetylu okazał się również skuteczny podczas leczenia łuszczycy skóry, toczenia rumieniowatego czy stwardnienia rozsianego [1] [42] [2] [102]. MMF działa cytostatycznie na limfocyty T oraz B, jednocześnie pozostając obojętnym dla innych komórek, wykazując ok. 94% biodostępności [103] [104]. Lek może być podawany w formie doustnej i dożylnej, przy czym w Polsce dopuszczona jest tylko doustna forma podania tego farmaceutyku. Po podaniu doustnym jest on bardzo szybko hydrolizowany do substancji czynnej czyli MPA przez esterazy (głównie transferazę glukuronową) w żołądku, jelicie cienkim, krwi, wątrobie i tkankach. Pomimo stwierdzonej skuteczności w zakresie immunosupresji, pacjenci przyjmujący MMF narażeni są na zaburzenia układu krwionośnego: (leukopenię, małopłytkowość czy anemię) oraz pokarmowego. Zwiększona jest także zapadalność na infekcje bakteryjne i wirusowe [5] [1] [42] [2] [102].

W 2015 roku została opublikowana przez Cochrane Library analiza wszystkich 23 badań klinicznych z zastosowaniem azatiopryny **8** lub MMF **11** jako pierwszego leczenia immunosupresyjnego u biorców nerki. Wykazano, że MMF był bardziej skuteczny od azatiopryny zmniejszając o 20% ryzyko utraty przeszczepu i o 30% ryzyko wystąpienia procesu odrzucania [42].

Ester 2-morfolinoetylowy kwasu mykofenolowego **11** otrzymuje się na drodze estryfikacji MPA **9** za pomocą 4-(2-hydroksyetylo)-morfolinę **84** w obecności odczynnika kondensującego DCC [105] (Schemat 6).



Schemat 6. Synteza MMF **11** z wykorzystaniem DCC [39].

Chcąc zredukować obciążenie układu pokarmowego jednocześnie zachowując taką samą ekspozycję kwasu mykofenolowego jak w przypadku pochodnej MMF **11**, zaprojektowano sól sodową kwasu mykofenolowego (MPS) **10** (Rysunek 2). Związek ten charakteryzuje się większą skutecznością działania w mniejszej dawce oraz jest lepiej tolerowany przez pacjentów w porównaniu z MMF **11**. Mykofenolan sodu wykazuje 72% biodostępności. Farmaceutyk został zatwierdzony przez FDA w 2004 r. Na rynek farmaceutyczny wprowadziła go firma Novartis pod nazwą handlową

Myfortic. MPS podobnie jak MMF stosowany jest podczas transplanatacji allogeniczných nerek, wątroby czy serca [1] [42] [2] [102]. Jednak także mykofenolan sodu nie jest pozbawiony skutków ubocznych, gdyż może on powodować infekcje grzybicze tkanek, zwiększa ryzyko poronień w I trymestrze ciąży oraz przyczynia się do powstania wrodzonych wad płodu [106].

MPS **10** powoduje mniej uciążliwych efektów ubocznych co wiąże się z rzadszą koniecznością zwiększania dawki leku. Co więcej u niektórych pacjentów zaobserwowano tolerancję na sól sodową MPA w przeciwieństwie do mykofenolanu mofetylu. Ponadto w przypadku długotrwałego leczenia stosując MPS uzyskano najdłuższe przeżycie przeszczepu. Na podstawie powyższego można by stwierdzić, że stosowanie MPS jest korzystniejsze dla organizmu niż MMF [107]. Jednak ilość uwalnianej substancji czynnej czyli kwasu mykofenolowego z MMF może różnić się od ilości dostarczanej z MPS, pomimo zastosowania tej samej dawki leku. Dlatego więc, nie można uznać wyżej wspomnianych farmaceutyków za równoważne pod względem biologicznym, a tolerowanie leku jest względem osobniczym dla każdego pacjenta [108].

1.5. Metabolizm *in vivo* mykofenolanów

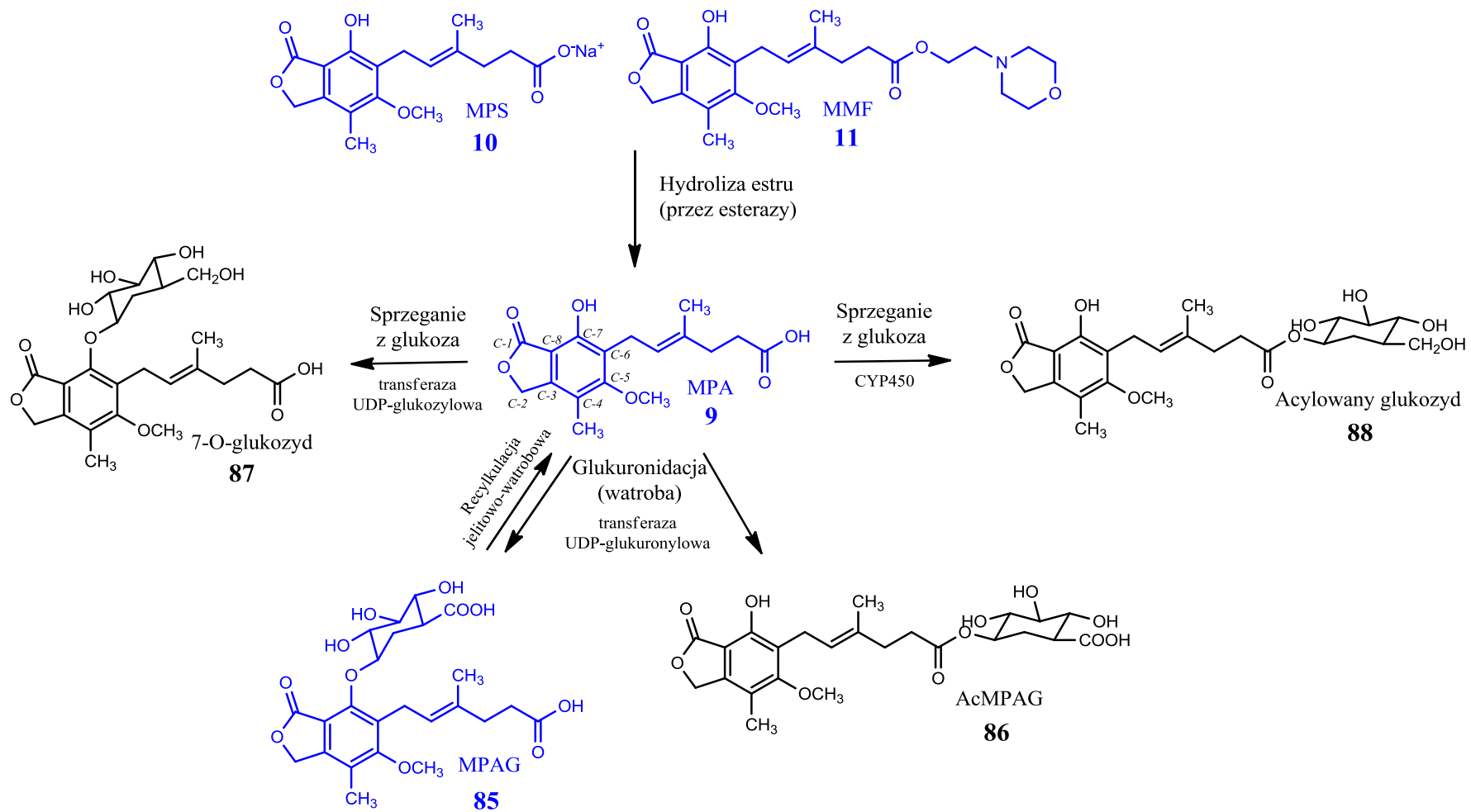
Nie umniejszając wielu niewątpliwym zaletom kwasu mykofenolowego **9**, niestety niekorzystny metabolizm MPA ogranicza jego stosowanie w terapii a także wymusza podawanie większych dawek farmaceutyku pacjentom podczas leczenia. Po podaniu doustnym MMF **11** jest szybko i prawie całkowicie wchłaniany z przewodu pokarmowego a także jest hydrolizowany przez esterazy osoczowe i tkankowe do aktywnego metabolitu, jakim jest MPA [103] [104]. Mykofenolany osiągają maksymalne stężenie we krwi w ciągu 1 do 2 godzin po zażyciu [42]. Kolejno kwas mykofenolowy metabolizowany jest w wątrobie (w mniejszym stopniu w nerkach i przewodzie pokarmowym) gdzie następuje inaktywacja MPA **9** podczas glukuronidacji. Cząsteczka kwasu mykofenolowego posiada dwa potencjalne miejsca glukuronidacji: grupę hydroksylową w pozycji 7 pierścienia oraz alifatyczną grupę karboksylową. W wyniku tego procesu powstają głównie dwa metabolity: farmakologicznie nieaktywny 7-*O*-glukuronid MPA (MPAG) **85** oraz acylowany glukuronid (AcMPAG) **86**, (ok 10-20% całkowitej ekspozycji na MPA) (Schemat 7) [6] [7]. Zauważając, że MPAG **85** jest pozbawiony właściwości immunosupresyjnych stwierdzono, że wolna grupa hydroksylowa w pozycji 7 pierścienia jest niezbędna do wykazywania aktywności MPA [7]. Acylowany glukuronid **86** jest jedynym metabolitem MPA, który zachowuje pełną aktywność immunosupresyjną *in vitro* [109]. 7-*O*-glukuronid **85** kwasu mykofenolowego ulega recykulacji jelitowo-wątrobowej, wydalając się z żółcią do jelita. Następnie ulega hydrolizie do MPA w obecności enzymu β -glukuronidazy, produkowanej przez bakterie jelitowe. Ponowne wchłonięcie leku do krwioobiegu powoduje powstanie drugiego szczytu MPA w osoczu (5-12 h po podaniu) [110] [42] [109]. Głównym inicjatorem procesu glukuronidacji jest UGT (urydyno difosfoglukonylotransferaza) [111] [112] [113] [114].

Po doustnym podaniu mykofenolanu mofetylu **11**, który był znakowany radioizotopem stwierdzono że ok. 93% podanej dawki zostało wydalone przez nerki

z moczem: około 87% w postaci MPAG **85**, 0,6% MPA **9** i 0,3% AcMPAG **86** [115] [104] [116].

Kwas mykofenolowy oprócz procesu glukuronidacji może być również metabolizowany na drodze sprzęgania z glukozą dając 7-*O*-glukozyd **87** oraz produkt utleniania cytochromu P450: acylowy glukozyd **88**. Metabolity te jednak występują w ilościach śladowych i prawdopodobnie nie wykazują klinicznie istotnej aktywności farmakologicznej [117] [7].

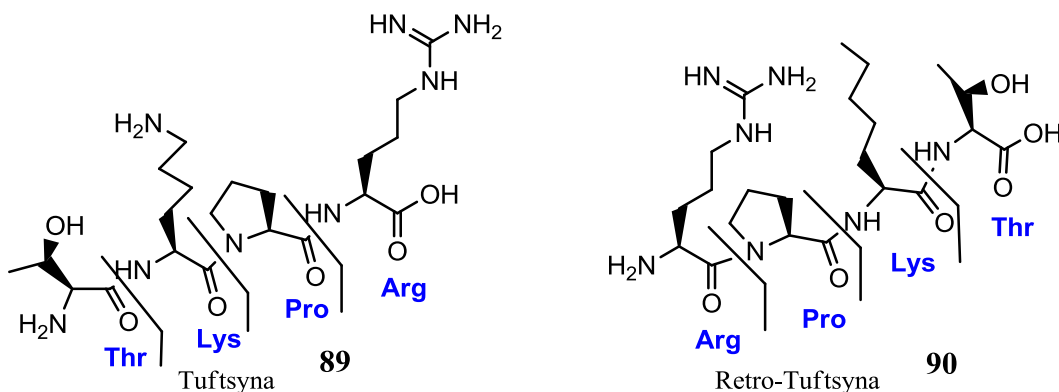
Powstanie nieaktywnego farmakologicznie MPAG **85** jest niewątpliwie przyczyną ograniczenia stosowania kwasu mykofenolowego. Dodatkowo recyrkulacja MPA **9**, w wyniku hydrolizy MPAG **85** może być poniekąd odpowiedzialna za część pojawiających się efektów ubocznych [102].



Schemat 7. Metabolizm mykofenolanów [117] [118].

2. Tuftsyna

W 1970 roku na Uniwersytecie Tufts w Bostonie, Najjar i Nishioka po raz pierwszy wyizolowali i dokonali syntezy tuftsyny **89** [119] (Rysunek 18), która jest endogennym tetrapeptydem o sekwencji Thr-Lys-Pro-Arg, naturalnie występującym we krwi człowieka [33]. Retro-tuftsyna, zaś jest tetrapeptydem o odwróconej sekwencji tuftsyny.



Rysunek 18. Struktura tuftsyny i retro-tuftsyny [33].

W organizmie ludzkim tuftsyna jest aktywna wyłącznie w postaci wolnego peptydu [33]. Stanowi ona fragment ciężkiego łańcucha Fc (289-292) immunoglobuliny typu G (IgG) i uwalniana jest pod wpływem działania specyficznych enzymów takich, jak leukokininaza oraz endokarboksypeptydaza tuftsynowa śledziony [120]. W przypadku działania endokarboksypeptydazy następuje rozszczepienie wiązania peptydowego pomiędzy Arg²⁹² a Glu²⁹³. Natomiast leukokininaza działa na wiązanie pomiędzy Lys²⁸⁸ a Thr²⁸⁹.

Mechanizm działania tuftsyny nie jest do końca poznany. Uwolniona tuftsyna zwiększa fagocytozę, pinocytozę oraz chemotaksję [120]. Aktywuje makrofagi do zwalczania infekcji bakteryjnych, poprawia komunikację pomiędzy układem odpornościowym (makrofagi, limfocyty T i wytwarzające przeciwciała limfocyty B), w wyniku tego zostaje zwiększona produkcja przeciwciał. Ponadto stwierdzono, że peptyd ten wzmacnia odpowiedź immunologiczną wobec nowotworów a także opóźnia wzrost guzów [121]. Tuftsyna reguluje również poziom noradrenaliny, serotoniny a także dopaminy. Może powodować zmiany w syntezie oraz degradacji monoamin i protein w podwzgórzu mózgu a także w strukturach kory mózgu [122].

U osób z usuniętą śledzioną zauważono niekorzystny dla organizmu niedobór tuftsyny. Zatem pacjenci mający uszkodzoną śledzionę, są znacznie bardziej podatni na ostre infekcje spowodowane brakiem tuftsyny. Deficyt tego immunomodulatora wykazano również w przypadku takich schorzeń jak anemia sierpowata, AIDS oraz białaczka Hidgkina [33].

Trevisani i wsp. [123] stwierdzili, że aktywność i stężenie tuftsyny jest niższe w przypadku marskości wątroby czy uszkodzenia funkcji śledziony i przyczynia się do osłabienia aktywności fagocytarnej granulocytów.

2.1. Właściwości biologiczne tuftsyny

Tuftsyna posiada szerokie spektrum aktywności biologicznej. Wykazuje nie tylko działanie immunoaktywne ale i przeciwnowotworowe, przeciwwirusowe, przeciwgrzybicze a także przeciwbakteryjne. Wykazano, również, że peptyd ten działa przeciwbólowo [124], co potwierdza jego bezpośredni wpływ na układ nerwowy. Za zdolność tuftsyny do znoszenia bólu odpowiada dipeptyd Pro-Arg [125]. Tuftsyna może hamować degenerację aksonów, opóźnić śmierć neuronów a także przekształcać komórki mikrogleju w mniej rozgałęzione i owalne kształty. Peptyd ten poprawia także funkcjonowanie układu neurologicznego [126]. Ponadto łagodzi objawy głodu narkotycznego, zwiększa ciśnienie tętnicze krwi oraz hamuje kurczenie się naczynek limfatycznych [33].

Wang i wsp. [127] stwierdzili, że tripeptyd tj. fragment tuftsyny (Thr-Lys-Pro), działa jako inhibitor makrofagów mikrogleju, odgrywający ważną rolę ochronną zapobiegającą krwotokowi śródmózgowemu, co stwierdzono w badaniach na modelu zwierzęcym. Fragment 1-3 tuftsyny (TKP) obniża także produkcję rodników oraz ilość neuronów ulegających degradacji, często efektem jest zmniejszenie obszaru uszkodzenia, a także poprawia działanie układu nerwowego. Raibon i wsp. [128] udowodnili, że podanie tego tripeptydu, tj. fragmentu tuftsyny do ciała szklistego oka powoduje zwiększoną regenerację aksonów warstwy zwojowej siatkówki oraz zmniejszenie ilości fagocytów w siatkówce.

Szlak sygnałowy tuftsyny nie został jeszcze w pełni poznany, pomimo tego, że jest ona znana już od ponad czterdziestu lat. Ostatnio zidentyfikowano, że tuftsyna wiąże się z neuropiliną-1 [129] [130]. Neuropilina-1 jest receptorem odgrywającym zasadniczą rolę w angiogenezie, przepuszczalności naczyń oraz w rozwoju systemu nerwowego. Tuftsyna zawierająca sekwencję podobną do końca VEGF-A165, wiąże się z neuropiliną-1 konkurując z VEGF. Peptyd łączy się z Nrp-1 za pomocą sieci interakcji, w których najbardziej istotna jest C-końcowa reszta Arg pochodząca od tuftsyny wiążąca się z Asp-320 pochodzącą z Nrp-1.

Ostatnie badania wykazały, że tuftsyna podawana wraz z polienowym lekiem, czyli nystatyną, myszom zakażanym *Candida albicans*, wzmacnia właściwości przeciwgrzybicze leku [131]. Zauważono również zdolność tuftsyny do zmniejszania owrzodzeń. Udowodniono, że podawanie tego tetrapeptydu powoduje ograniczenie miejsca owrzodzenia a także szybsze wygojenie chorej tkanki [132].

Aby zapewnić ochronę przed infekcjami piskląt przed wylęgnięciem, stosowane są szczepienia embrionalne kurczaków. Szczepienia te okazują się bardzo skuteczne przeciw chorobom Mareka, Gumboro i Newcastle (NDV) a także przeciw krwotocznemu zapaleniu jelit i zapaleniu oskrzeli. Badania wykazują, że po podaniu szczepionki embrionalnej przeciwko NDV wraz z tuftsyną, po kilku tygodniach wzrasta stężenie peptydu chroniąc tym samym przed chorobami układu immunologicznego [133].

Ze względu na wielokrotne przebadanie właściwości tuftsyny na organizm ludzki i zwierzęcy, postanowiono sprawdzić działanie tetrapeptydu na rybach. Badania przeprowadzono na karpniu z gatunku *Labeo rohita*, któremu podano tuftsynę

czterokrotnie, w dwutygodniowych odstępach. Po badaniu zaobserwowano zwiększoną odporność na infekcje oraz wzrost niespecyficzej odpowiedzi immunologicznej. Wyniki badań mogą posłużyć w celu ochrony hodowli ryb [134].

Pomimo tak korzystnych właściwości tuftsyny, peptyd ten nie jest stabilny, jego okres półtrwania w krwi wynosi 16 minut. Jest on hydrolizowany przez aminopeptydazę leucynową, karboksypeptydazę B, protonazę oraz subtylizynę. W wyniku tej hydrolizy powstają tripeptydy, takie jak: Lys-Pro-Arg i Thr-Lys-Pro. Powstałe związki inhibują aktywność tuftsyny [135]. W związku z tym aby właściwości tuftsyny mogły być w pełni wykorzystywane, należy pracować nad znalezieniem bardziej trwałych analogów tuftsyny oraz jej połączeń z różnymi biologicznie czynnymi związkami.

2.2. Przegląd najnowszych analogów tuftsyny

Mezo i wsp. [131] zaprojektowali oligopeptydy bazujące na pentapeptydzie (TKPKG)_n, pochodnej tuftsyny o różnej długości łańcucha (n = 2,4,6,8). Związki okazały się być nietoksyczne dla mysich komórek śledziony, nieimmunogenne, a ich immunostymulatorowe efekty powodowały wzrost odpowiedzi przeciwciał na antygen (SRBC) u myszy. Analizując te wyniki stwierdzono, że oligopeptydowe pochodne mogą być obiecującymi nośnikami dla syntetycznych szczepionek. Otrzymano również polituftsynę (TKPR)₄₀ jako nośnik dla syntetycznych peptydów wywodzących się z białek gp41 i gp120 wirusa HIV. Polituftsyna wykazuje taką samą aktywność biologiczną jak tuftsyna, przy tym zwiększa produkcję IL-2 i IFN- γ , oraz posiada dłuższy czas półtrwania w organizmie [136].

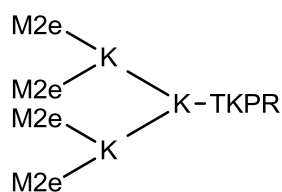
Fridikin i wsp. [137] otrzymali koniugat AZT, (lek stosowany w terapii AIDS) z tuftsyną. Związek wykazywał właściwości obu komponentów. Hamował aktywność odwrotnej transkryptazy i ekspresję antygeny HIV oraz pobudzał uwalnianie IL-1 przez mysie makrofagi. Koniugat AZT-tuftsyna okazał się nietoksyczny w stosunku do komórek T, oraz może mieć potencjalne zastosowanie w terapii AIDS.

Tuftsynę **89** wykorzystali również Liu i wsp. [138] jako składnik szczepionki przeciwko wirusowi grypy typu A. Tetrapeptyd zastosowano jako cząsteczka immunostymulująca. Autorzy opracowali nową peptydową szczepionkę przeciwko grypie typu A w oparciu o M2e **91**. Domena białka macierzy zewnątrzkomórkowej 2 (M2e) **91** (Rysunek 21), składająca się z 24 aminokwasów, jest dobrym celem rozwoju uniwersalnej szczepionki, która mogłaby chronić przed znacznie szerszym zakresem szczepów wirusa grypy typu A. Niestety ten polipeptyd wykazuje stosunkowo niską immunogenność i antygenowość, co związane jest z jego niewielkimi rozmiarami. W związku z tym, za pomocą systemu MAP (multiple antigen peptide), opracowano nową szczepionkę peptydową **92**. Rozgałęziony peptyd składa się z czterech kopii M2e, które zsintetyzowano promieniście z cząsteczką tuftsyny **89** jako trzpieniem dodając połączenie z lizyną na C-terminalnym końcu. Rozwiązanie to zwiększa ciężar peptydu i jego immunogenność. W drugim przypadku, tuftsynę zastąpiono przez cztery cząsteczki glicyny **93** (Rysunek 19). Badanie przeprowadzone na myszach BALB/c dowiodły, że (M2e)₄-tuftsyna **92** indukuje silniejszą humoralną i komórkową

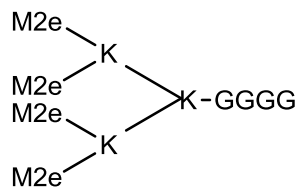
odpowieź immunologiczną niż monomer M2e **91** oraz koniugat **93**. Podczas infekcji ze śmiertelnym szczepem wirusa grypy PR8, w grupie szczepionej (M2e)₄-tuftsyną **92** przeżyło 80% zwierząt, w przypadku (M2e)₄-G4 **93** – 44%, a monomerem M2e **91** – 30%. Wyniki testu wykazują, że (M2e)₄-tuftsyna **92** może skutecznie stymulować swoistą odpowiedź komórek T. Badania nad nową szczepionką opartą na kombinacji rozgałęzionych polipeptydów zawierających tuftsynę pokazują, że jest ona obiecującym kandydatem na uniwersalną szczepionkę przeciw wirusowi grypy.

M2e: SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD

91: M2e peptyd



92: (M2e)₄-tuftsyna

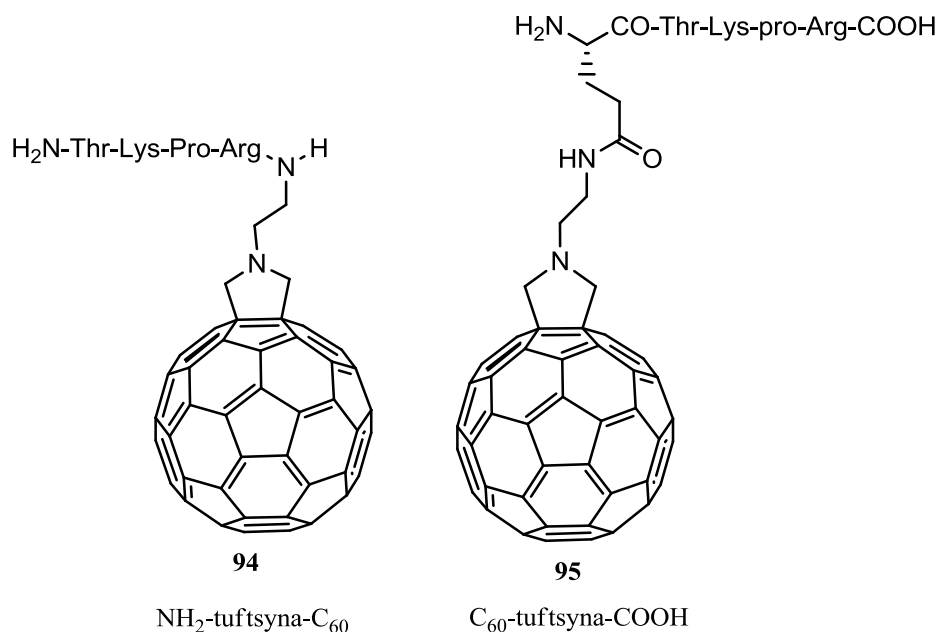


93: (M2e)₄-G4

Rysunek 19. Schematyczne struktury syntetyzowanych peptydów **92** i **93** [138].

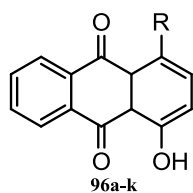
W literaturze [139] opisano również połączenie tuftsyny z fullerenem C₆₀⁴⁹. Fulleren, oraz jego pochodne znalazły zastosowanie w medycynie, np. w przeciwnowotworowej terapii fotodynamicznej, leczeniu aktywności wirusowej ludzkiego wirusa upośledzenia odporności. Fulleren przenika przez błonę komórkową i lokalizuje się w mitochondriach, w związku z tym może być stosowany jako nośnik leków, zwłaszcza podczas podawania leków przeciwnowotworowych. Fulleren C₆₀ jako ksenobiotyki, oddziałuje przede wszystkim w układzie odpornościowym i może wywołać szereg odpowiedzi immunologicznych. Jedne z badań pokazują, że polihydroksylowany C₆₀ (fulerol, C₆₀(OH)₂₄) może stymulować wrodzoną odporność u myszy obciążonej guzem złośliwym, co wiąże się z hamowaniem wzrostu guza [140].

Tuftsynę z fullerenem C₆₀ połączono na dwa sposoby otrzymując NH₂-tuftsyna-C₆₀ **94** i C₆₀-tuftsyna-COOH **95** (Rysunek 20). Związki badano pod kątem stabilności wobec degradacji aminopeptydazyleucynowej (LAP), a także działania immunostymulującego na otrzewną u myszy. Podczas badań makrofagów *in vitro* zaobserwowano zdecydowane wzmocnienie chemotaksji fagocytozy. Oba związki wykazywały całkowitą odporność na hydrolizę enzymatyczną i toksyczne działanie dla makrofagów. Wykonując testy biologiczne zauważono, że związki te stymulują immunomodulacyjne działanie tuftsyny, a nawet je zwiększają. Ponadto obie pochodne charakteryzują się znacznie większą stabilnością niż natywna tuftsyna. Otrzymane wyniki wskazują, że nowe koniugaty fullerenu C₆₀ z tuftsyną mogą być stosowane jako potencjalne związki immunomodulujące oraz adiuwanty szczepionek [141].

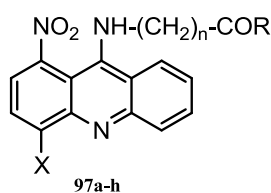


Rysunek 20. Struktury koniugatów tuftsyny z fullerenem C_{60} **94** i **95** [141].

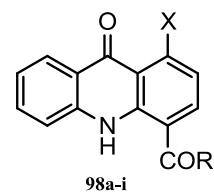
W 2011 roku Kukowska-Kaszuba i wsp. [142] zaprojektowali nowe koniugaty tuftsyny z antrachinonem **96** i akrydyną **97**/akrydonem **98** (Rysunek 21). Analogi tuftsyny zostały modyfikowane na ϵ -aminowej grupie lizyny aby zwiększyć stabilność tych związków we krwi. Modyfikacje łańcucha tuftsyny oparto na przyłączeniu dodatkowego aminokwasu (Gly, Val, Ile, Ala lub β Ala) do łańcucha peptydu. Otrzymane związki oceniano pod względem aktywności cytotoksycznej przeciwko liniom komórkowym ludzkiego raka, takim jak: komórki gruczolakoraka płuc A549 i białaczki szpikowej HL-60. Związki **96f**, **96g**, **96i**, **98b**, **98d**, **98e** nie wykazywały cytotoksyczności nawet w stężeniu większym niż 100 mM. Inne analogi tuftsyny charakteryzowały się niską cytotoksycznością przy wysokich stężeniach mikromolowych. W przypadku związku **97d** stwierdzono, 2-krotnie większą cytotoksyczność w stosunku do obu linii komórkowych, niż jego prekursor **99b**. Związek **97a** wykazywał 6-krotnie większą cytotoksyczność w stosunku do linii A549 od **99a**. W związku z tym stwierdzono, że koniugaty tuftsyny powodują w niektórych przypadkach obniżenie cytotoksyczności w porównaniu z ich prekursorami.



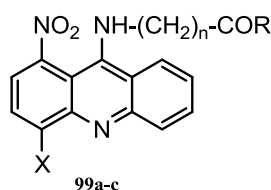
- 96a: R= Thr-Lys(Ala)-Pro-Arg-OH
 96b: R= Thr-Lys(BAla)-Pro-Arg-OH
 96c: R= Thr-Lys(Val)-Pro-Arg-OH
 96d: R= Thr-Lys(Gly)-Pro-Arg-OH
 96e: R= Thr-Lys(Ile)-Pro-Arg-OH
 96f: R=Arg-Pro-Lys-Thr-OH
 96g: R=Arg-Pro-Lys(Ala)-Thr-OH
 96h: R=Arg-Pro-Lys(BAla)-Thr-OH
 96i: R=Arg-Pro-Lys(Val)-Thr-OH
 96j: R=Arg-Pro-Lys(Gly)-Thr-OH
 96k: R=Arg-Pro-Lys(Ile)-Thr-OH



- 97a: R= Thr-Lys(Gly)-Pro-Arg-OH X=CH₃ n=3
 97b: R= Thr-Lys(Gly)-Pro-Arg-OH X=CH₃ n=2
 97c: R= Thr-Lys(Gly)-Pro-Arg-OH X=H n=2
 97d: R= Thr-Lys(Ile)-Pro-Arg-OH X=CH₃ n=5
 97e: R= Thr-Lys-Pro-Arg-OH X=CH₃ n=5
 97f: R=Arg-Pro-Lys(Gly)-Thr-OH X=H n=2
 97g: R=Arg-Pro-Lys(Ile)-Thr-OH X=CH₃ n=5
 97h: R=Arg-Pro-Lys-Thr-OH X=CH₃ n=5



- 98a: R= Thr-Lys-Pro-Arg-OH X=H
 98b: R= Thr-Lys(Gly)-Pro-Arg-OH X=H
 98c: R= Arg-Pro-Lys-Thr-OH X=H
 98d: R=Arg-Pro-Lys(Gly)-Thr-OH X=H
 98e: R=Arg-Pro-Lys(Ile)-Thr-OH X=H
 98f: R= Thr-Lys-Pro-Arg-OH X=NO₂
 98g: R= Thr-Lys(Ile)-Pro-Arg-OH X=NO₂
 98h: R= Arg-Pro-Lys-Thr-OH X=NO₂
 98i: R= Arg-Pro-Lys(Ile)-Thr-OH X=H



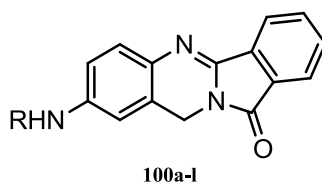
- 99a: R=OH X=CH₃ n=3
 99b: R=OH X=CH₃ n=5
 99c: R=OH X=H n=2

Rysunek 21. Nowe koniugaty tuftstyny z antrachinonem i akrydyną/akrydonem **96a-k**, **97a-h**, **98a-i**, **99a-c** [142].

Analizując relację pomiędzy strukturą a aktywnością, stwierdzono, że elementem o największym wpływie na cytotoksyczność koniugatów tuftstyny, były: typ peptydu oraz rodzaj połączenia z odpowiednim prekursorem. Najbardziej aktywny cytotoksycznie był związek sprzężony z prekursorem poprzez łącznik COR-**97d** (IC₅₀ = 8,7 ± 1,8 mM dla A549), gdzie grupa ε-aminowa lizyny została podstawiona izoleucyną. W przypadku, pochodnych tuftstyny połączone z prekursorem przez łącznik CONHR, najbardziej aktywnym związkiem okazał się **97a** (IC₅₀ = 3,0 ± 0,68 mM dla A549), który jest zmodyfikowany na grupie ε-aminowej lizyny przez glicynę. Należy zauważyć, że wpływ na aktywność cytotoksyczną jest uzależniony od długości łącznika między grupą (pochodna akrydyna) a pochodnymi tuftstyny. Związek **97b**, mający dłuższy łącznik (n = 5) wykazywały znacznie niższą cytotoksyczność niż związek **97a** (n = 3). Autorzy przeprowadzili także badania inhibicji katalitycznej aktywności ludzkich topoisomراز DNA typu I i II. Wyniki pokazują, że żaden z badanych związków nie miał istotnego wpływu na rozluźnienie DNA zarówno w przypadku topoisomراز DNA typu I jak i typu II [142].

Ta sama grupa badała również wpływ otrzymanych związków na progresję cyklu komórkowego i indukowania śmierci komórkowej komórek nowotworowych. Badano wpływ zarówno na komórki gruczolakoraka płuc jak i białaczki szpikowej w stężeniach równych toksyczności odpowiadającym stężeniu IC₉₀ [142].

Ostatnio otrzymano nową serię analogów batracyliny (BAT) z pochodnymi tuftstyny/retro-tuftstyny zawierającymi izopeptydowe wiązanie pomiędzy grupą ε-aminową lizyny, a grupą karboksylową alifatycznych aminokwasów, takich jak Gly, Ala, Val, Leu, Ile **100a-l** (Rysunek 22) [143].



R = 2HClxThr-Lys(X)-Pro-Arg(NO₂) (**100a-f**)
or 2HClxArg(NO₂)-Pro-Lys(X)-Thr (**100g-l**)

100a: X= H	100g: X= H
100b: X= Gly	100h: X= Gly
100c: X= Ala	100i: X= Ala
100d: X= Val	100j: X= Val
100e: X= Leu	100k: X= Leu
100f: X= Ile	100l: X= Ile

Rysunek 22 Struktury koniugatów BAT z pochodnymi tuftsyny/retro-tuftsyny **100a-l** [143].

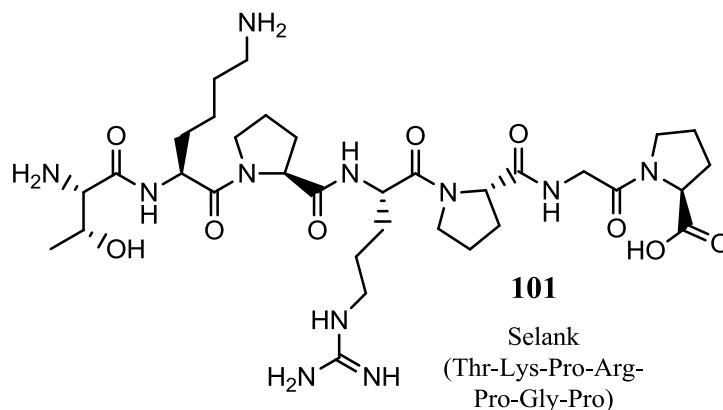
Założenie autorów, że koniugaty BAT z tuftsyną/retro-tuftsyną będą wykazywać większą cytotoksyczność zostało potwierdzone. W przypadku pochodnych BAT z retro-tuftsyną zmodyfikową leucyną **100k** lub izoleucyną **100l**, cytotoksyczności wzrosła ponad 10-krotnie. Autorzy opisują, że BAT jak i cytotoksyczne koniugaty tuftsyny/retro-tuftsyny hamują katalityczną aktywność topoisomerazy DNA typu II i w cytotoksycznych stężeniach szybko wywołują uszkodzenia DNA w komórkach nowotworowych traktowanych lekiem. Zwiększona cytotoksyczność jest prawdopodobnie związane z różnicami w mechanizmie działania na poziomie komórkowym. A zatem powinno mieć to związek z zwiększoną biodostępnością otrzymanych koniugatów. Prowadzi to do znacznie większej akumulacji koniugatów w komórkach nowotworowych, a tym samym skuteczniejszego ich zwalczania [143].

Łącząc H-[TKPKG]₄-NH₂ z metotreksatem (lek przeciwnowotworowy) za pomocą łącznika GFLGC otrzymano koniugat Mtx z pochodną tuftsyny. Wykazywał on lepsze właściwości chemotaktyczne oraz był bardziej toksyczny wobec komórek nowotworu w porównaniu z wolnym lekiem [144].

Stwierdzono, że tuftsyna połączona z przeciwciałem anti-CA125 może powodować ochronę immunologiczną przeciwko rakowi jajnika *in vivo* [145] [146]. Aktywność przeciwnowotworowa może być związana z fagocytozą. Badania białek fuzyjnych opartych na tuftsynie np. Ec-LDP-T wykazały, że związki te są w stanie hamować ludzki nowotwór naskórkowy A431. Uważa się, że białka fuzyjne oparte na tuftsynie i ukierunkowane na EGFR powodują wysoką skuteczność modulacji białka CD47 [145]. Tetrapeptyd połączono również z przeciwciałem poprzez łącznik Ser-Gly-Gly-Gly, w wyniku czego otrzymano białko fuzyjne scFv-tuftsyna. Immunizacja tym białkiem wzmocniła humoralną odpowiedź immunologiczną poprzez zwiększoną produkcję przeciwciał anti-idiotypowych Ab2 i anti-anti-idiotypowych Ab3 [147].

Ponadto badano, czy tuftsyna mogłaby pełnić rolę biomarkera. Peptyd ten połączono z izocyjanianem fluoresceiny (FITC-tuftsyna), Tβ-DOTA ((CH₂CH₂NCH₂CO₂H)₄), a także z pentapeptydem (Thr-Lys-Pro-Pro-Arg). Otrzymane związki zbadano *in vitro* pod kątem właściwości fluorescencyjnych. Wyniki badań potwierdzają, że koniugaty FITC-tuftsyny nadają się do wykrywania komórek makrofagów w organizmie. Okazało się, że Tβ-DOTA z pentapeptydem charakteryzuje się większym powinowactwem do makrofagów niż Tβ-DOTA z samą tuftsyną [148].

Kolejnym ciekawym analogiem tuftsyny jest Selank **101** (Rysunek 23). Dodatkowa sekwencja tripeptudu Pro-Gly-Pro miała na celu poprawę stabilności metabolicznej i wydłużenie okresu półtrwania w organizmie. Wykazuje on właściwości nootropowe i przeciwlękowe, a także działanie antywirusowe. Heptapeptyd w porównaniu z tufstyną słabiej oddziałuje na system immunologiczny, natomiast odznacza się szeregiem innych ciekawych właściwości. Badania na szczurach potwierdzają pozytywny wpływ tego heptapeptydu na procesy uczenia się i pamięci. Sprawdzone, również działanie przeciwwirusowe tego heptapeptydu, przeciwko wirusowi grypy typu A (H_3N_2) *in vitro* i *in vivo*. Badania wykazują, że wprowadzenie Selanku *in vivo* wywołuje ekspresję genu IFN- α , bez wpływu na ekspresję genów IL-4, IL-10 i TNF- α . Mechanizm przeciwwirusowy, najprawdopodobniej związany jest ze zdolnością peptydu do modulowania równowagi cytokin Th1/Th2. Kolejną ciekawą właściwością Selanku, jest to, że może on uczestniczyć w regulacji procesów zapalnych w organizmie. Przeanalizowano ekspresję 84 genów zaangażowanych w procesy stanu zapalnego (m.in. chemokiny, cytokiny i ich receptory) w śledzionie myszy. Dalsze badania wykazały, że gen BCL6, który odgrywa kluczową rolę w rozwoju układu odpornościowego, odznaczał się znaczącą zmianą poziomu ekspresji w odpowiedzi na podanie heptapeptydu. Selank oraz jego fragmenty powodują szereg zmian w ekspresji genów zaangażowanych w stany zaplane. Otrzymane wyniki potwierdzają udział peptydu w procesach regulacji stanu zapalnego w organizmie [149].

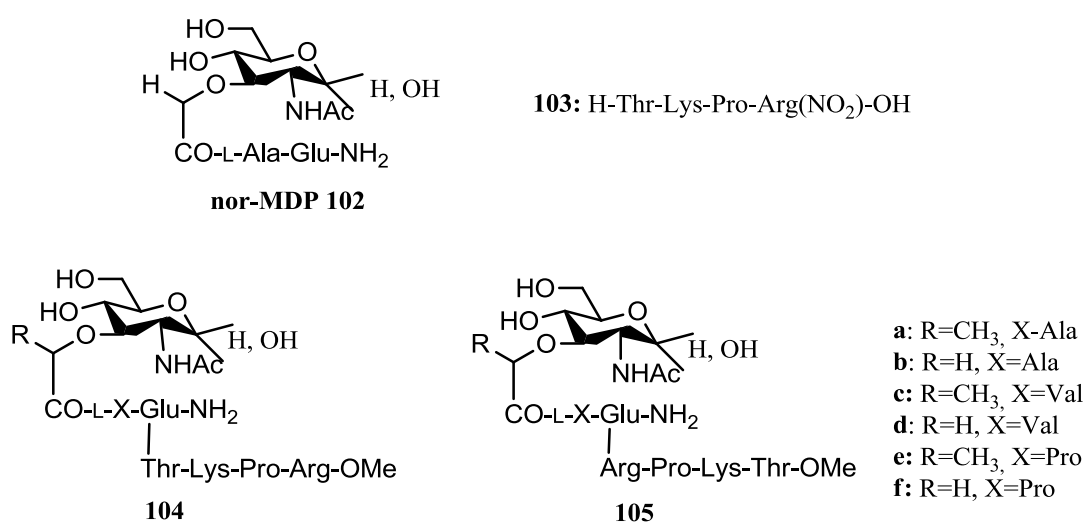


Rysunek 23. Struktura analogu tuftsyny – Selanku **101** [149].

W ostatnich latach dużym zainteresowaniem wielu pracowni chemicznych i biologicznych cieszy się koniugat tuftsyny (i jej analogów) z fosforylowaną choliną (TPC) [150] [151] [152] [153] [154]. Stwierdzono, że koniugat ten miał zdolność osłabienia rozwoju kłębuszkowego zapalenia nerek. Zdecydowanej poprawie uległy wyniki dotyczące białkomoczu u myszy a także nastąpiło zmniejszenie odkładania immunoglobulin w mezangium nerkowym [150]. Przeprowadzono ponadto badania z wykorzystaniem koniugatu TPC na mysim modelu zapalenia stawów indukowanym kolagenem (CIA) (model reumatoidalnego zapalenia stawów). Zauważono działanie immunomodulujące TPC, które było związane: ze znacznym zmniejszeniem zapalenia stawów, zapobieganiem uszkodzeniom stawów wraz z immunomodulacją profilu cytokin i wzmocnieniem ekspansji regulatorów limfocytów T i B. Badania te wykazały zdolność koniugatu TPC do łagodzenia zapalenia stawów u myszy [151].

T-peptyd jest analogiem tuftsyny o następującej strukturze (Thr-Lys-Pro-Arg)₄-Lys₂-Lys-Gly-OH stabilną budową i dłuższym czasem półtrwania w porównaniu z tuftsyną. Stwierdzono, że T-peptyd może być zastosowany jako potencjalny pooperacyjny adiuwant w terapii nowotworów. Peptyd ten wykazywał hamujący wpływ na wzrost pozostałych po operacji komórek nowotworowych [155]. Sprawdzono wpływ T-peptydu na odporność komórkową w obecności lipopolisacharydu (LPS) a także wskaźnik przeżycia u myszy septycznych. T-peptyd regulował proliferację komórek T CD4⁺ CD25⁻. Ponadto, związek ten poprawia przeżywalność septycznych myszy, w zależności od stosowanej dawki i czasu [156].

Badania przeprowadzone pod kierunkiem Dzierzbickiej i Trzonkowskiego [157] dotyczyły nor-muramyldipeptydów **102** oraz koniugatów muramyldipeptydów z tuftsyną **104** a także z retro-tuftsyną **105** (Rysunek 24). Muramyldipeptyd wchodzi w skład peptydoglikanu, który jest składnikiem ściany komórkowej bakterii. Odpowiedzialny on jest za stymulację różnych funkcji makrofagów a także zwiększa nieswoistą odpowiedź organizmu przeciwko znacznej liczbie czynników infekcyjnych. Oceniono właściwości immunomodulujące koniugatów MDP z tuftsyną jako nowe potencjalne leki. Dobrą aktywnością *in vivo* w mysim modelu sepsy wykazywały trzy związki: *N*-acetylo-muramylo-L-alanylo-D-izoglutamylo-L-treonylo-L-lizylo-L-proliło-L-arginina, *N*-acetylo-muramylo-L-walilo-D-izoglutamylo-L-treonylo-L-lizylo-L-proliło-L-arginina oraz L-treonylo-L-lizylo-L-proliło-L-arginina. Pierwszy związek z wymienionych charakteryzował się najwyższą skutecznością, spowodował zmniejszenie liczby bakterii w organizmie, co wiąże się ze wzrostem aktywności makrofagów we wszystkich badanych tkankach a także zwiększył wydzielanie IL-10 (inne związki stymulowały głównie IL-6). Wzrost poziomu przeciwzapalnych czynników t.j. IL-10 w przypadku sepsy i wstrząsu septycznego, może być szczególnie korzystny, gdyż są one zdolne do zatrzymania lub chociażby opóźnienia rozwoju wstrząsu septycznego [157].



Rysunek 24. Struktury nor-MDP **102**, pochodnej tuftsyny **103** i koniugatów MDP z tuftsyną **104** i retro-tuftsyną **105** [157].

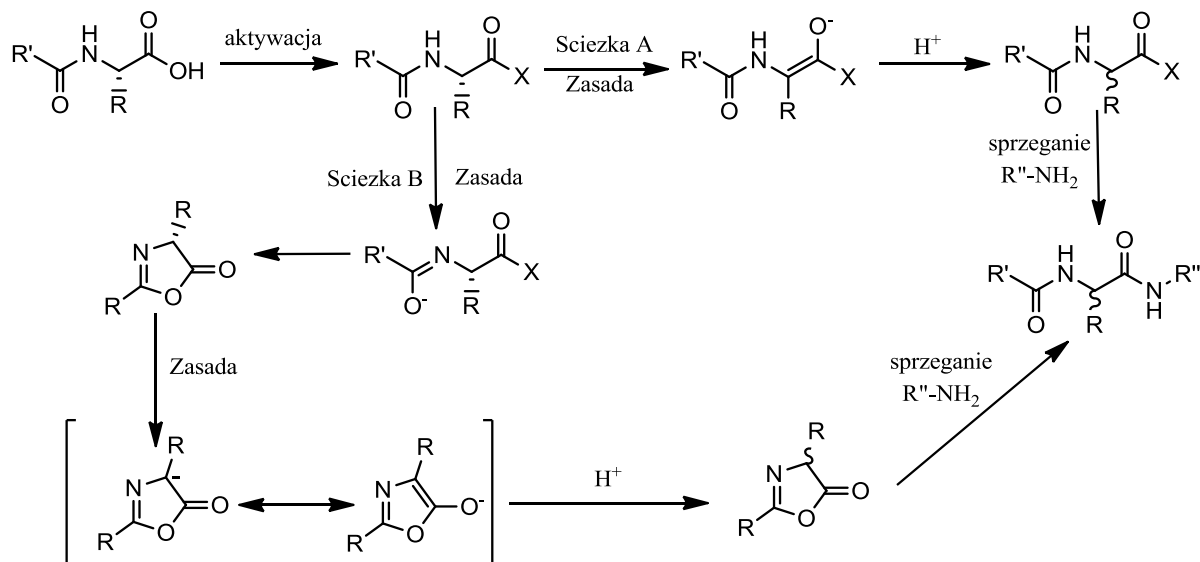
Muramyłodipeptyd (MDP) oprócz makrofagów i monocytów, stymuluje także komórki dendryczne (DC), które odgrywają ważną rolę w indukowaniu swoistej odpowiedzi immunologicznej. W wyniku rozwoju choroby następuje spadek aktywności DC, co jest rezultatem hamowania dojrzewania komórek, uniemożliwiając prezentowanie antygenów komórkom immunokompetentnym a tym samym blokując odpowiedź immunologiczną. Badania przeprowadzone za pomocą metody cytometrii przepływowej wykazały wpływ koniugatów tuftsyny z MDP na stymulowanie dojrzewania oraz na aktywność komórek DC otrzymanych z ludzkich monocytów [158].

Podczas leczenia kryptokokowego zapalenia opon mózgowych u myszy z leukopenią zastosowano liposomy z przyłączoną do powierzchni tuftsyną zmodyfikowaną na C-końcu (Thr-Lys-Pro-Arg-NH-(CH₂)₂-NH-COC₁₅H₃₁) [159]. Taka modyfikacja ma ułatwić przyłączenie do podwójnej warstwy liposomów. Analizując wyniki tych badań, można zaobserwować wzrost aktywności mysich makrofagów otrzewnowych. Udowodniono, że liposomalna nystatyna z tuftsyną jest skuteczniejsza, bezpieczniejsza oraz bardziej stabilna niż liposomalna nystatyna bez tuftsyny. Podanie tuftsyny z liposomalną nystatyną zwiększa jej aktywność przeciw *Cryptococcus*. Ze względu na obecność receptorów na makrofagach, liposomalna tuftsyna służy również jako transporter leku, specyficznym dostarczając go do odpowiednich miejsc, w infekcjach t.j. malaria [160], gruźlica i leiszmanioza [161].

3. Odczynniki kondensujące w tworzeniu wiązania amidowego

Tworzenie wiązania amidowego pomiędzy grupą karboksylową oraz aminową aminokwasów jest kluczowym etapem syntezy peptydów. Generalnie rzecz biorąc tworzenie wiązania amidowego polega na reakcji substytucji nukleofilowej funkcji aminowej na aktywną pochodną kwasu karboksylowego (Schemat 8). Ze względu na fakt, iż w mojej pracy syntetycznej jednym z podstawowych procesów było tworzenie wiązania amidowego, w niniejszym rozdziale przedstawiam krótki przegląd odczynników kondensujących używanych do utworzenia właśnie tego wiązania. W literaturze chemicznej znanych jest szeroka gama tzw. środków kondensujących [162].

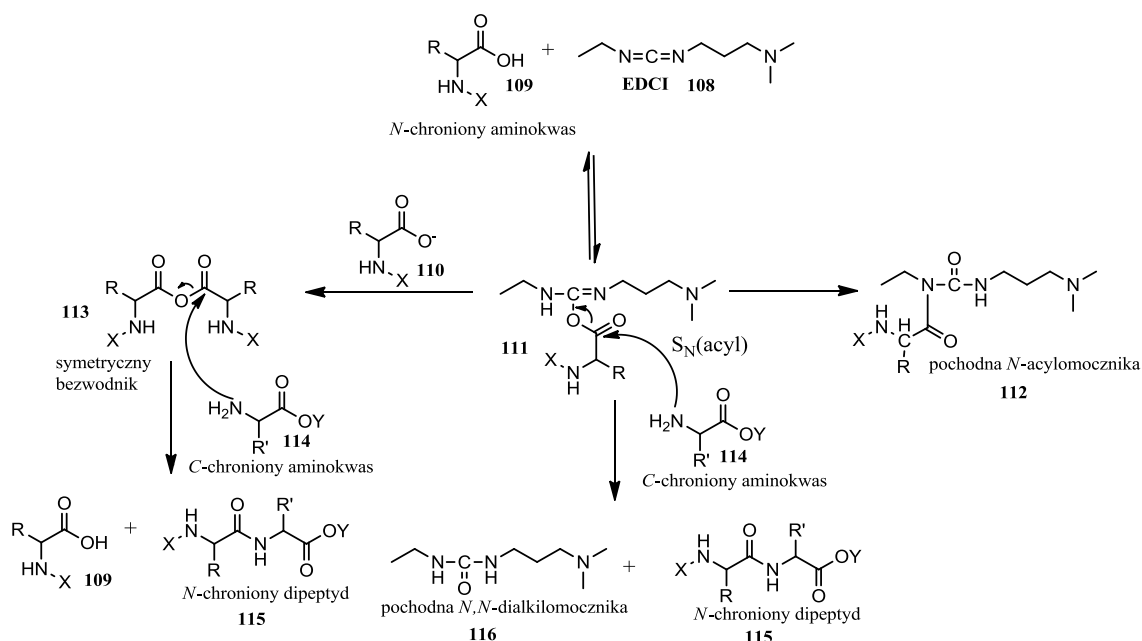
zasadą [166]. Aby zapobiec racemizacji dodaje się nukleofil, który reaguje szybciej niż amina i tworzy pośredni reaktywny produkt mogący dalej reagować z tą aminą. Nukleofilem takim może być DMAP czy HOBt. W przypadku karbodiimidów inną reakcją uboczną stanowi *N-O* migracja aktywowanej funkcji karboksylowej, tworząc stabilny mocznik *N*-acylowy. Stosowanie niskiej temperatury 0°C znacznie ogranicza powstawanie tego produktu ubocznego.



Schemat 9. Mechanizm racemizacji katalizowanej zasadą podczas aktywacji.

DIC lub DIPCDI (diizopropylkarbodiimid) **107** (Rysunek 25) jest odczynnikiem stosowanym podczas syntezy peptydów na fazie stałej. Tworzący się w tej reakcji *N,N'*-dziizopropylomocznik, można łatwiej usunąć ze środowiska reakcji niż *N,N'*-dicykloheksylomocznik w przypadku DCC [162] [167] [168].

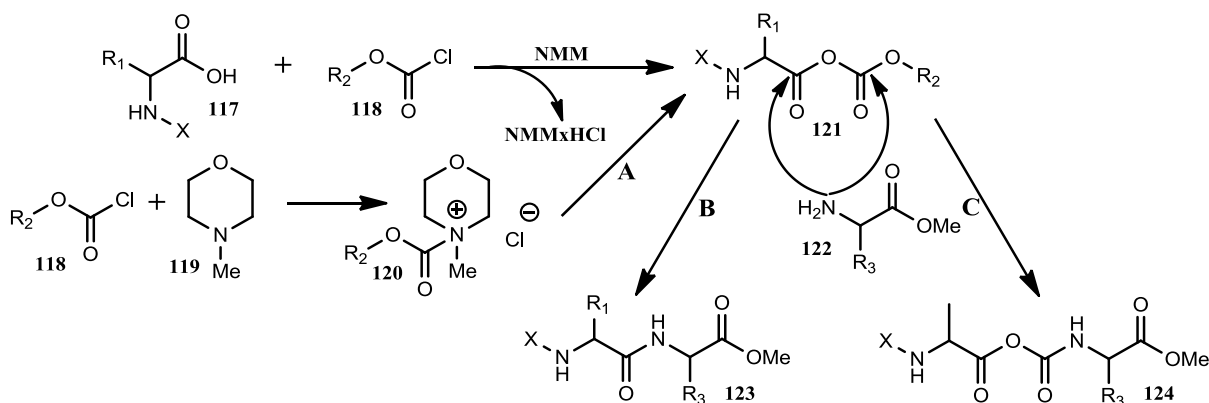
Innym szeroko stosowanym odczynnikiem kondensującym z grupy karbodiimidów jest EDCI czyli chlorowodorek 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl) karbodiimid **108** (Rysunek 26). W reakcji tworzenia wiązania peptydowego z użyciem EDCI obok amidu powstaje *N,N*-dialkylaminomocznik **116**, który łatwo jest odmyć z mieszaniny reakcyjnej rozcieńczonym kwasem mineralnym. Z tego też powodu odczynnik kondensujący EDCI jest z powodzeniem stosowany do syntezy prowadzonej w roztworze [169]. Synteza wiązania amidowego z wykorzystaniem karbodiimidów polega na przekształceniu grupy karboksylowej w reaktywny czynnik acylujący tj. *O*-acylomocznik **111**. Kolejno następuje atak nukleofilowy na węgiel karbonylowy w wyniku czego powstaje amid **115** i *N,N*-dialkilomocznik **116**. Procesem konkurencyjnym w tego typu przemianie jest migracja *O-N* acylu, co prowadzi do powstania *N*-acylomocznika **112**. Pochodna *O*-acylomocznika **111** może również reagować z grupą karboksylową aminokwasu **110** tworząc bezwodnik **113**, który w wyniku reakcji $S_N(\text{acyl})$ z *C*-chronionym aminokwasem prowadzi do otrzymania chronionego dipeptydu **115** (Schemat 10) [170].



Schemat 10. Mechanizm otrzymywania peptydu z wykorzystaniem odczynnika kondensującego EDCI [170].

3.2. Mieszane bezwodniki

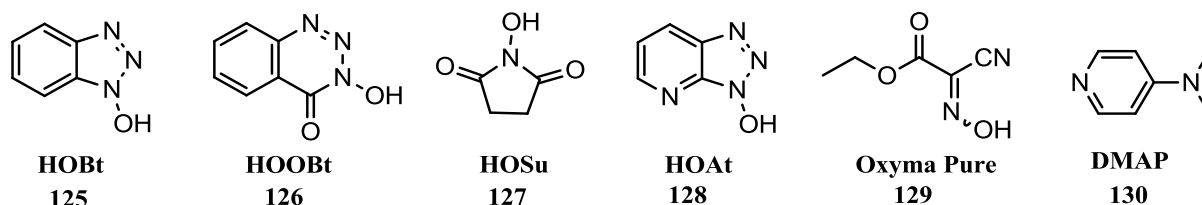
Kolejną metodą tworzenia wiązania peptydowego jest procedura mieszanych bezwodników z użyciem chloromrówczanu alkilu (najczęściej chloromrówczan izobutyłu). W wyniku reakcji *N*-chronionego aminokwasu **117** z chloromrówczanem alkilu **118** w obecności trzeciorzędowej aminy np. NMM **119**, tworzony jest mieszany bezwodnik **121**. Proces ten przebiega bardzo szybko. Metoda z wykorzystaniem mieszanych bezwodników różni się od procedury z użyciem karbodiimidów tym, że ta pierwsza może być stosowana do acylowania aminokwasów bądź anionów peptydów w częściowo uwodnionych rozpuszczalnikach organicznych. Synteza peptydów metodą mieszanych bezwodników powinna być prowadzona w niskiej temperaturze (np. -15°C). Pozwala to, na ograniczenie reakcji ubocznych takich jak np. aminoliza chloromrówczanów a także tworzenie uretanów **124** (ścieżka C). Reakcji aminolizy można zapobiec unikając nadmiaru stosowanego chloromrówczanu a także unikając wydłużenia czasu reakcji aktywacji *N*-chronionego aminokwasu. Reakcja ta została zoptymalizowana poprzez stosowanie: czasu aktywacji ok. 1-2 minuty, temperatury -10°C do -15°C a także zastosowanie NMM w bezwodnym rozpuszczalniku innym niż chloroform czy dichlorometan (Schemat 11) [170].



Schemat 11. Tworzenie wiązania peptydowego z wykorzystaniem metody mieszanych bezwodników [170].

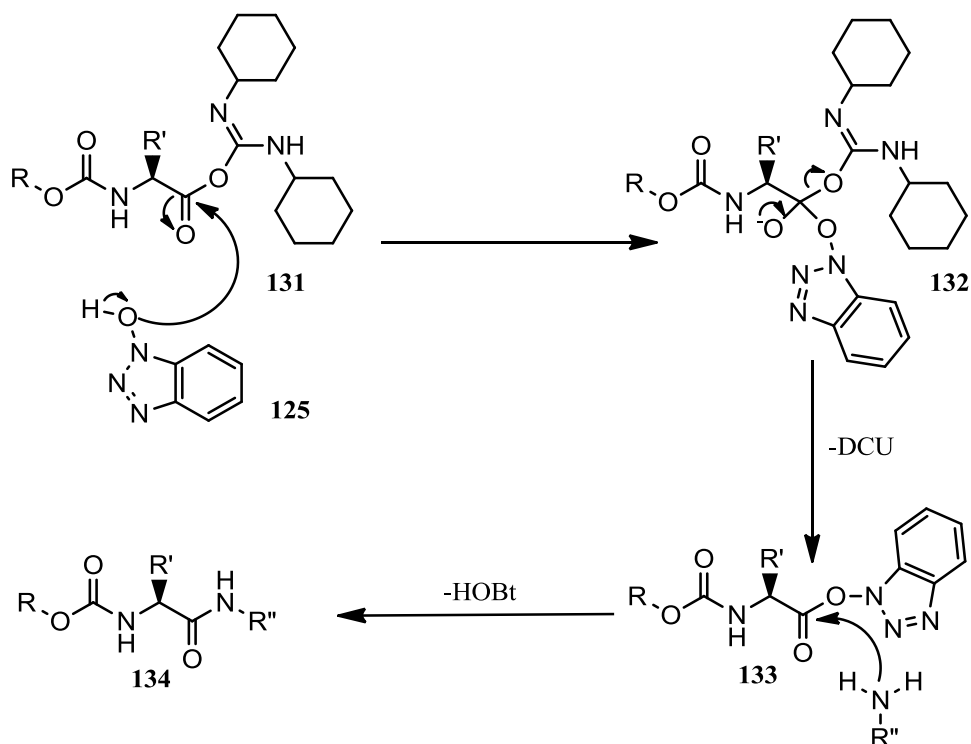
3.3. Związki wspomagające reakcję kondensacji

Jak już wcześniej wspomniałam w celu tworzenia wiązania amidowego z wykorzystaniem karbodiimidów zalecane jest stosowanie substancji dodatkowych takich jak: HOBt **125**, HOObt **126**, HOSu **127**, HOAt **128**, Oxyma Pure **129** czy DMAP **130** (Rysunek 26). Umożliwiają one zwiększenie reaktywności oraz ograniczenie tworzenia epimerów a także pochodnych *N*-acylomocznika.



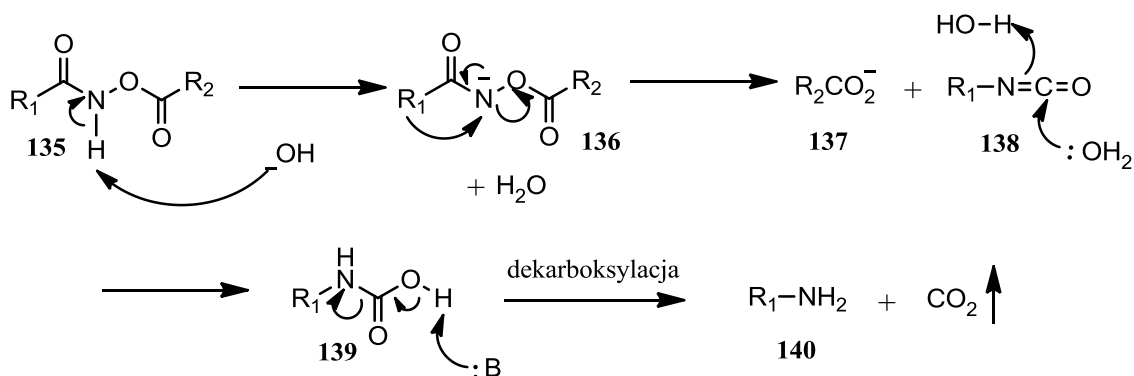
Rysunek 26. Struktury związków wspomagających reakcję kondensacji.

HOBt (*N*-hydroksybenzotriazol) **125** (Rysunek 26), otrzymany w 1970 roku jest jednym z najbardziej popularnych środków antyracemizacyjnych. HOBt obniża zasadowość środowiska reakcji, zmniejszając stopień racemizacji. Jego największą wadą jest fakt, że bezwodny HOBt jest związkiem wybuchowym. Dlatego występuje jako monohydrat rozpuszczalny w DMF czy THF [162] [166] [169] [171].



Schemat 12. Mechanizm syntezy peptydu metodą DCC/HOBt.

HOSu (*N*-hydroksysukcynoimid) **127** (Rysunek 27) w przeciwieństwie do HOBt **118** jest całkowicie stabilny i nie wybuchowy. Wadę HOSu stanowi struktura *O*-acylowanego kwasu hydroksamowego, który może ulegać konwersji do izocyjanianów na drodze przegrupowania Lossena (Schemat 12) [164] [163].

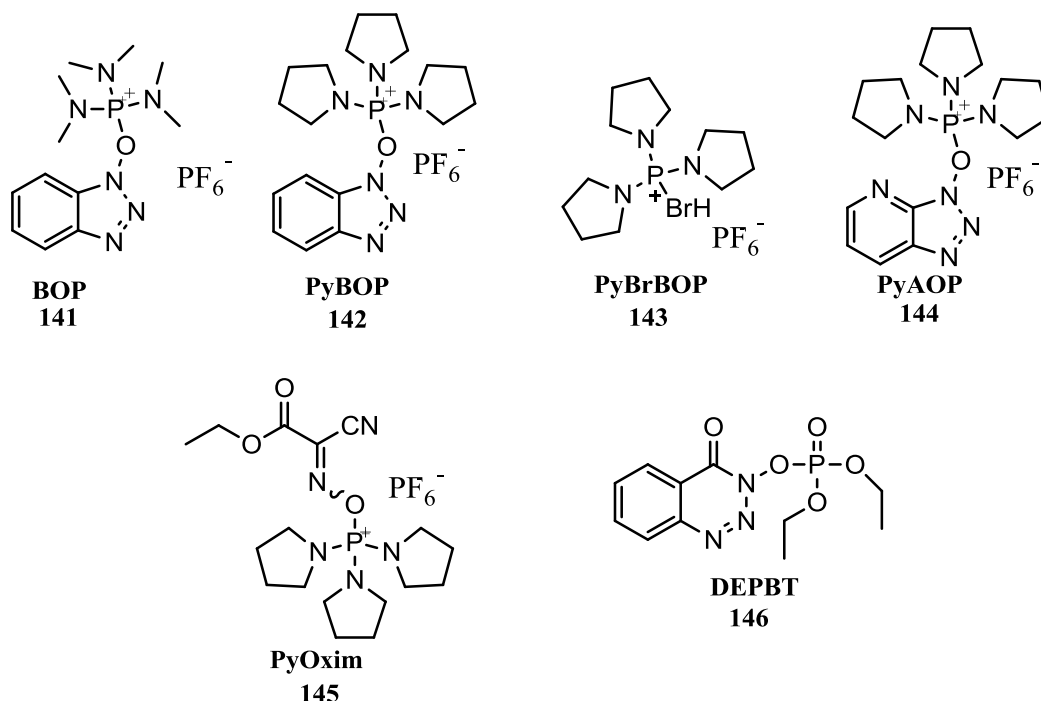


Schemat 13. Konwersja kwasu hydroksamowego do izocyjanianu.

Kolejnym odczynnikiem antyracemizacyjnym jest HOAt (1-hydroksy-7-azobenzotrazol) **128** (Rysunek 26), który lepiej niż HOBt przyspiesza reakcję sprzęgania. Niestety jego wybuchowość ogranicza jego zastosowanie i dostępność [168] [172]. Szeroko stosowana ze względu na problem racemizacji jest również 4-(*N,N*-dimetyloamino)pirydyna DMAP **130** (Rysunek 28), pełniąc również funkcję zasady. Odczynnik ten charakteryzuje się wysoką toksycznością i jest uznawany za niebezpieczny, ze względu na jego zdolność do wchłaniania przez skórę. Jest także żrący [173] [174].

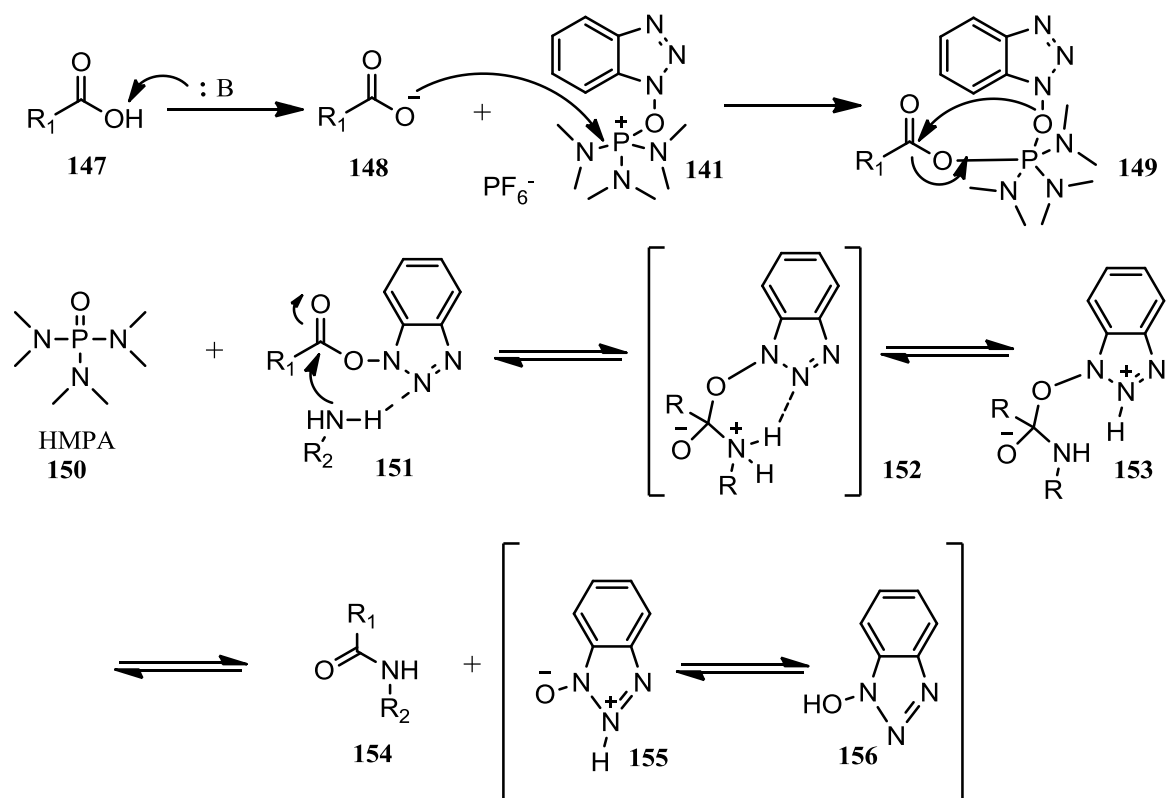
3.4. Odczynniki fosfoniowe

W ostatnich latach popularne stały się również odczynniki fosfoniowe i amonowe takie jak: BOP, PyBOP, PyBrOP, TBTU, HBTU, HATU, COMU i TFFH. Związki te osiągają wysokie stopniem kondensacji kwasu karboksylowego z aminą.



Rysunek 27. Struktury fosfoniowych odczynników kondensujących.

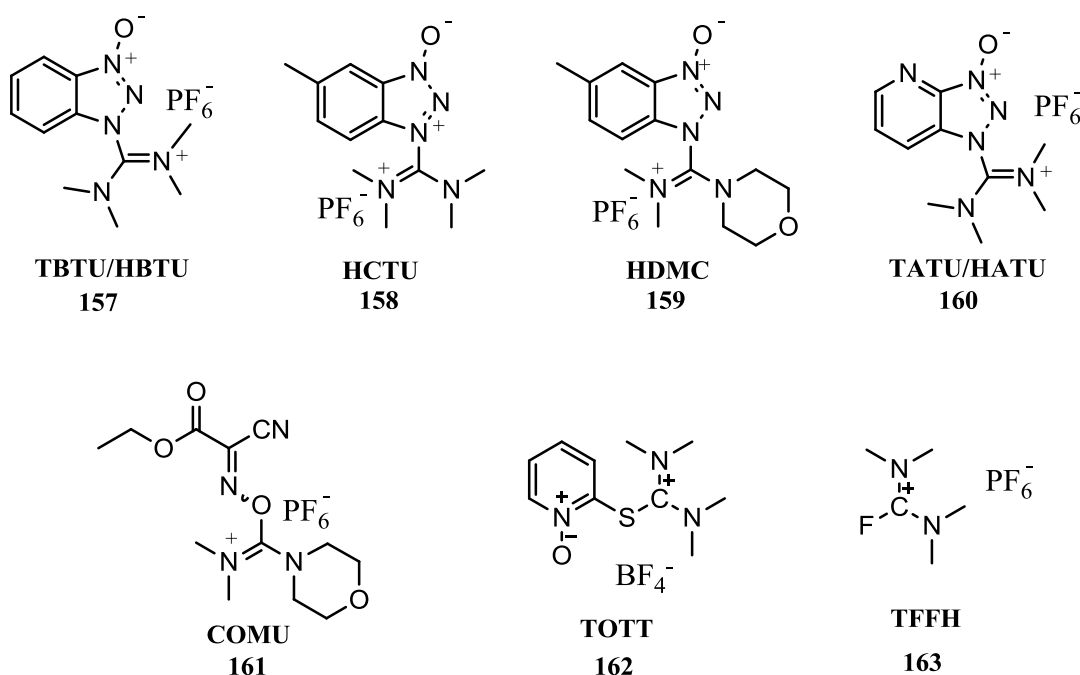
BOP (heksafluorofosforan benzotriazolo-1-iloksy-tris(dimetyloamino) fosfonowy) **141** (Rysunek 27) był pierwszym stosowanym fosfoniowym odczynnikiem kondensującym. Odczynnik ten gwarantuje wysokie wydajności reakcji sprzęgania a ponadto charakteryzuje się dobrą rozpuszczalnością w większości rozpuszczalników organicznych. Stosowany jest zarówno w syntezie na fazie stałej jak i w roztworze. Związek ten z powodzeniem używany jest podczas laktonizacji, selektywnej estryfikacji oraz tworzenia wiązania peptydowego, bez racemizacji. Jego poważną wadą jest kancerogenne działanie powstające podczas reakcji sprzęgania heksametylofosforoamidu HMPA [175] [176]. Na rynku dostępna jest także nietoksyczna pochodna BOP – PyBOP **142** (Rysunek 28), która jest równie dobrym odczynnikiem sprzęgającym jak BOP stosowanym podczas syntezy peptydów na fazie stałej [177] [178]. Reakcje tworzenia wiązania amidowego z zastosowaniem odczynnika kondensującego BOP **141** przedstawiłam na Schemacie 14.



Schemat 14. Mechanizm reakcji tworzenia wiązania amidowego z wykorzystaniem odczynnika kondensującego BOP 141.

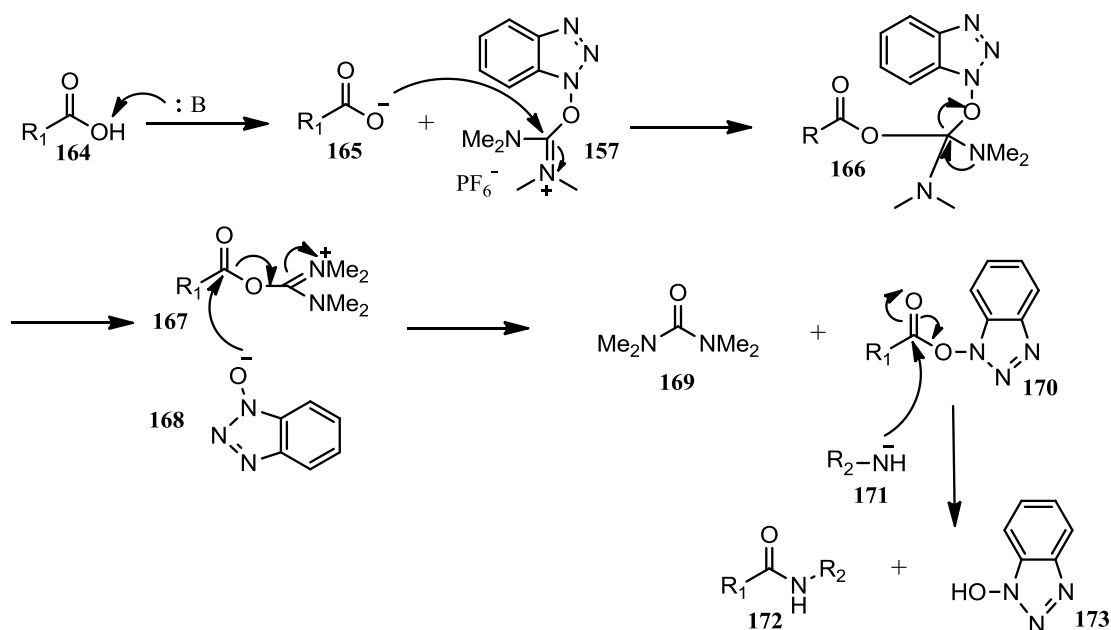
Kolejnym bardzo efektywnym fosforowym odczynnikiem kondensującym jest PyOxim **145**, który został wprowadzony do syntezy organicznej w 2010 roku [179]. Największą zaletą tego środka kondensującego są wysokie wydajności procesu kondensacji. PyOxim obniża racemizację i epimeryzację, a także daje bardzo dobre efekty w syntezie cyklicznych peptydów [179]. Ponadto w literaturze chemicznej znanych jest szereg fosforowych odczynników sprzęgających, do których należą również: PyBrOP **143**, PyAOP **144** oraz DEPBT **146**.

3.5. Odczynniki amoniowe/uronioowe

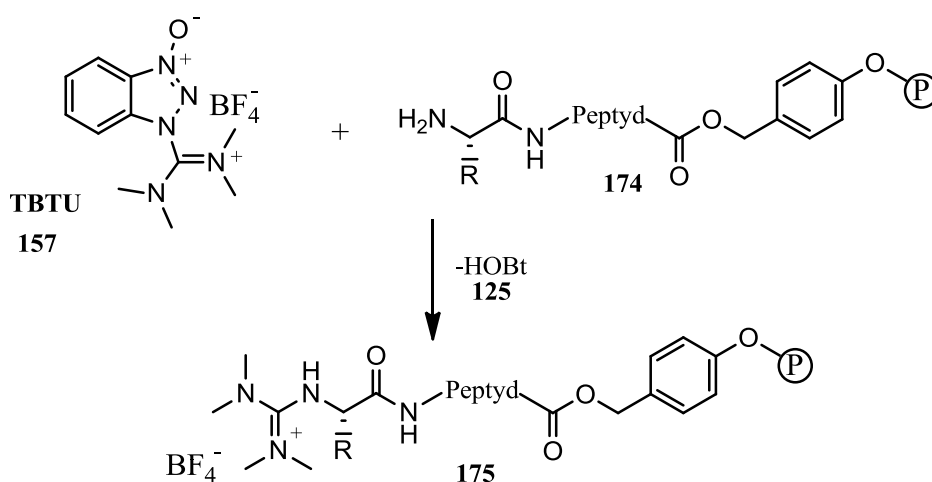


Rysunek 28. Struktury amonowych/uronioowych odczynników kondensujących 130-136.

TBTU/HBTU (tetrafluoroboran/heksafluorofosforan *O*-benzotriazolo-1-yl-*N,N,N',N'*-tetrametylomocznik) **157** (Rysunek 28) są bardzo popularnymi odczynnikami sprzęgającymi. Różnią się jedynie przeciwjonami BF_4^- i PF_6^- . Posiadają prawie identyczne właściwości chemiczne a ich aplikacja jest rozpowszechniona w syntezie na fazie stałej jak i w roztworze, gdyż tworzą produkty rozpuszczalne w wodzie oraz w standardowych rozpuszczalnikach organicznych [166] [169]. Ograniczeniem dla stosowania odczynników amonowych jest możliwa reakcja grupy aminowej z TBTU tworząc pochodne guanidynowe (Schematy 15 i 16). Reakcję tą można zahamować poprzez dodanie niewielkiego nadmiaru substratu z wolną grupą karboksylową w stosunku do odczynnika kondensującego a także stosując krótki czas aktywacji przed dodaniem substratu z wolną grupą aminową. Stosowanie odczynnika sprzęgającego HCTU (heksafluorofosforan 2-(6-dichloro-1*H*-benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetrametyloamoniowy) **158** (Rysunek 28) prowadzi do wyższych wydajności reakcji. Związek ten stosowany jest podczas syntezy peptydów o skomplikowanej budowie [162] [180].



Schemat 15. Mechanizm tworzenia wiązania amidowego z wykorzystaniem odczynnika kondensującego HBTU **157**.



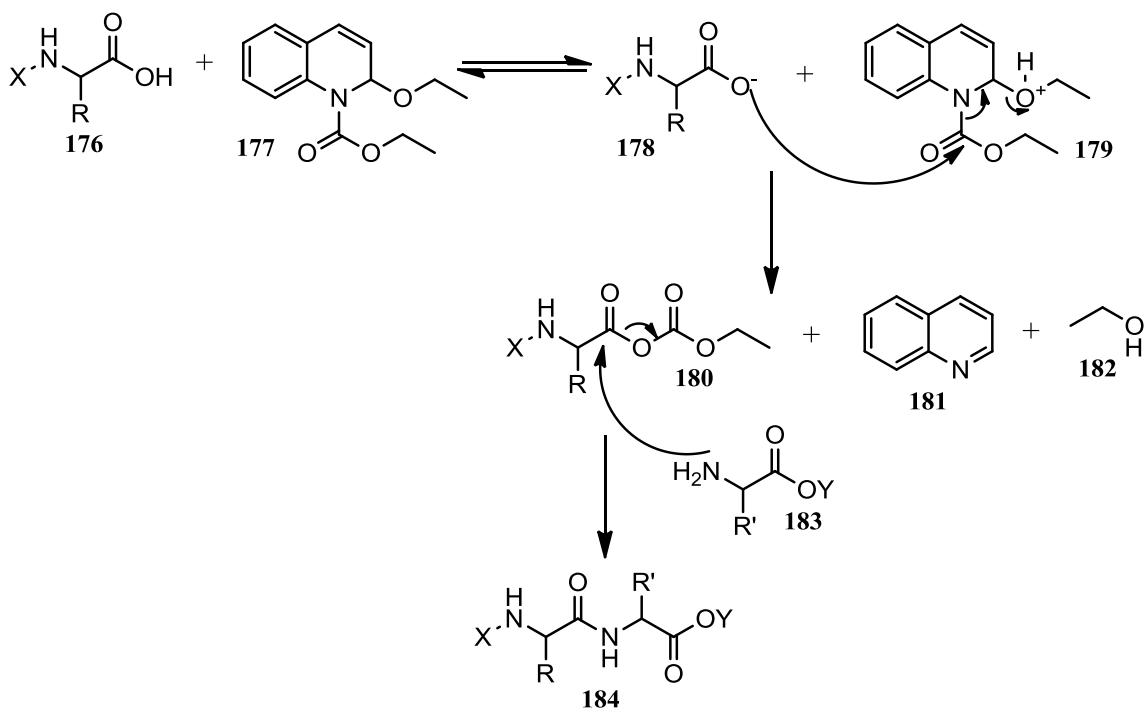
Schemat 16. *N*-terminalna guanidylacja podczas sprzęgania.

Modyfikując część uroniową HCTU poprzez wprowadzenie grupy morfolinowej otrzymano HDMC (*N*-tlenek heksafluorofosforanu *N*-[(5-chloro-1*H*-benzotriazol-1-yl)-dimetyloamino-morfolino]-uroniowego) **159** (Rysunek 28). Modyfikacja ta pozwoliła na zwiększenie reaktywności tego związku w porównaniu do HCTU **158** [181]. Otrzymany w 2008 roku COMU (heksafluorofosforan 1-[1-cyano-2-etoksy-2-oksoetylidenoaminooksy)-dimetyloamino-morfolino]-uroniowy) **134** jest bezpieczniejszy w użyciu, lepiej rozpuszczalny w rozpuszczalnikach organicznych oraz charakteryzuje się zminimalizowanym ryzykiem reakcji alergicznych w porównaniu do HBTU/TBTU **157**. Odczynnik szczególnie nadaje się do stosowania podczas syntezy na fazie stałej z użyciem fal mikrofalowych. COMU **161** (Rysunek 28) można wykorzystać do syntezy estrów wszystkich rodzajów alkoholi w temperaturze pokojowej a także w łagodnych warunkach w obecności organicznych zasad [182]

[183]. Do tej grupy odczynników sprzęgających należą również: TATU/HATU **160**, TOTT **162** oraz TFFH **163**.

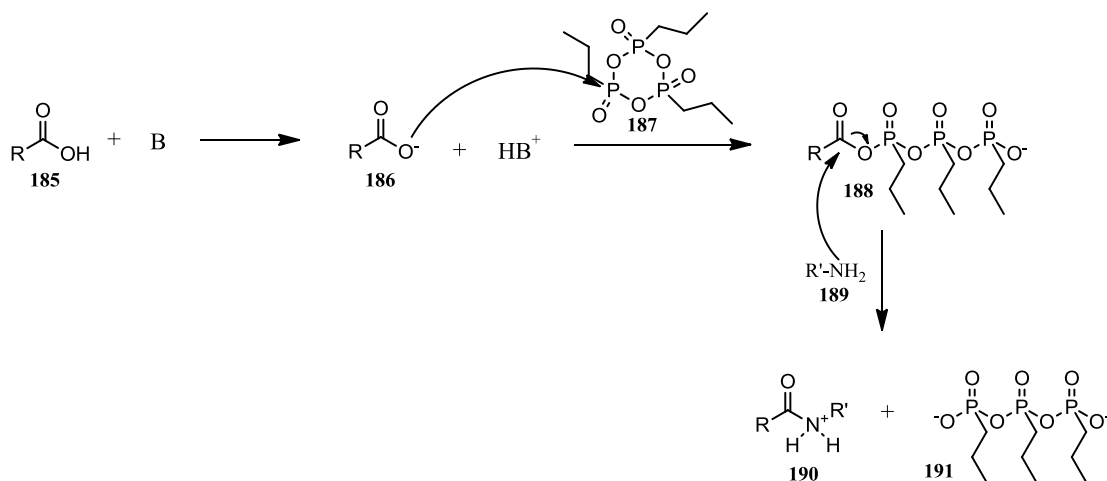
3.6. Inne odczynniki kondensujące

EEDQ (*N*-etoksykarbonylo-2-etoksy-1,2-dihydrochinolina) **177** otrzymana w 1967 roku jest stosowanym odczynnikiem kondensującym, od dawna cieszącym się dużym zainteresowaniem. EEDQ aktywuje grupę karboksylową *N*-chronionego aminokwasu **139**, dając mieszaną bezwodnik **180**, który w reakcji S_N(acyl) reaguje z grupą aminową *C*-chronionego aminokwasu **183** prowadząc do dipeptydu **184** (Schemat 17). Reakcja nie wymaga obecności trzeciorzędowych zasad, a także może być stosowana w przypadku aminokwasów zawierających wolną grupę hydroksylową. Chociaż tworzenie bezwodnika jest powolne to atak nukleofilowy grupy aminowej jest bardzo szybki, co minimalizuje racemizację [184] [185].



Schemat 17. Mechanizm tworzenia peptydu za pomocą odczynnika kondensującego EEDQ **138** [170].

Bezwodnik kwasu propanofosfonowego określany skrótem T3P **187**, stosowany jest w połączeniu z aminami trzeciorzędowymi, gdyż jest podatny na otwarcie pierścienia pod wpływem nukleofila – anionu karboksylanowego **186** generowanego zasadą (np. TEA). W wyniku otwarcia pierścienia powstaje produkt przejściowy mieszaną bezwodnik acylowo-fosfonowy **188**. Aktywacja grupy karboksylowej umożliwia podstawienie nukleofilowe na acylowanym atomie węgla. W reakcji aminy **189** daje on amid **190** (Schemat 18) [170].



Schemat 18. Mechanizm tworzenia wiązania amidowego wykorzystując T3P **148** [170].

Środek kondensujący T3P **187** z powodzeniem był stosowany do syntezy peptydów z zawadą przestrzenną. Ponadto reakcja przebiega w łagodnych warunkach, zapewnia wysoką wydajność, niski stopień epimeryzacji oraz łatwą izolację produktów. W tym miejscu należy dodać, że bezwodnik kwasu propanofosfonowego jest bezpiecznym w użyciu odczynnikiem, ponieważ jest nietoksyczny i nie powoduje reakcji alergicznych a powstające produkty syntezy tj. sole fosfonowe są rozpuszczalne w wodzie a tym samym łatwe do usunięcia ze środowiska reakcji [186] [187].

CEL PRACY

W ramach realizacji swojej pracy doktorskiej w Katedrze Chemii Organicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej zaplanowałam syntezy aminokwasowych i peptydowych analogów kwasu mykofenolowego oraz ocenę ich aktywności biologicznej i mikrobiologicznej.

Połączenie zarówno aminokwasów, jak i peptydów z cząsteczką MPA powinno umożliwić zmniejszenie toksyczności tego typu pochodnych. Ponadto, jak wynika z danych literaturowych, w wyniku działania addytywnego/synergistycznego reszt oligopeptydowych i cząsteczki MPA, istnieje potencjalna możliwość zwiększenia aktywności przeciwnowotworowej czy immunosupresyjnej otrzymanych związków.

Realizując swoją rozprawę doktorską, ten duży projekt podzieliłam na zadania cząstkowe tj:

- przeprowadzenie badań literaturowych dotyczących kwasu mykofenolowego i jego pochodnych;
- przeprowadzenie badań literaturowych dotyczących tuftsyny i jej pochodnych;
- opracowanie optymalnej drogi kondensacji aminokwasów z kwasem mykofenolowym;
- opracowanie optymalnej metody syntezy tetrapeptydów: tuftsyny retro-tuftsyny oraz ich analogów;
- opracowanie optymalnej metody kondensacji otrzymanych oligopeptydów z kwasem mykofenolowym;
- badania aktywności immunosupresyjnej otrzymanych pochodnych w tym:
 - ✓ testy żywotności MTT, sprawdzające toksyczność otrzymanych związków wobec linii komórkowej Jurkat i PBMC;
 - ✓ testy aktywności antyproliferacyjnej otrzymanych związków wykorzystujące VPD450 wobec linii komórkowej Jurkat i PBMC;
 - ✓ przeprowadzenie testów selektywności efektu działania otrzymanych związków wobec IMPDH poprzez badanie aktywności antyproliferacyjnej z wykorzystaniem VPD450 wobec linii komórkowej PBMC z dodatkiem GMP;
- badania aktywności przeciwnowotworowej wybranych pochodnych w tym:
 - ✓ testy żywotności XTT, sprawdzające aktywność wybranych związków na liniach nowotworowych: czerniaka chomika Bomirskiego Ab, czerniaka ludzkiego A375 oraz neuroblastomy ludzkiej SHSY5Y
 - ✓ porównanie aktywności wybranych związków oraz MPA w stosunku do stosowanych chemoterapeutyków tj. dakarbazyny i cisplatyny.
- badania aktywności przeciwbakteryjnej w tym:
 - ✓ testy na pięciu referencyjnych szczepach bakteryjnych: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (ESBL), *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300, *Staphylococcus aureus* MSSA ATCC 25923 a także wyznaczenie wartości MIC dla wszystkich otrzymanych związków;

- ✓ porównanie aktywności wszystkich otrzymanych przeze mnie koniugatów MPA do stosowanych antybiotyków kanamycyny i ampicyliny.

Prace syntetyczne prowadziłam w Katedrze Chemii Organicznej Politechniki Gdańskiej. Badania biologiczne sprawdzające aktywność immunosupresyjną wykonywałam samodzielnie w Zakładzie Immunologii Klinicznej i Transplantologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Badania biologiczne oceniające aktywność przeciwnowotworową były przeprowadzone we współpracy z Zakładem Embriologii oraz Zakładem Medycyny Laboratoryjnej w Gdańskim Uniwersytecie Medycznym. Natomiast badania mikrobiologiczne wykonywane były w Katedrze Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej.

BADANIA WŁASNE

1. Prace syntetyczne

Część syntetyczna mojej pracy obejmowała: syntezę nowych aminokwasowych analogów kwasu mykofenolowego zarówno w postaci estrów metylowych **199-205**, jak i z wolną grupą karboksylową **206-211**, syntezę tetra- **220**, **229** i pentapeptydów **237-242**, **250-255**, a ponadto opracowanie syntezy analogów tych peptydów z cząsteczką MPA **270-276** i **285-291**.

1.1. Synteza aminokwasowych pochodnych MPA

1.1.1. Synteza aminokwasowych pochodnych MPA w postaci estrów metylowych 199-205

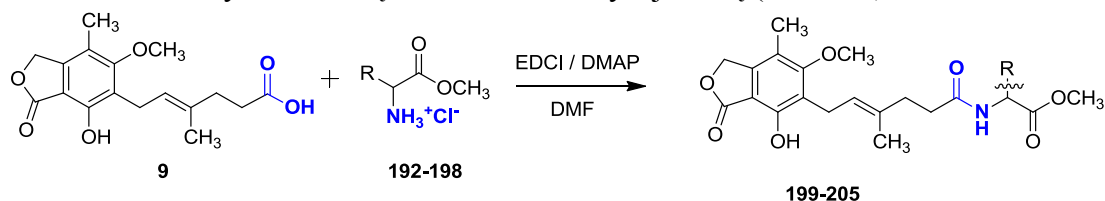
W celu otrzymania aminokwasowych pochodnych MPA, należało utworzyć wiązanie amidowe pomiędzy grupą aminową należącą do aminokwasów oraz grupą karboksylową cząsteczki MPA. W Katedrze Chemii Organicznej Politechniki Gdańskiej opracowano metodę syntezy oraz opisano połączenia aminokwasów (takich jak: glicyna, alanina, walina, kwas glutaminowy, leucyna i fenyloalanina) z kwasem mykofenolowym [97]. Do syntezy tych związków przetestowano szereg odczynników kondensujących: chloromrówczan izobutyli/NMM, DPPA/TEA, EEDQ/Py, HBTU/NMM, TBTU/HOBt, BOP/HOBt oraz DCC/NMM [97]. Niestety ze względu na niską konwersję substratów a także trudności z oczyszczeniem pożądaných amidów żadna z wymienionych metod nie okazała się efektywna. Natomiast użycie odczynnika kondensującego EDCI w obecności DMAP pozwoliło na efektywne otrzymanie pożądaných połączeń.

Biorąc powyższe pod uwagę w ramach realizacji mojej pracy doktorskiej postanowiłam wykorzystać ten środek kondensujący tj. EDCI/DMAP do syntezy analogów MPA z takimi chlorowodorkami estrów aminokwasów jak: HClx L-Asp(OCH₃)-OCH₃ **192**, HClxL-Thr-OCH₃ **193**, HClx-D-Thr-OCH₃ **194**, HClxL-Ile-OCH₃ **195**, HClx-L-Arg-OCH₃ **196**, HClxD-Arg-OCH₃ **197** i HClxMal-(OCH₃)₂ **198**. Do reakcji używałam MPA, odpowiedni chlorowodorek estru aminokwasu oraz DMAP. Reakcję prowadziłam w bezwodnym DMF. Po ochłodzeniu mieszaniny reakcyjnej do 0°C dodawałam odczynnik kondensujący EDCI (Schemat 19). Reakcję standardowo prowadziłam w obecności gazu obojętnego przez około 48h. Postęp reakcji kontrolowałam za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) w układach 15:1:0,1 (CH₂Cl₂:MeOH:CH₃COOH) i 50:1 (CH₂Cl₂:MeOH). Po zakończeniu reakcji, DMF oddestylowywałam a związki oczyszczałam za pomocą preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej (PTLC) co pozwoliło na otrzymanie pochodnych **199-201**, **203** i **204** z 66-73% wydajnością (Tabela 1).

Procedura z użyciem EDCI w przypadku syntezy estru metylowego *N*-mykofenoiło-L-izoleucyny **202**, przebiegała z niską wydajnością ok 15%. Syntezę tą postanowiłam powtórzyć używając innego odczynnika sprzęgającego tj. bezwodnika

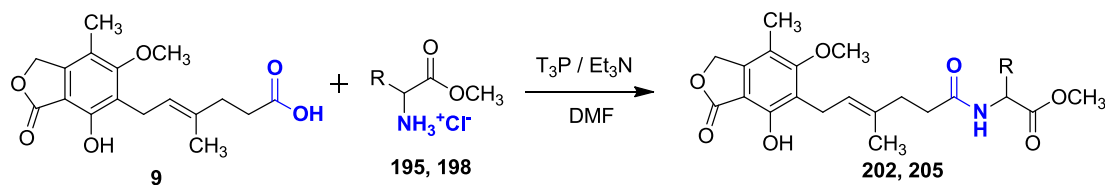
kwasy propanofosfonowe (T3P). Prowadząc reakcję kondensacji MPA z estrem metylowym izoleucyny z zastosowaniem tego środka kondensującego otrzymałam oczekiwany produkt z bardzo dobrą wydajnością tj. 68%. Z kolei w przypadku syntezy aminomalonowej pochodnej MPA **205** wykorzystanie metody EDCI/DMAP nie prowadziło do otrzymania pożądanego produktu. Podobnie jak w poprzednim przypadku postanowiłam do reakcji kondensacji MPA i estru kwasu aminomalonowego zastosować T3P. Procedura ta pozwoliła mi na otrzymanie koniugatu MPA z estrem kwasu aminomalonowym z wydajnością 45%.

Reakcję z wykorzystaniem bezwodnika kwasu propanofosfonowego prowadziłam analogicznie do reakcji z EDCI, wykorzystując zamiast dimetyloaminopirydyny – trietyloaminę (Schemat 20). Zmiana odczynnika kondensującego na T3P, pozwoliła na zwiększenie wydajności pochodnej **202** z 15% do 68% oraz na otrzymanie związku **205** z 45% wydajnością (Tabela 1).



192, 199: R = L-CH₂COOCH₃
193, 200: R = L-CH(CH₃)OH
194, 201: R = D-CH(CH₃)OH
195, 202: R = L-CH(CH₃)CH₂CH₃
196, 203: R = L-CH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH(NO₂)
197, 204: R = D-CH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH(NO₂)
198, 205: R = COOCH₃

Schemat 19. Synteza aminokwasowych pochodnych MPA metodą EDCI/DMAP.



Schemat 20. Synteza aminokwasowych pochodnych MPA metodą T3P/TEA.

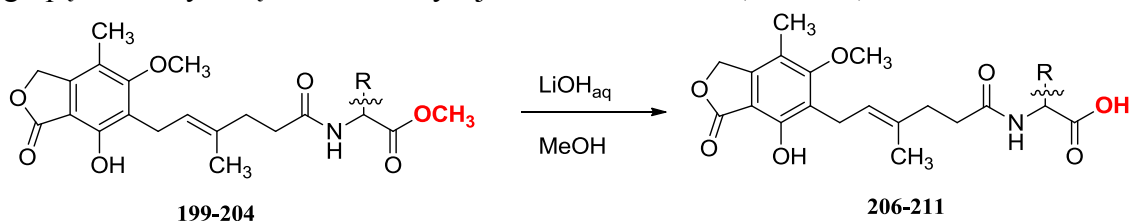
Tabela 1. Wydajności syntez aminokwasowych pochodnych MPA.

Związek	Nr związku	Wydajność [%]
MPA-L-Asp(OMe)-OMe	199	73
MPA-L-Thr-OMe	200	71
MPA-D-Thr-OMe	201	70
MPA-L-Ile-OMe	202	15/68
MPA-L-Arg(NO ₂)-OMe	203	70.5
MPA- D-Arg(NO ₂)-OMe	204	66
MPA-Mal-(OMe) ₂	205	45

Wszystkie otrzymane związki charakteryzowałam za pomocą widm ¹H NMR, ¹³C NMR, MS oraz HPLC-MS.

1.1.2. Synteza aminokwasowych pochodnych MPA z wolną grupą karboksylową 206-211

Kolejnym etapem mojej pracy była deprotekcja grupy karboksylowej. Do usuwania estrów metylowych wykorzystywałam wodorotlenek litu. Odpowiedni koniugat MPA z estrem aminokwasu **199-204** rozpuszczałam w metanolu a następnie do roztworu dodawałam LiOH·H₂O (Schemat 21). Całość mieszałam przez ok. 24h w temperaturze pokojowej. Postęp reakcji kontrolowałam za pomocą TLC. Następnie mieszaninę reakcyjną zakwaszałam 2N HCl i ekstrahowałam octanem etylu (EtOAc). Warstwę octanową suszyłam za pomocą MgSO₄. Po oddestylowaniu rozpuszczalnika produkty reakcji izolowałam za pomocą preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej (PTLC) w układzie 5:1:0,2 (CH₃Cl:MeOH:NH₃). Według wyżej opisanej procedury otrzymałam koniugaty MPA z aminokwasami posiadającymi wolną grupę karboksylową **206-211** z wydajnościami 80-89 % (Tabela 2).



Schemat 21. Otrzymanie aminokwasowych analogów MPA z wolną grupą karboksylową.

Tabela 2. Wydajności reakcji otrzymywania aminokwasowych pochodnych z wolną grupą karboksylową.

Związek	Nr związku	Wydajność [%]
MPA-L-Asp(OMe)-OH	206	87
MPA-L-Thr-OH	207	88
MPA-D-Thr-OH	208	86
MPA-L-Ile-OH	209	80
MPA-L-Arg(NO ₂)-OH	210	87
MPA-D-Arg(NO ₂)-OH	211	89

Wszystkie otrzymane związki charakteryzowałam za pomocą widm ¹H NMR, ¹³C NMR, MS oraz HPLC-MS.

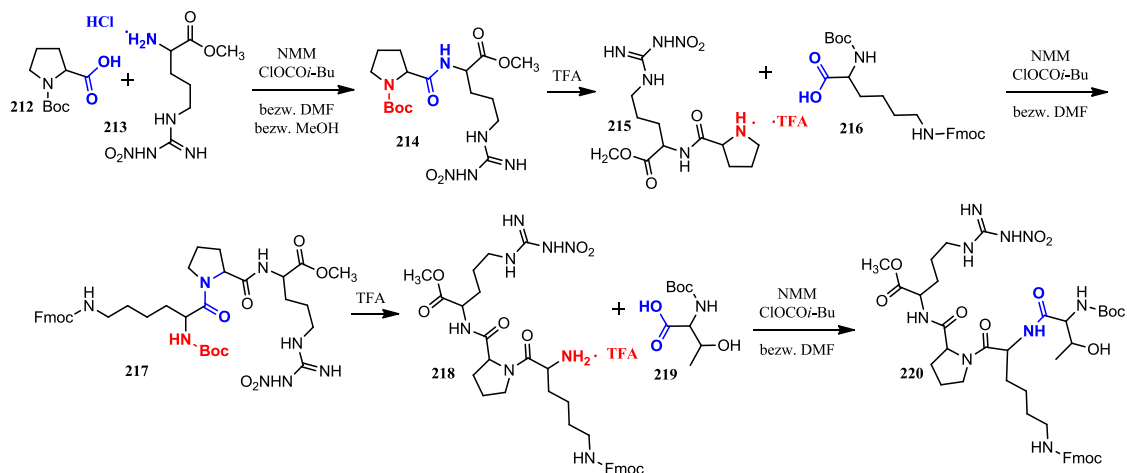
1.2. Synteza peptydowych pochodnych kwasu mykofenolowego

1.2.1. Synteza tetrapeptydów: tuftsyny 220 i retro-tuftsyny 229

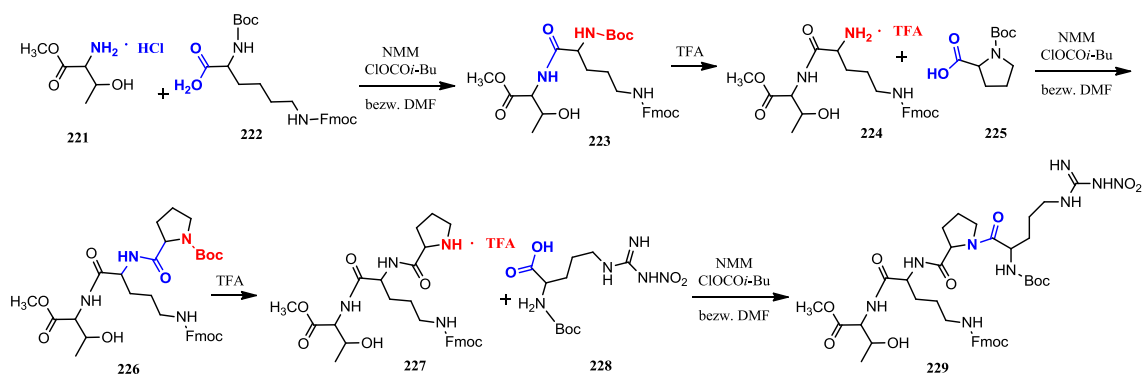
Syntezę peptydów: tuftsyny i retro-tuftsyny przeprowadziłam w oparciu o metodę mieszanych bezwodników opisaną przez Dzierzbicką i wsp. [8] [9] [10]. Procedura ta umożliwia otrzymanie pożądanego produktu z dobrą wydajnością przy jednoczesnym niskim stopniu racemizacji.

Syntezę pochodnej tuftsyny **220** otrzymałam zgodnie z procedurą opisaną przez Dzierzbicką i wsp. z tym, że w celu ochrony grupy ε-aminowej lizyny użyłam osłony Fmoc. Schemat 22 przedstawia drogę syntezy otrzymanej przeze mnie pochodnej

tuftsyny **220**. W analogiczny sposób otrzymałam pochodną retro-tuftsyny **229** (Schemat 23). Wydajności poszczególnych etapów tych syntez zamieściłam w Tabeli 3.



Schemat 22. Synteza chronionego tetrapeptydu – tuftsyny **220**.



Schemat 23. Synteza chronionego tetrapeptydu - retro-tuftsyny **229**.

Tabela 3. Wydajności reakcji dla poszczególnych etapów syntezy tetrapeptydów **220** i **229**.

TUFTSYNA			RETRO-TUFTSYNA		
Związek	Nr zw.	Wyd. [%]	Związek	Nr zw.	Wyd. [%]
Boc-Pro-Arg(NO ₂)-OMe	214	78	Boc-Lys(Fmoc)-Thr-OMe	223	83
TFAXPro-Arg(NO ₂)-OMe	215	96	TFAX Lys(Fmoc)-Thr-OMe	224	97
Boc-Lys(Fmoc)-Pro-Arg(NO ₂)-OMe	217	67	Boc-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OMe	226	76
TFAXLys(Fmoc)-Pro-Arg(NO ₂)-OMe	218	91	TFAXPro-Lys(Fmoc)-Thr-OMe	227	93
Boc-Thr-Lys(Fmoc)-Pro-Arg(NO ₂)-OMe	220	57	Boc-Arg(NO ₂)-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OMe	229	65

Struktury otrzymanych tetrapeptydów potwierdziłam na podstawie analizy widm ^1H NMR, MS oraz temperatury topnienia.

1.2.2. Synteza pentapeptydów, pochodnych tuftsyny 237-242 i retro-tuftsyny 250-255

Jak opisałam w rozdziale drugim części literaturowej, tuftsyna jest immunomodulatorem o szerokim zakresie właściwości biologicznych. Jednak peptyd ten jest niestabilny, jego okres półtrwania we krwi wynosi 16 min. Stabilizować tuftsynę można poprzez łączenie jej ze związkami biologicznie czynnymi bądź też przez modyfikację na grupie ϵ -aminowej lizyny, dołączając np. kolejny aminokwas.

W związku z powyższym następnym etapem mojej pracy było otrzymanie pentapeptydów, pochodnych tuftsyny **237-242** i retro-tuftsyny **250-255**, poprzez acylowanie grupy ϵ -aminowej lizyny, aminokwasami takimi jak: glicyna, α -alanina, β -alanina, walina, leucyna i izoleucyna. W tym celu w związkach **220** i **229** usunęłam ugrupowanie Fmoc za pomocą 20-30% roztworu dietyloaminy w chloroformie. Do reakcji acylowania funkcji aminowej związku **230** i **249** odpowiednimi aminokwasami postanowiłam przetestować trzy metody: (a) metodę mieszanych bezwodników (chloromrówczan izobutyli); (b) środek kondensujący EDCI oraz (c) środek kondensujący EEDQ. Wybierając te metody kierowałam się: opisywanymi w literaturze dobrymi wydajnościami reakcji tworzenia wiązania peptydowego, niskim stopniem racemizacji, dostępnością i atrakcyjną ceną zastosowanych odczynników sprzęgających. Wyniki tych eksperymentów przedstawiłam w Tabeli 4 i 5. Jak widać z danych zamieszczonym w Tabeli 4 i 5 najlepsze rezultaty w syntezie tych peptydów otrzymywałam stosując metodę mieszanych bezwodników. Wykorzystując procedurę EDCI wydajności projektowanych peptydów były zdecydowanie niższe natomiast w przypadku EEDQ nie otrzymywałam pożądaných peptydów z zadowalającymi wydajnościami. Procedury syntezy związków **243-248** oraz **256-261** zamieściłam na Schemacie 24.

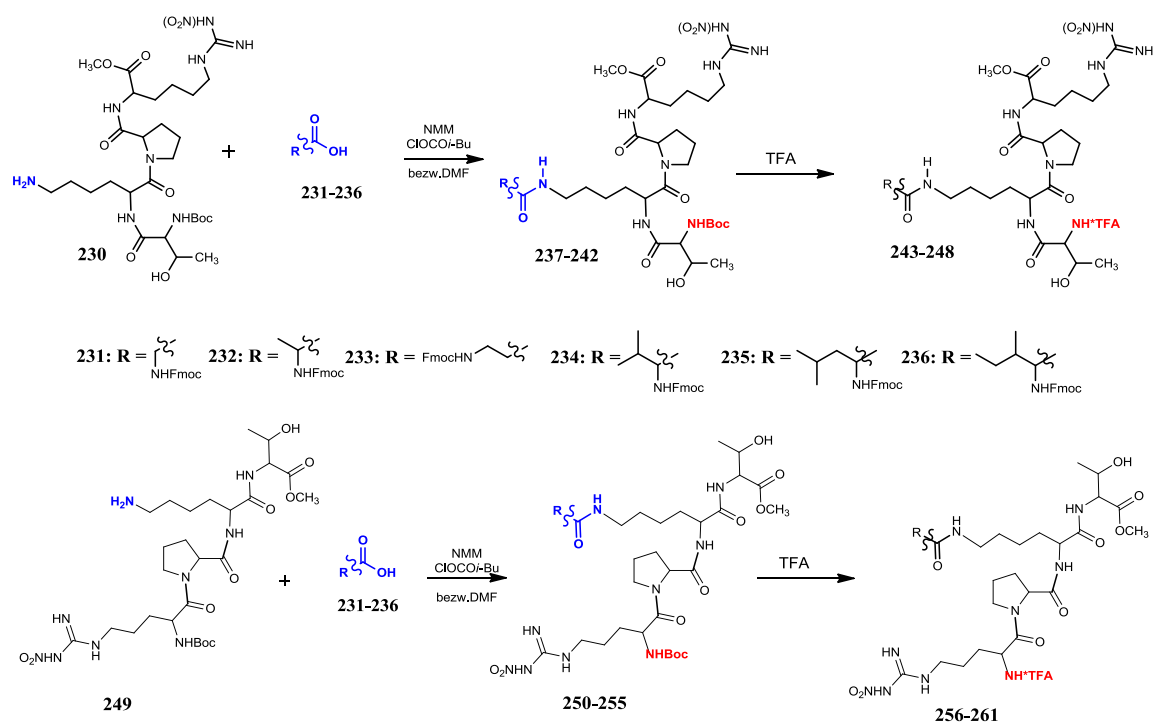
Tabela 4. Wydajności syntez pentapeptydów pochodnych tuftsyny **237-242**.

Związek	Nr związku	Wydajność[%]	
		metoda mieszanych bezwodników	procedura z wykorzystaniem EDCI
Boc-Thr-Lys(FmocGly)-Pro-Arg(NO ₂)-OMe	237	65	48
Boc-Thr-Lys(FmocαAla)-Pro-Arg(NO ₂)-OMe	238	58	-
Boc-Thr-Lys(FmocβAla)-Pro-Arg(NO ₂)-OMe	239	63	-
Boc-Thr-Lys(FmocVal)-Pro-Arg(NO ₂)-OMe	240	53	-
Boc-Thr-Lys(FmocLeu)-Pro-Arg(NO ₂)-OMe	241	41	-

Boc-Thr-Lys(FmocIle)-Pro-Arg(NO ₂)-OMe	242	45	-
---	-----	----	---

Tabela 5. Wydajności syntez pentapeptydów pochodnych retro-tuftsyny **250-255**.

Związek	Nr zw.	Wydajność [%]		
		metoda mieszanych bezwodników	procedura z wykorzystaniem EDCI	Procedura z wykorzystaniem EEDQ
Boc-Arg(NO ₂)-Pro-Lys(FmocGly)-Thr-OMe	250	56	43	-
Boc-Arg(NO ₂)-Pro-Lys(FmocαAla)-Thr-OMe	251	53	-	-
Boc-Arg(NO ₂)-Pro-Lys(FmocβAla)-Thr-OMe	252	51	42	35
Boc-Arg(NO ₂)-Pro-Lys(FmocVal)-Thr-OMe	253	48	33	-
Boc-Arg(NO ₂)-Pro-Lys(FmocLeu)-Thr-OMe	254	35	-	-
Boc-Arg(NO ₂)-Pro-Lys(FmocIle)-Thr-OMe	255	32	-	-



Schemat 24. Synteza pentapeptydów **243-248** i **256-261** za pomocą metody mieszanych bezwodników.

1.2.3. Synteza analogów kwasu mykofenolowego z pochodnymi tuftsyny i retro-tuftsyny

Następnym etapem realizacji mojej pracy doktorskiej, było utworzenie wiązania amidowego pomiędzy wszystkimi otrzymanymi przeze mnie tetra- i pentapeptydami, a kwasem mykofenolowym. W tym celu przetestowałam trzy odczynniki kondensujące takie jak: EEDQ, EDCI i T3P na modelach pochodnych tuftsyny **262** i retro-tuftsyny **277**, modyfikując ilość użytej zasady. Wyniki tych eksperymentów zestawiałam w Tabeli 6.

Peptyd z wolną grupą aminową oraz MPA rozpuszczałam w bezwodnym DMF. Następnie do roztworu dodawałam odpowiedniej zasady, a mieszaninę reakcyjną ochładzałam do 0°C. Kolejno dodawałam odpowiedniego środka kondensującego. Reakcję mieszałam 2h w temp. 0°C, a następnie 24-48h w temp. pokojowej w atmosferze gazu obojętnego. Postęp reakcji kontrolowałam za pomocą TLC, a otrzymane pochodne oczyszczałam za pomocą PTLC w układach 20:1 (CH₃Cl:MeOH) i 9:1 (CH₃Cl:MeOH).

Tabela 6. Wydajności syntez peptydów z MPA.

Warunki	Wydajność [%]	
	MPA-T-Fmoc 263	MPA-RT-Fmoc 279
2xEEDQ/2xPy	-	problem z izolacją produktu
5xEEDQ/5xPy	-	problem z izolacją produktu

5xEEDQ/2xTEA	33	-
EDCI/DMAP	43	64
5xEDCI/2xTEA	-	34
2xEDCI/3xTEA	-	58
T3P/TEA	65	28

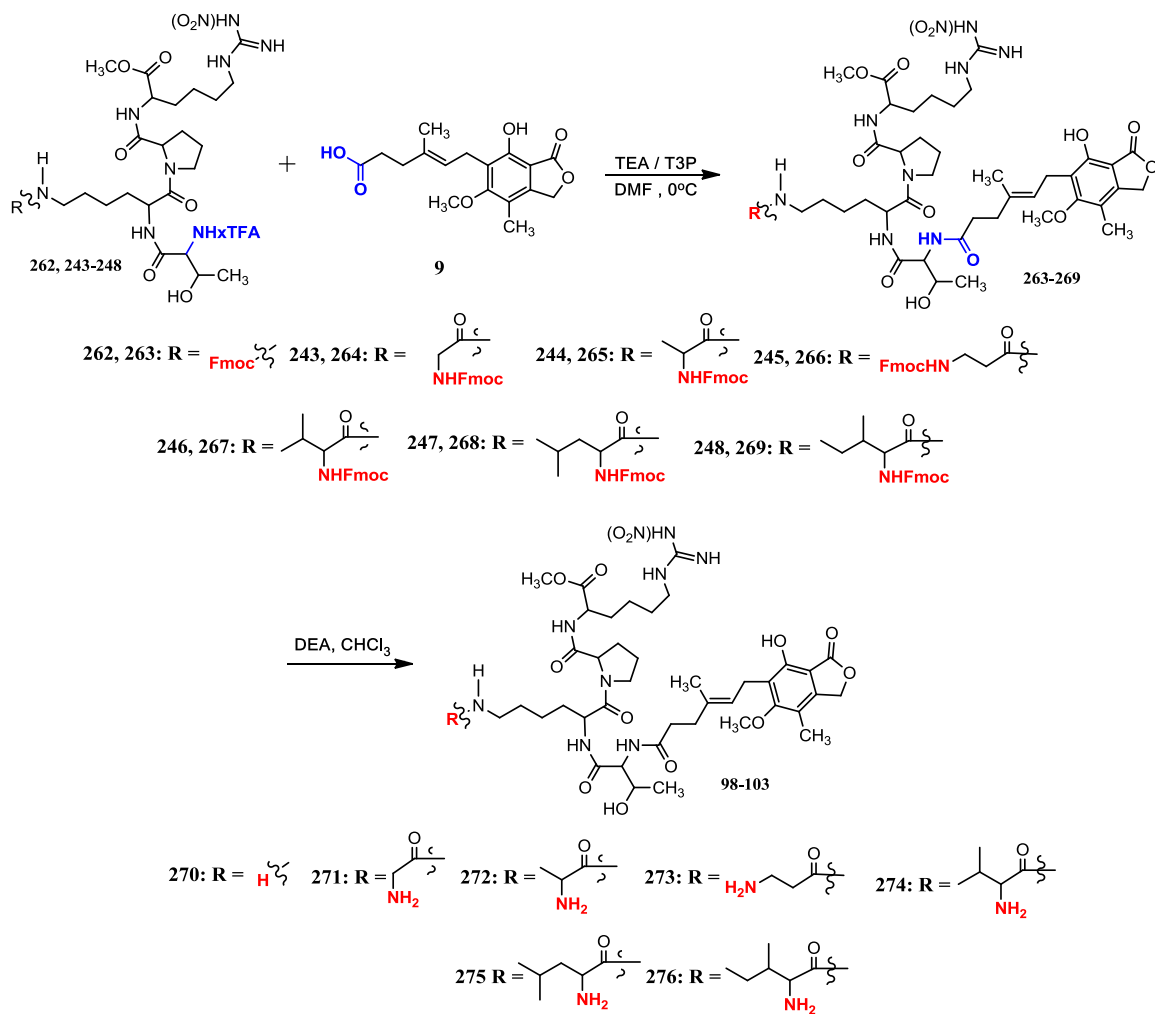
Biorąc pod uwagę wyniki eksperymentów przedstawionych w Tabeli 6 do syntezy koniugatów kwasu mykofenolowego z tuftsyną **262** i jej analogami **243-248** wybrałam metodę T3P/TEA (Schemat 25). Natomiast do syntezy pochodnych MPA z retro-tuftsyną **277** i jej analogami **255-260** wybrałam procedurę EDCI/DMAP (Schemat 26). Pozwoliło to na otrzymanie peptydowych koniugatów MPA **263-269** i **278-284**. Wydajności reakcji otrzymywania tych pochodnych MPA przedstawiłam w Tabeli 7.

Ostatnim etapem syntez było uwolnienie grupy aminowej. Deprotekcję osłony Fmoc przeprowadziłam za pomocą 20-30% roztworu dietyloaminy w chloroformie otrzymując związki: **270-276** i **285-291** (Schemat 25 i 26). Postęp reakcji kontrolowałam za pomocą TLC, a otrzymane związki oczyszczałam za pomocą PTLC w układach 5:1:0,2 (CH₃Cl:MeOH:NH₃) i 3:1:0,2 (CH₃Cl:MeOH:NH₃).

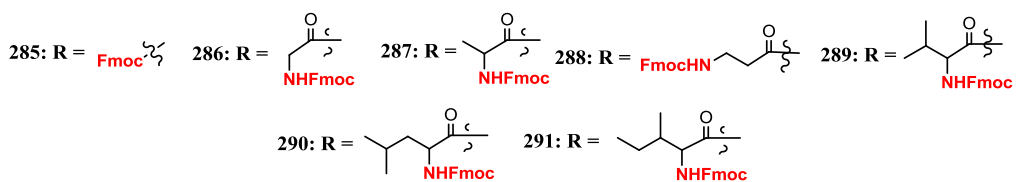
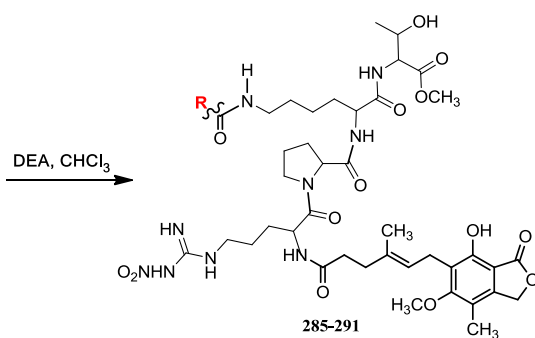
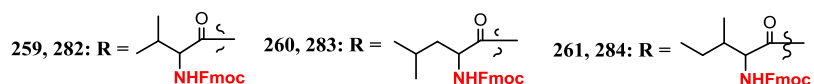
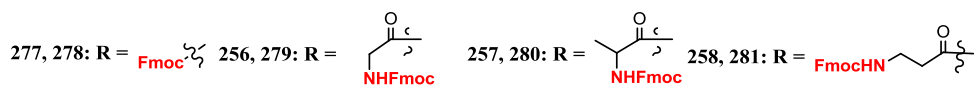
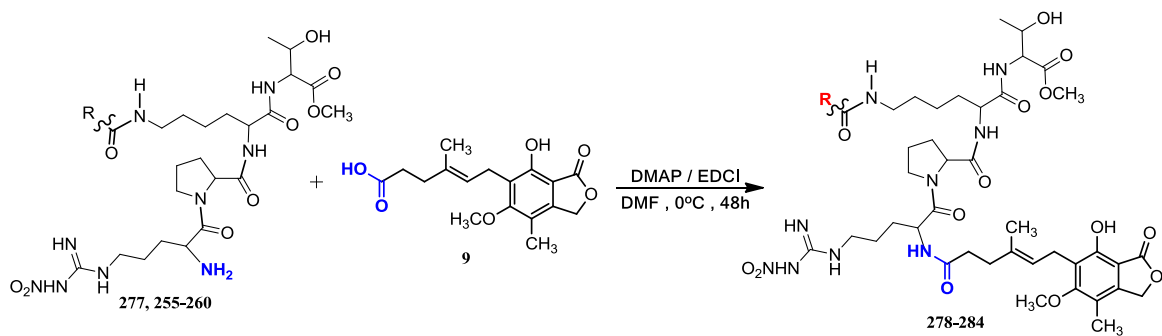
Struktury i czystość wszystkich otrzymanych przeze mnie związków potwierdziłam metodami: ¹H NMR ¹³C NMR, MS i MS-HPLC. Dodatkowo wybrane związki scharakteryzowałam za pomocą technik: COESY, HMBC, HSQC, ROESY i TOCSY.

Tabela 7. Wydajności syntez wszystkich otrzymanych peptydowych analogów MPA **263-269** i **278-284**.

Związek	Nr zw.	Wyd. [%]	Związek	Nr zw.	Wyd. [%]
MPA-TFmoc	263	65	MPA-RTFmoc	278	64
MPA-TGlyFmoc	264	48	MPA-RGlyFmoc	279	58
MPA-TαAlaFmoc	265	53	MPA-RTαAlaFmoc	280	57
MPA-TβAlaFmoc	266	51	MPA-RTβAlaFmoc	281	53
MPA-TValFmoc	267	49	MPA-RTValFmoc	282	36
MPA-TLeuFmoc	268	42	MPA-RTLeuFmoc	283	42
MPA-TIleFmoc	269	45	MPA-RTIleFmoc	284	39



Schemat 25. Synteza peptydowych pochodnych tuftsiny i MPA 270-276.



Schemat 26. Synteza peptydowych pochodnych retro-tuftsyny i MPA 285-291.

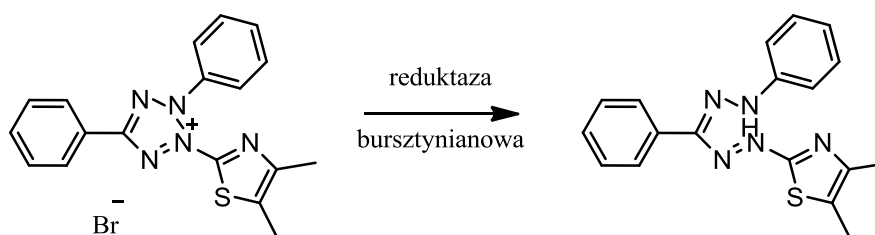
2. Badania biologiczne

2.1. Omówienie wyników aktywności immunosupresyjnej

W celu określenia działania i bezpieczeństwa leku sprawdziłam cytotoksyczność otrzymanych związków wobec linii komórkowych w warunkach *in vitro*. Do określenia aktywności cytotoksycznej potencjalnych leków wykorzystuje się różnego rodzaju testy komórkowe.

Jedne z popularniejszych testów sprawdzających aktywność cytotoksyczną opierają się na badaniu integralności błony komórkowej, gdyż wszystkie trwałe uszkodzenia błony komórkowej prowadzą do śmierci komórki. Zastosowany barwnik nie wnika do żywych komórek. Natomiast w komórkach umierających (w przypadku gdy błona komórkowa zostanie trwale uszkodzona i następuje zanik potencjału pomiędzy zewnętrzną a wewnętrzną stroną błony), barwnik przenika do ich wnętrza zabarwiając cytoplazmę bądź jądro komórkowe. Najpowszechniej stosowanym barwnikiem z tej grupy jest błękit trypanowy, który wybarwia komórki martwe (późnoapoptotyczne i nekrotyczne) na kolor niebieski. Do tej grupy barwników należą również m.in. zieleń lizaminowa, eozyna Y i erytrozyna B. Innym często stosowanym barwnikiem jest jodek propidyny (PI), który wnika do wnętrza komórek martwych i interkaluje z kwasami nukleinowymi, wykazując czerwoną fluorescencję.

Inną metodą sprawdzającą aktywność cytotoksyczną jest ocenienie żywotności komórek poprzez analizę ich aktywności metabolicznej. Prawdopodobnie najbardziej popularnym testem do analizy aktywności metabolicznej komórki jest test MTT. Test ten polega na redukcji rozpuszczalnej w wodzie soli tetrazolowej (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazoliowy) do formazanu (Rysunek 29), wytrącającego się w postaci fioletowych kryształów. Sole tetrazolowe są redukowane do formazanu dzięki działaniu dehydrogenazy bursztynianowej, enzymu aktywnego tylko w komórkach o nienaruszonym metabolizmie i łańcuchu oddechowym. Po rozpuszczeniu kryształów formazanu w DMSO lub izopropanolu, powstaje barwny roztwór, którego intensywność zabarwienia mierzona jest spektrofotometrycznie w zakresie długości fal 492–570 nm. Intensywność zabarwienia roztworu jest proporcjonalna do aktywności oksydacyjnej mitochondriów komórki czyli do liczby aktywnych metabolicznie (żywych) komórek w populacji. Natomiast testy takie jak: MTS czy XTT stanowią udoskonalenie metody z wykorzystaniem MTT. Innym testem należącym do tej samej grupy jest test LDH polegający na ocenie aktywności dehydrogenazy mleczanowej.



Rysunek 29. Redukcja odczynnika MTT przez reduktazę bursztynianową.

Kolejnym etapem badań biologicznych była ocena stopnia zahamowania proliferacji komórek. Jedną z metod używanych do oceny zahamowania proliferacji komórkowej jest wbudowywanie do DNA (podczas fazy S podziału komórkowego) znakowanych prekursorów tj. metyl- ^3H -tymidyna, ^{14}C -urydyna, ^{14}C -adenina oraz ^{32}P fosfor.

Inną metodą jest zastosowanie barwnika VPD450 (Violet Proliferation Dye 450), który może być stosowany do monitorowania aktywności proliferacyjnej w cytometrii przepływowej podzbiorów komórek. Niefluorescencyjny barwnik VPD450 pasywnie dyfunduje przez błony komórkowe i jest metabolizowany przez aktywność esterazy w żywych komórkach. Produkt esterazy staje się wysoce fluorescencyjny i kowalencyjnie wiąże się z białkowymi grupami aminowymi w komórkach poprzez ugrupowanie estrowe sukcyimidu. Martwe komórki nie wykazują fluorescencji. Natomiast w miarę dzielenia się żywych komórek, barwnik VPD450 rozkłada się równomiernie pomiędzy komórki potomne w taki sposób, że każda komórka potomna zachowuje około połowy intensywności fluorescencji VPD450 swojej komórki macierzystej. Następnie wykorzystując cytometrię przepływową można dokładnie zmierzyć ilość komórek o konkretnej fluorescencji i na tej podstawie ocenić podziały komórkowe.

W ramach niniejszej pracy doktorskiej samodzielnie przeprowadziłam test cytotoksyczności MTT oraz test proliferacyjny z wykorzystaniem barwnika VPD450 na limfoidalnej linii komórkowej Jurkat oraz mononuklearnych komórkach krwi obwodowej (PBMC). Komórki Jurkat stosowane są jako linia modelowa ludzkich limfocytów natomiast PBMC stanowią model *in vitro* odpowiedzi immunologicznej. Testy wykonywałam w trzykrotnych powtórzeniach. Związki rozpuszczałam w 20 μL DMSO, następnie uzupełniałam pożywką do 1 mL, otrzymując wyjściowe stężenie 1 mg/mL. Kolejne roztwory do badań przygotowywałam metodą seryjnych rozcieńczeń, otrzymując najniższe badane stężenie 10^{-7} [mg/mL].

W obu stosowanych testach wyznaczyłam wartości IC_{50} (MTT) i EC_{50} (VPD450). IC_{50} jest to stężenie związku, przy którym żywotność komórek zmniejsza się do 50% w stosunku do komórek kontrolnych. EC_{50} jest to natomiast stężenie związku, przy którym proliferacja komórek zostaje zahamowana w 50% w stosunku do komórek kontrolnych. Następnie obliczyłam współczynnik selektywności (SI), który pozwolił na wytypowanie najbardziej aktywnych związków przy jednocześnie najniższej toksyczności.

2.1.1. Oznaczenie aktywności cytotoksycznej badanych związków 199-211, 270-276 i 285-291 wobec linii komórkowych Jurkat i PBMC wykorzystując metodę MTT

Na 96-dołkowych płytkach inkubowałam (w temp. 37°C , 5% CO_2) komórki Jurkat wraz z otrzymanymi przeze mnie pochodnymi MPA w różnych stężeniach przez 48 godzin natomiast komórki PBMC przez 72h. Dodatkowo proliferacja ludzkich limfocytów stymulowana była przeciwciałami anti-CD3/anti-CD-28. Następnie do każdego dołka dodałam odczynnik MTT, po czym płytki inkubowałam kolejne 3

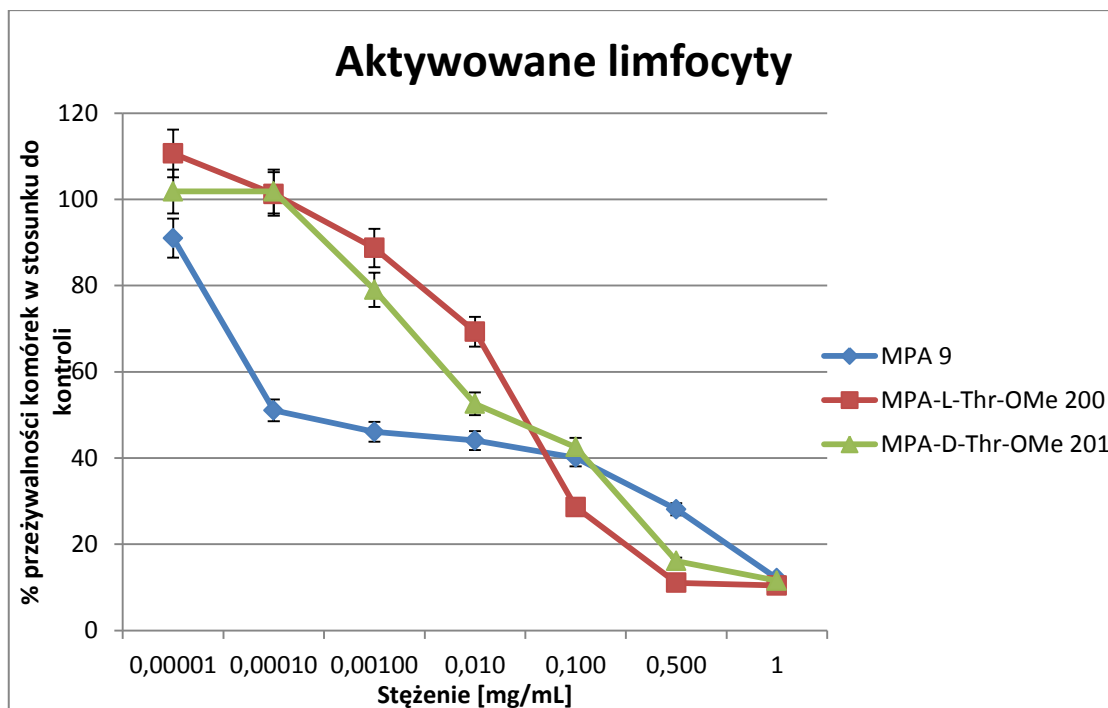
godziny. Po tym czasie wytrącały się kryształki formazanu, które rozpuszczałam w izopropanolu zakwaszonym 0,4N HCl. Po rozpuszczeniu kryształów, płytki wytrząsałam przez 15 min. Kolejno mierzyłam absorbancje przy długości fali 570 nm, a otrzymane wyniki posłużyły do wyznaczenia wartości IC_{50} .

Aminokwasowe analogi MPA

W Tabeli 8 przedstawiłam wyniki testu cytotoxyczności MTT, który przeprowadziłam dla aminokwasowych analogów MPA na linii komórkowej T-Jurkat oraz na komórkach PBMC. W przypadku komórek PBMC wszystkie nowe aminokwasowe analogi MPA okazały się być mniej cytotoksyczne niż związek macierzysty **9**. Natomiast w przypadku linii komórkowej T-Jurkat związki: **199**, **200**, **202** i **207** wykazały większą toksyczność od kwasu mykofenolowego **9**. Analizując wyniki można spostrzec, że estry metylowe aminokwasów są bardziej cytotoksyczne niż ich odpowiedniki z wolną grupą karboksylową. Jest to zauważalne w każdym przypadku zarówno dla linii komórkowej T-Jurkat jak i dla komórek PBMC. Wpływ na toksyczność, oprócz deprotekcji estru metylowego, ma również konfiguracja aminokwasu. Zarówno w przypadku estrów metylowych jak i pochodnych z wolną grupą karboksylową, można zauważyć że D enancjomery są mniej cytotoksyczne od L enancjomerów, co również jest zauważalne dla obu typów badanych komórek.

Pochodne kwasu mykofenolowego z arginina z wolną grupą karboksylową zarówno enancjomer L jak i D, wykazywały najmniejszą toksyczność. W przypadku linii komórkowej T-Jurkat dla tych pochodnych nie udało się wyznaczyć wartości IC_{50} w stosowanym zakresie stężeniem. W związku z czym obliczyłam przeżywalność w najwyższym badanym stężeniu 1 mg/mL, która wynosiła odpowiednio 59,12% dla związku **210** i 75,14% dla związku **211**. Analogi MPA **210** i **211** w stosunku do komórek PBMC okazały się również najmniej toksyczne, a ich wartości IC_{50} wynosiły odpowiednio 283,3521 μ M dla związku **210** i 422,1991 μ M dla **211**.

Związek MPA-L-Ile-OMe **202** okazał się najbardziej cytotoksyczny w stosunku do obu typów badanych komórek, jego IC_{50} dla linii komórkowej Jurkat wynosiło 8,3873 μ M (około 8 razy niższe niż dla MPA), natomiast dla komórek PBMC 2,1735 μ M. Wykres 1 przedstawia porównanie cytotoxyczności związków **200** i **201** do kwasu mykofenolowego **9** w badanych stężeniach w stosunku do aktywowanych limfocytów.



Wykres 1. Porównanie cytotoksyczności związków **200** i **201** (pochodne o najlepszym SI) do MPA **9** wobec komórek PBMC.

Tabela 8. Wartości IC₅₀ [μM] obliczone na podstawie testu MTT dla aminokwasowych pochodnych MPA **199-211**.

Związek	Nr	T-JURKAT				PBMC		
		IC ₅₀ [μM]	Żywność [%]	p	F	IC ₅₀ [μM]	p	F
MPA	9	60,5649 ± NAN				0,1393 ± 0,0563		
MPA-L-Asp(OMe)-OMe	199	20,1067 ± 3,053		< 0,05	1,5447	18,1104 ± 1,7576	< 0,05	33,4943
MPA-L-Thr-OMe	200	17,031 ± 8,9876		< 0,05	188,033	57,249 ± 31,3678	< 0,05	30,0545
MPA-D-Thr-OMe	201	115,1101 ± 3,6357		< 0,05	265,7	69,2363 ± 58,2079	< 0,05	25,8681
MPA-L-Ile-OMe	202	8,3873 ± 5,737		< 0,05	8775,4	2,1735 ± 1,9699	< 0,05	46,5912
MPA-L-Arg-OMe	203	346,9831 ± NAN		0,196832	14,1006	14,0247 ± 4,8017	< 0,05	40,2289
MPA-D-Arg-OMe	204	572,3986 ± 92,9324		< 0,05	186,542	70,6284 ± 63,0937	< 0,05	29,4825
MPA-Mal-(OMe) ₂	205	101,2615 ± 20,8195		< 0,05	3127,67	3,5021 ± NAN	< 0,05	28,4894
MPA-L-Asp(OH)-OH	206	539,6711 ± NAN		< 0,05	235,896	50,2841 ± 25,7317	< 0,05	42,1102
MPA-L-Thr-OH	207	42,6155 ± 5,4269		< 0,05	420,233	81,6755 ± 58,1724	< 0,05	25,5062
MPA-D-Thr-OH	208	228,7987 ± 35,9323		0,105142	50,465	117,5839 ± 114,9361	< 0,05	3,9889
MPA-L-Ile-OH	209	73,7358 ± NAN		0,083178	80,886	20,8702 ± NAN	< 0,05	9,9973
MPA-L-Arg-OH	210		59,12%			283,3521 ± NAN	< 0,05	25,4620
MPA-D-Arg-OH	211		75,14%			422,1991 ± NAN	< 0,05	50,3320

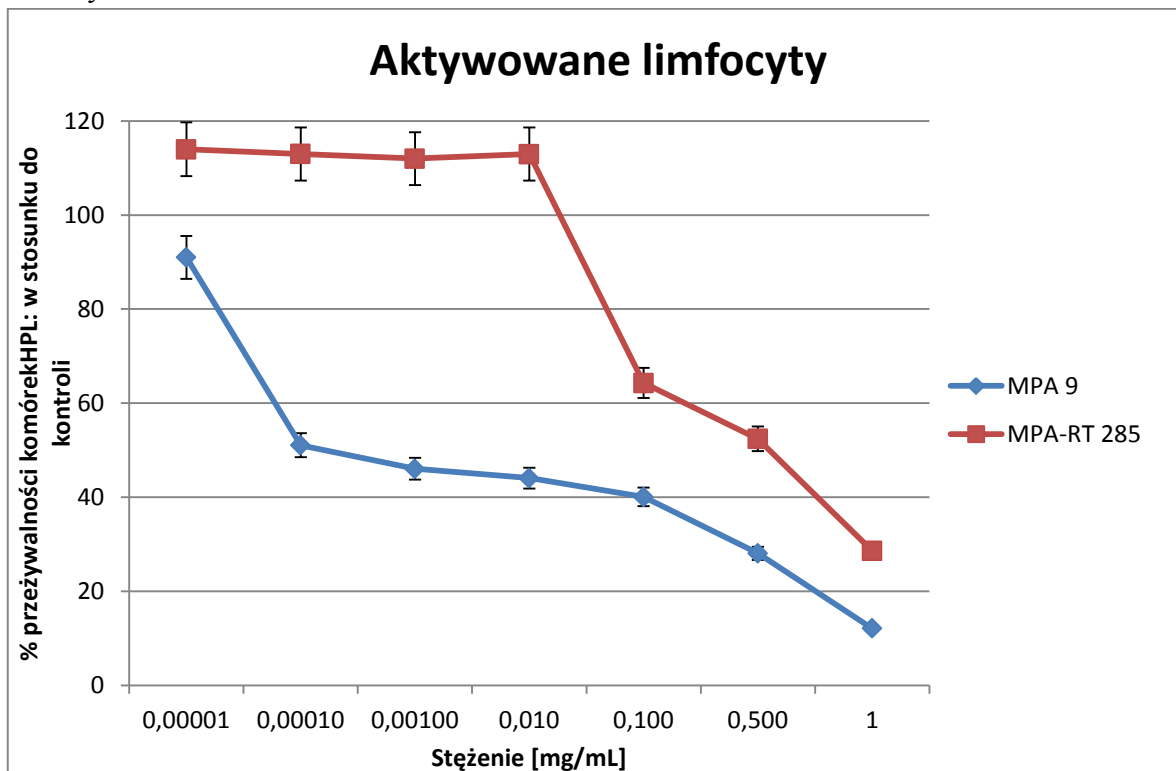
IC₅₀ związków wyższe od IC₅₀ MPA, p – istotność statystyczna różnicy, F – test Fishera dla porównania związek MPA.

* Żywność komórek obliczona w najwyższym badanym stężeniu 1mg/mL

Peptydowe analogi MPA

Tabela 9 przedstawia otrzymane wartości IC_{50} dotyczące badań cytotoksyczności peptydowych analogów MPA. Wszystkie peptydowe analogi MPA są znacznie mniej toksyczne od kwasu mykofenolowego. Dla ponad połowy związków, na linii komórkowej Jurkat nie udało mi się wyznaczyć wartości IC_{50} w testowanym zakresie stężeń, a żywotność komórek w obecności tych związków w najwyższym badanym stężeniu 1 mg/mL wynosiła 52,48% dla związku **291** do 85,82% dla **270**. Wartości IC_{50} dla peptydowych pochodnych na linii komórkowej Jurkat są ponad 13 razy wyższe niż dla MPA. Natomiast w przypadku komórek PBMC, wartości IC_{50} są ponad 3500 razy wyższe niż dla MPA. Świadczy to o minimalnym, w porównaniu do MPA, działaniu cytotoksycznym peptydowych analogów w stosunku do komórek PBMC.

Zauważyłam większą toksyczność analogów MPA z retro-tuftsyną **285-291** niż z tuftsyną **270-276**. Wyjątek stanowią dwie pentapeptydowe pochodne MPA z α -alaniną i izoleucyną w przypadku linii komórkowej T-Jurkat i jeden pentapeptydowy analog MPA z glicyną w przypadku komórek PBMC. W tych przypadkach bardziej toksyczne okazują się koniugaty z tuftsyną. Jednakże nie są to znaczne różnice. Biorąc powyższe pod uwagę stwierdzam, że koniugaty MPA z retro-tuftsyną wykazują nieznacznie większą cytotoksyczność od tych z tuftsyną. Pochodna MPA-T **270** nie wykazywała toksyczności dla obu typów badanych komórek. Wykres 2 przedstawia porównanie cytotoksyczności koniugatu MPA z retro-tuftsyną **285** do związku macierzystego MPA w przedziale badanych stężeń w stosunku do aktywowanych limfocytów.



Wykres 2. Porównanie cytotoksyczności związku **285** (pochodna o najlepszym SI) do MPA **9** wobec komórek PBMC.

Tabela 9. Wartości IC₅₀ [μM] obliczone na podstawie testu MTT dla peptydowych pochodnych MPA 270-276 i 285-291.

Związek	Nr	T-JURKAT				PBMC			
		IC ₅₀ [μM]	Żywotność [%]	p	F	IC ₅₀ [μM]	p	F	Żywotność [%]
MPA	9	60,5649 ± NAN				0,1393 ± 0,0563			
MPA-T	270		85,82%				-		99,09%
MPA-T-Gly	271		53,40%			627,5687 ± 57,544	< 0,05	21,3610	
MPA-T-αAla	272	1000,6911 ± 109,9866		0,098974	57,005	559,6307 ± 118,9348	< 0,05	42,2206	
MPA-T-βAla	273	1020,3268 ± 51,0003		< 0,05	4674,26	525,802 ± 7,8699	< 0,05	27,6421	
MPA-T-Val	274		66,56%						56,81%
MPA-T-Leu	275		67,04%			687,0963 ± 152,8254	< 0,05	12,02984	
MPA-T-Ile	276	808,7294 ± NAN		30,801	0,134232	461,4446 ± 198,9709	< 0,05	11,15830	
MPA-RT	285	970,7124 ± 108,8745		0,116535	41,0025	633,9007 ± 0,1364	< 0,05	63,5590	
MPA-RT-Gly	286	1096,4002 ± 83,9332		< 0,05	283,657	865,4713 ± 492,6669	< 0,05	40,3978	
MPA-RT-αAla	287		53,90%			749,7236 ± 88,6	< 0,05	36,0065	
MPA-RT-βAla	288	786,5217 ± 75,6887		0,113966	42,8915	587,6384 ± NAN	< 0,05	42,8077	
MPA-RT-Val	289		63,35%			547,9832 ± 56,4763	< 0,05	108,4700	
MPA-RT-Leu	290		61,34%			518,9346 ± 390,5579	< 0,05	86,5511	
MPA-RT-Ile	291		52,48%			533,1408 ± 182,6451	< 0,05	45,0843	

IC₅₀ związków wyższe od IC₅₀ MPA, p – istotność statystyczna różnicy, F – test Fishera dla porównania związek MPA.

* Żywotność komórek obliczona w najwyższym badanym stężeniu 1mg/mL



2.1.2. Oznaczenie aktywności antyproliferacyjnej badanych związków 199-211, 270-276 i 285-291 wobec linii komórkowych Jurkat i PBMC wykorzystując barwnik VPD450

Metoda ta polega na rozkładaniu się równomiernie barwnika VPD450 pomiędzy komórki potomne tak, że każda komórka potomna zachowuje około połowy intensywności fluorescencji VPD450 swojej komórki macierzystej. Przed przystąpieniem do wykonania testów, należało wybarwić komórki. W tym celu odpowiednią linię komórkową inkubowałam z barwnikiem VPD450 w 37°C przez 15 minut. Następnie wybarwione komórki nałożyłam na 96 dołkowe okrągłodenne płytki wraz z badanymi związkami w odpowiednich stężeniach. Tak przygotowane płytki inkubowałam (w temp. 37°C, 5% CO₂) przez 48h w przypadku komórek Jurkat i 72h w przypadku PBMC. Następnie wykorzystując cytometrię przepływową dokonałam pomiaru fluorescencji, sprawdzając stopień proliferacji komórek. Po czym z otrzymanych danych wyznaczałam wartość EC₅₀.

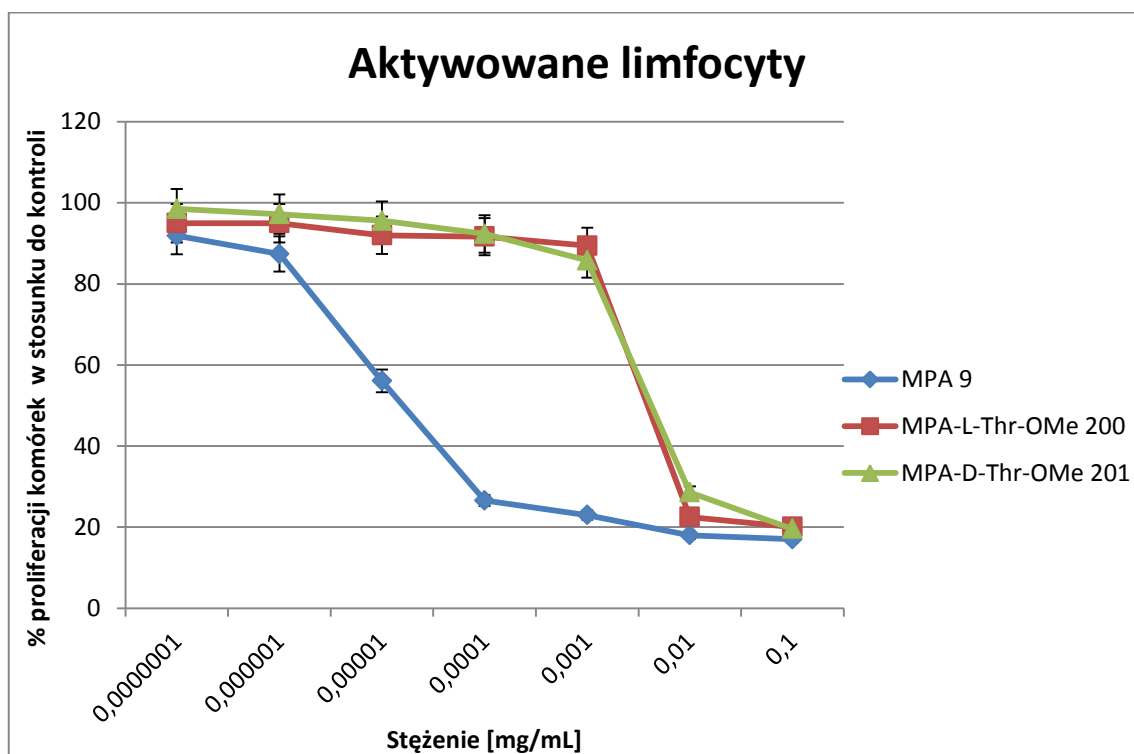
Aminokwasowe analogi MPA

W Tabeli 10 zamieściłam wartości EC₅₀ otrzymane z przeprowadzonych badań antyproliferacyjnych dotyczących aminokwasowych analogów MPA. Żaden z otrzymanych przeze mnie związków nie wykazał tak dobrego działania antyproliferacyjnego jak kwas mykofenolowy. Wyniki badań przeprowadzonych na linii komórkowej Jurkat oraz na komórkach PBMC są spójne. W obu przypadkach najbardziej aktywnymi związkami okazały się pochodne: **199, 200, 201, 202** oraz **209**. Pochodna MPA z izoleucyną zarówno w postaci estru metylowego **202** (EC₅₀ = 5,1207 µM dla PBMC) jak i po deprotekcji **209** (EC₅₀ = 9,0962 µM dla PBMC) charakteryzuje się najniższą wartością EC₅₀ co czyni ją najbardziej aktywną z pośród badanych analogów. Najmniej aktywnymi pochodnymi MPA w stosunku do obu typów komórek okazały się związki: **206, 210 i 211**.

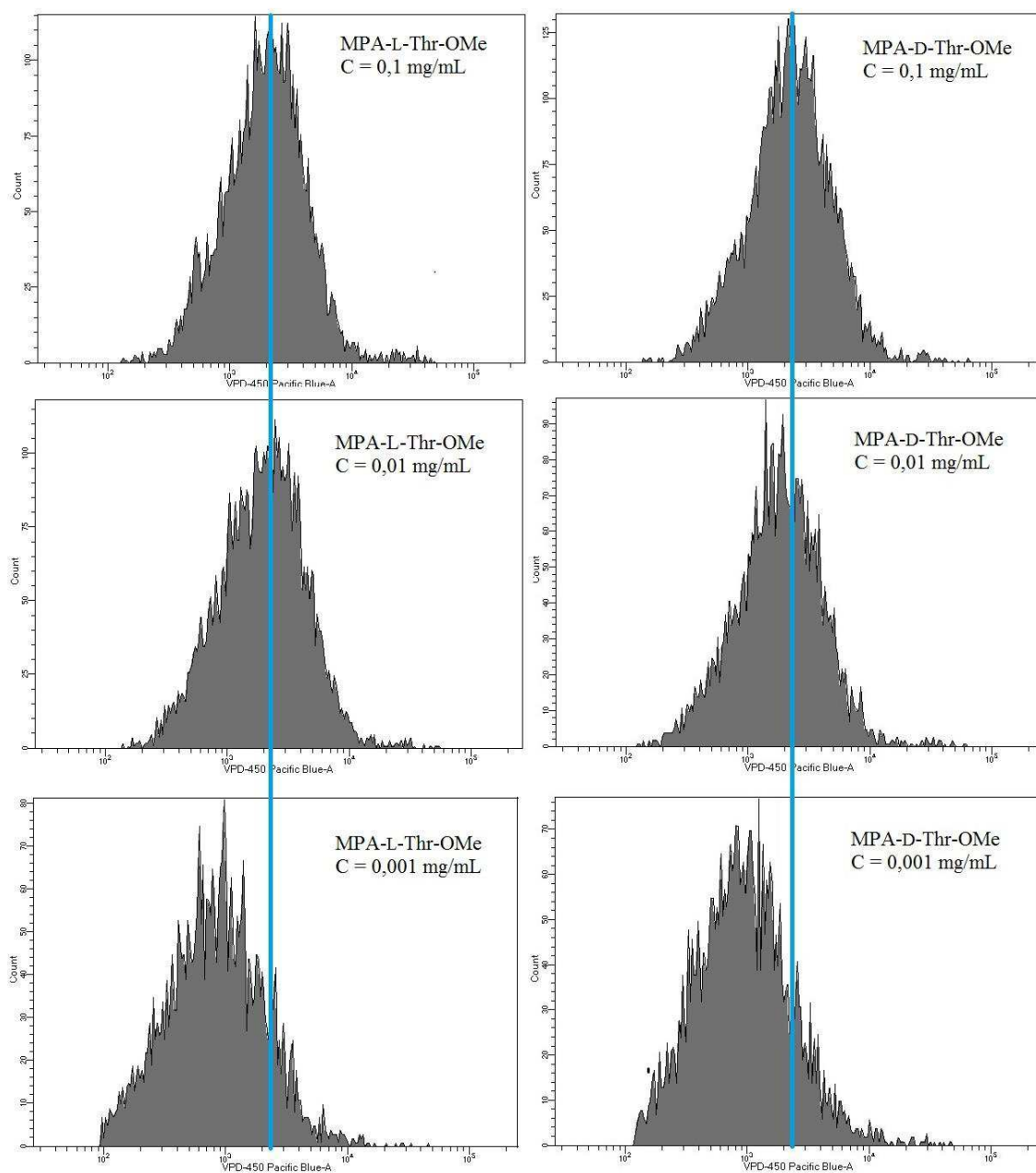
Ponownie zauważam różnicę pomiędzy pochodnymi z grupą karboksylową osłoniętą estrem metylowym **199-205** a związkami po deprotekcji **206-211**. Analogi MPA w postaci estrów metylowych są zdecydowanie bardziej aktywne od ich odpowiedników z wolną grupą karboksylową. Wyjątek stanowi pochodna MPA-L-Ile-OH (EC₅₀ = 2,257 µM), która charakteryzuje się niższą wartością EC₅₀ niż MPA-L-Ile-OMe (EC₅₀ = 8,9199 µM) w przypadku linii komórkowej T-Jurkat.

Wpływ konfiguracji aminokwasu na aktywność antyproliferacyjną nie jest tak wyraźny jak w przypadku testu cytotoksyczności. Jednakże tylko w przypadku pochodnej MPA-Thr-OH (linia komórkowa Jurkat), D enancjomer jest bardziej aktywny niż L. Pozostałe wyniki pokazują, że wartości EC₅₀ w przypadku L enancjomerów są niższe bądź bardzo zbliżone do ich D odpowiedników. Na wykresie 3 przedstawiłam porównanie aktywności antyproliferacyjnej związków **200 i 201** do MPA **9** wobec aktywowanych limfocytów. Histogramy (Rysunek 30) obrazują podziały komórek zawierających barwnik VPD450. Przesunięcie mediany pik fluorescencji w lewo (wzrastająca ilość podziałów komórkowych) koreluje ze zmniejszającym się stężeniem związków. Niebieską linią zazaczyłam pik fluorescencji komórek wybarwionych VPD450 w obecności najwyższego stężenia związku. Przy zmniejszających się

stężeniach związku pik przesuwają się w lewo, co świadczy o intensywniejszej proliferacji komórek.



Wykres 3. Porównanie aktywności antyproliferacyjnej związków **200** i **201** (pochodne o najlepszym SI) do MPA **9** wobec komórek PBMC.



Rysunek 30. Histogramy obrazujące podziały komórek zawierających barwnik VPD450 wobec komórek PBMC.

Tabela 10. Wartości EC₅₀ [μM] obliczone na podstawie testu proliferacyjnego z VPD 450 dla aminokwasowych pochodnych MPA **199-211**.

Związek	Nr	T-JURKAT			PBMC		
		EC ₅₀ [μM]	p	F	EC ₅₀ [μM]	p	F
MPA	9	0,2654 ± 0,1997			0,0301 ± 0,0003		
MPA-L-Asp(OMe)-OMe	199	16,7048 ± 0,2272	0,738456	0,1898	8,3904 ± 2,1163	0,121012	27,01
MPA-L-Thr-OMe	200	9,7426 ± 7,1403	0,293474	4,0537	10,0769 ± 7,8407	0,091283	47,974
MPA-D-Thr-OMe	201	13,805 ± 5,3637	0,379147	2,1777	9,442 ± 4,8327	0,098581	41,039
MPA-L-Ile-OMe	202	8,9199 ± 5,1038	0,104621	36,363	5,1207 ± NAN	0,666667	0,33
MPA-L-Arg-OMe	203	22,3433 ± 0,5089	< 0,05	3114,096	77,27 ± 2,9431	< 0,05	162,533
MPA-D-Arg-OMe	204	69,4726 ± 40,9042	< 0,05	722,822	95,574 ± NAN	< 0,05	491,973
MPA-Mal-(OMe) ₂	205	64,7888 ± 7,7683	0,091202	48,060	11,238 ± 5,5125	0,123955	25,713
MPA-L-Asp(OH)-OH	206	395,9154 ± 66,7415	< 0,05	1365,565	211,0166 ± 3,6952	< 0,05	1309,945
MPA-L-Thr-OH	207	82,9324 ± 70,4686	< 0,05	834,311	118,6346 ± NAN	< 0,05	17637,59
MPA-D-Thr-OH	208	21,4121 ± NAN	< 0,05	671,916	121,5115 ± NAN	< 0,05	5006,61
MPA-L-Ile-OH	209	2,257 ± 0,5256	0,182469	11,5115	9,0962 ± 5,4071	0,118256	28,316
MPA-L-Arg-OH	210	1169,7301 ± 474,8234	< 0,05	6110,172	131,9343 ± 2,7965	< 0,05	1729,118
MPA-D-Arg-OH	211	1036,7232 ± 16,15	< 0,05	3615,989	587,572 ± 11,2288	< 0,05	7041,57

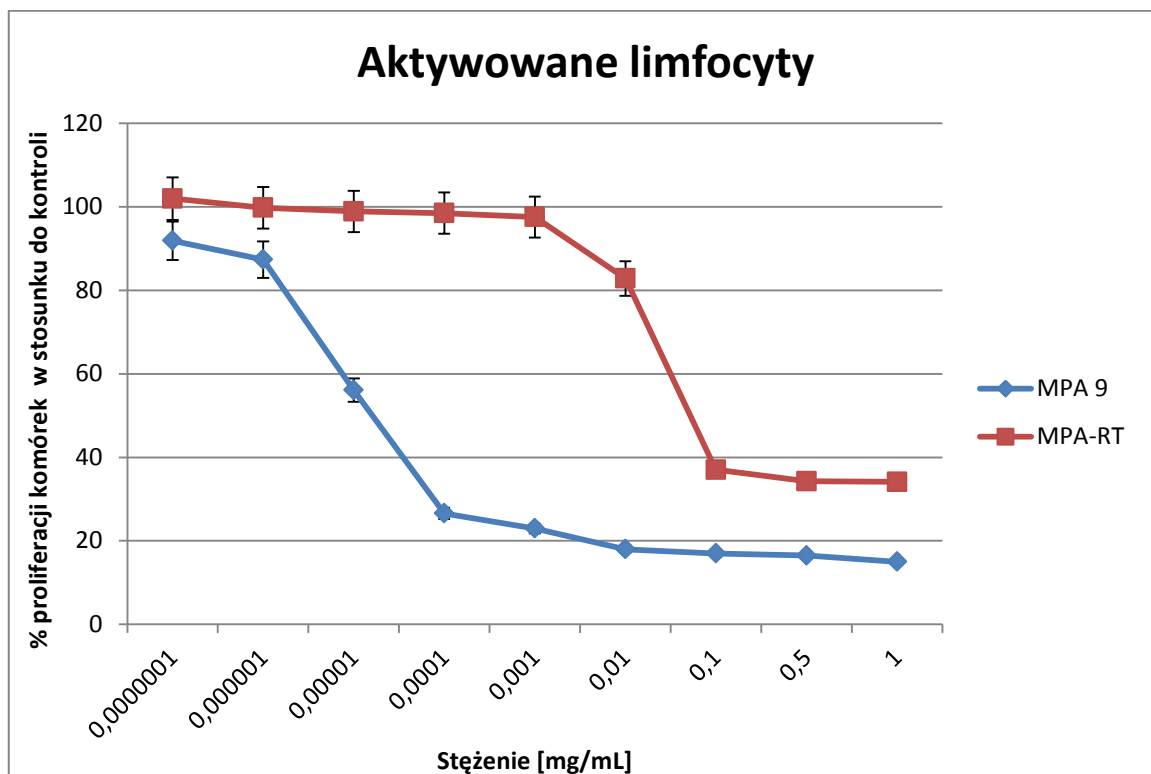
p – istotność statystyczna różnicy, F – test Fishera dla porównania związków MPA.

* Żywotność komórek obliczona w najwyższym badanym stężeniu 1mg/mL

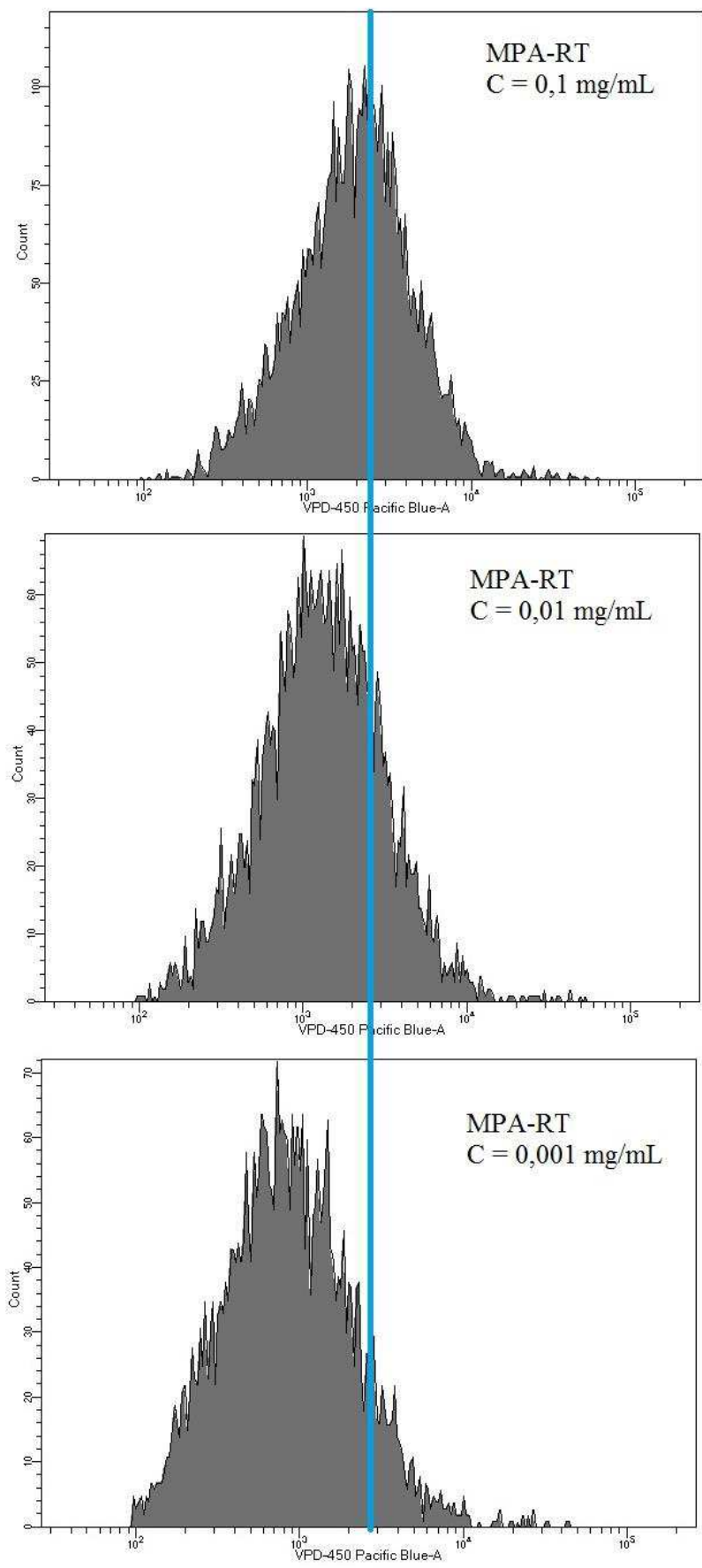
Peptydowe pochodne MPA

Tabela 11 zawiera wyniki aktywności antyproliferacyjnej dla peptydowych pochodnych MPA. Dla niektórych związków w przypadku linii komórkowej T-Jurkat nie udało mi się wyznaczyć wartości EC_{50} . W przypadku linii komórkowej T-Jurkat najbardziej aktywnymi związkami są **285** ($EC_{50} = 663,9288 \mu\text{M}$) i **289** ($EC_{50} = 555,9506 \mu\text{M}$). Jednak nawet te analogi wykazują ponad 2000 razy niższą aktywność niż MPA.

Analizując wyniki badań przeprowadzonych na komórkach PBMC, można zauważyć, że najwyższą aktywnością charakteryzuje się pochodna **285**, której wartość EC_{50} wynosi $35,4258 \mu\text{M}$, jednak jest to wartość ponad 1000 razy mniejsza niż dla MPA ($EC_{50} = 0,0301 \mu\text{M}$). Koniugaty MPA z retro-tuftsyna **285-291** charakteryzują się wyższą aktywnością od pochodnych MPA z tuftsyną **270-276**, jest to wyraźnie widoczne w przypadku komórek PBMC. Na wykresie 4 przedstawiłam porównanie aktywności antyproliferacyjnej koniugatu MPA z retro-tuftsyną **285** do kwasu mykofenolowego **9** wobec komórek PBMC. Rysunek 31 przedstawia ilość podziałów komórkowych w zależności od użytego stężenia związku **285**. Ponownie niebieską linią zazaczyłam pik fluorescencji komórek wybarwionych VPD450 w obecności najwyższego stężenia związku. W tym przypadku również wraz ze zmniejszeniem stężenia związku pik przesuwa się w lewo, co świadczy o intensywniejszej proliferacji komórek.



Wykres 4. Porównanie aktywności antyproliferacyjnej związku **285** (pochodna o najlepszym SI) do MPA **9** wobec komórek PBMC.



Rysunek 31. Histogramy obrazujące podziały komórek zawierających barwnik VPD450 wobec komórek PBMC.

Tabela 11. Wartości EC₅₀ [μM] obliczone na podstawie testu proliferacyjnego z VPD 450 dla peptydowych pochodnych MPA 270-276 i 285-291.

Związek	Nr	T-JURKAT				PBMC		
		EC ₅₀ [μM]	Żywołność [%]	p	F	EC ₅₀ [μM]	p	F
MPA	9	0,2654 ± 0,1997				0,0301 ± 0,0003		
MPA-T	270		60,78%			129,5805 ± 68,3779	< 0,05	1204,396
MPA-T-Gly	271	1030,1598 ± 50,8767		< 0,05	19448,05	589,7258 ± 266,0804	< 0,05	30012,11
MPA-T-αAla	272		55,31%			258,7448 ± 54,9349	< 0,05	2129,34
MPA-T-βAla	273	941,0136 ± 367,4714		< 0,05	8494,51	210,7091 ± 98,2546	< 0,05	23935,29
MPA-T-Val	274		55,10%			432,015 ± 108,4486	< 0,05	33684,84
MPA-T-Leu	275	801,0048 ± 54,2905		< 0,05	13789,92	551,1159 ± 3,1566	< 0,05	30012,11
MPA-T-Ile	276	924,1804 ± 175,2462		< 0,05	12454,59	357,2643 ± 107,0756	< 0,05	19110,15
MPA-RT	285	663,9388 ± NAN		< 0,05	7500,049	35,4258 ± NAN	< 0,05	29409,81
MPA-RT-Gly	286		56,72%			565,9218 ± NAN	< 0,05	37508,95
MPA-RT-αAla	287	838,5726 ± 85,4873		< 0,05	17956,11	168,1618 ± 75,2635	< 0,05	19775,92
MPA-RT-βAla	288		75,89%			153,6859 ± 92,9453	< 0,05	34031,44
MPA-RT-Val	289	555,9506 ± 113,0378		< 0,05	11780,75	128,762 ± 77,37	< 0,05	15052,48
MPA-RT-Leu	290		63,04%			160,6927 ± 62,364	< 0,05	17072,33
MPA-RT-Ile	291		52,77%			152,2295 ± NAN	< 0,05	19219,31

p – istotność statystyczna różnicy, F – test Fishera dla porównania związków MPA.

* Żywołność komórek obliczona w najwyższym badanym stężeniu 1mg/mL



2.1.3. *Selekcja pochodnych MPA o najkorzystniejszych parametrach*

Wyznaczenie współczynnika selektywności (SI), który jest stosunkiem cytotoksyczności związku (IC_{50}) do jego aktywności antyproliferacyjnej (EC_{50}), umożliwia porównanie otrzymanych pochodnych między sobą a także do związku macierzystego MPA. Pozwala to na wyselekcjonowanie analogu o najlepszej aktywności oraz jednocześnie najniższej toksyczności. Wraz ze wzrostem wartości współczynnika SI toksyczność związku maleje.

W Tabeli 12 przedstawiłam współczynniki selektywności dla otrzymanych aminokwasowych i peptydowych analogów kwasu mykofenolowego. W przypadku linii komórkowej T-Jurkat, żadna z otrzymanych pochodnych nie charakteryzowała się wyższym współczynnikiem aktywności od macierzystego związku MPA **9**. Natomiast, analizując wyniki badań przeprowadzonych na komórkach PBMC, wyselekcjonowałam trzy związki: **200**, **201** i **285** do dalszych badań jako potencjalne immunosupresanty. Pomimo, że wartość EC_{50} tych trzech wybranych analogów jest wyższa niż w przypadku MPA, pochodne te charakteryzują się zdecydowanie mniejszą cytotoksycznością porównując do kwasu mykofenolowego. Peptydowe pochodne **287** i **289** charakteryzują się podobnym współczynnikiem selektywności co MPA, jednak aby zahamować proliferację komórek potrzebna by była duża dawka leku, odpowiednio 168,1618 μ M dla **287** i 128,762 μ M dla **289**.

Tabela 12. Obliczony współczynnik selektywności (SI) dla linii komórkowej Jurkat i dla komórek PBMC.

Związek	Nr związku	SI = IC ₅₀ /EC ₅₀		Związek	Nr związku	SI = IC ₅₀ /EC ₅₀	
		JURKAT	PBMC			JURKAT	PBMC
MPA	9	228,2023	4,627907	MPA	9	228,2023	4,627907
MPA-L-Asp(OMe)-OMe	199	1,203648	2,158467	MPA-T	270	-	-
MPA-L-Thr-OMe	200	1,748096	5,681211	MPA-T-Gly	271	-	1,06417
MPA-D-Thr-OMe	201	8,33829	7,3328	MPA-T-aAla	272	-	2,162867
MPA-L-Ile-OMe	202	0,940291	0,424454	MPA-T-bAla	273	1,084285	2,495393
MPA-L-Arg-OMe	203	15,52963	0,181503	MPA-T-Val	274	-	-
MPA-D-Arg-OMe	204	8,239199	0,738992	MPA-T-Leu	275	-	1,246736
MPA-Mal-(OMe) ₂	205	1,562948	0,31163	MPA-T-Ile	276	0,875077	1,291606
MPA-L-Asp(OH)-OH	206	1,363097	0,238295	MPA-RT	285	1,462051	17,89376
MPA-L-Thr-OH	207	0,513858	0,688463	MPA-RT-Gly	286	-	1,529313
MPA-D-Thr-OH	208	10,68549	0,967677	MPA-RT-aAla	287	-	4,458347
MPA-L-Ile-OH	209	32,66983	2,294387	MPA-RT-bAla	288	-	3,823632
MPA-L-Arg-OH	210	-	2,147676	MPA-RT-Val	289	-	4,255784
MPA-D-Arg-OH	211	-	0,718549	MPA-RT-Leu	290	-	3,22936
				MPA-RT-Ile	291	-	3,502217

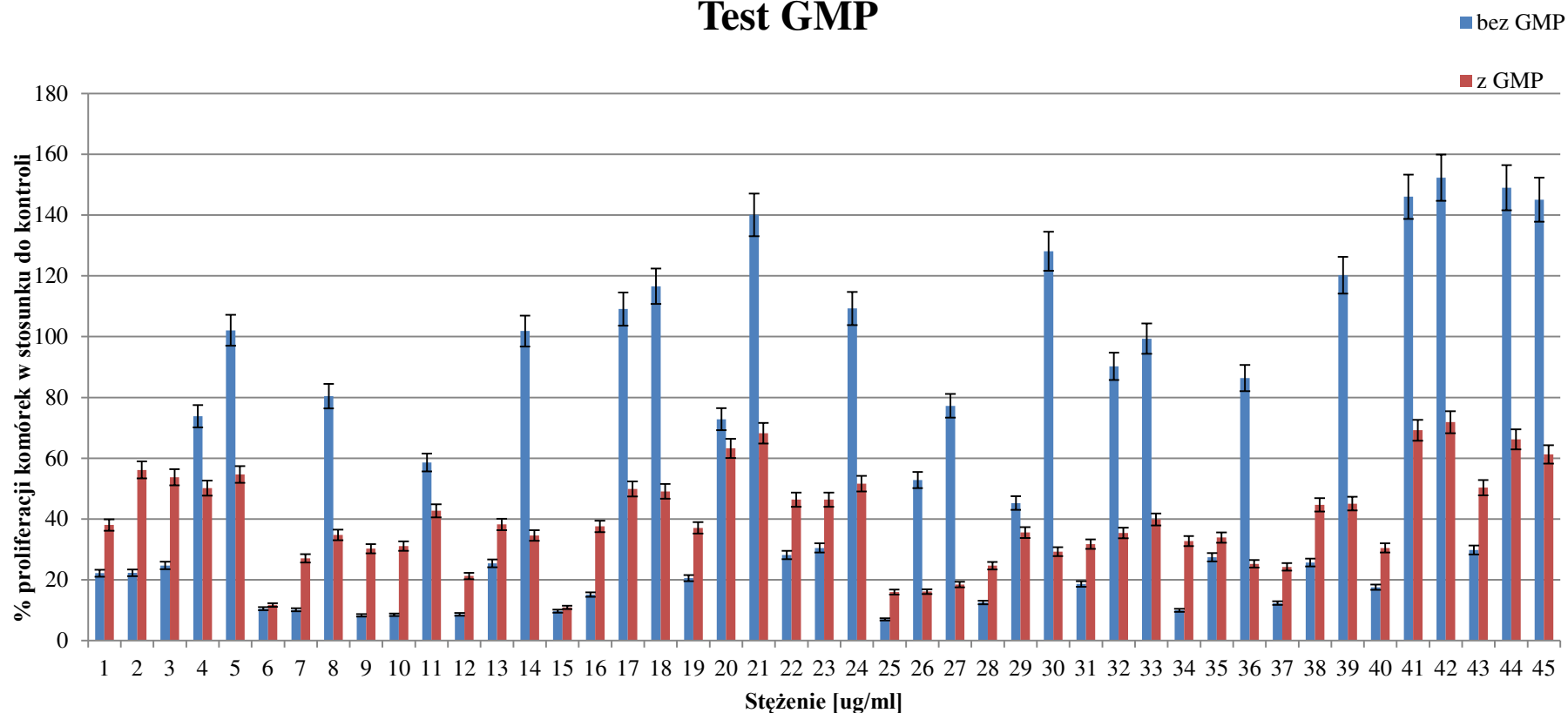
SI związków wyższy od SI MPA, SI związków podobny do SI MPA,

2.1.4. Oznaczenie aktywności antyproliferacyjnej związków 199-21, 273, 274, 285, 287 i 289 wobec komórek PBMC wykorzystując barwnik VPD450 w obecności GMP

Enzym dehydrogenaza inozyno 5' monofosforanu, którego inhibitorem jest kwas mykofenolowy, hamuje biosyntezę nukleotydów *de novo*. Dane w literaturze wskazują, że supresja proliferacji komórek pod wpływem inhibitorów IMPDH jest odwracalna przez dodanie guanozyny, GMP, GTP czy detoksy-GMP [89] [97]. W związku z tym wykonałam testy antyproliferacyjne z dodatkiem GMP, aby sprawdzić czy aktywność antyproliferacyjna otrzymanych przeze mnie związków opiera się o ten sam mechanizm działania co kwas mykofenolowy. W tym celu przeprowadziłam test antyproliferacyjny z wykorzystaniem barwnika VPD450 z dodatkiem 50 μ M GMP (stężenie GMP w dołku).

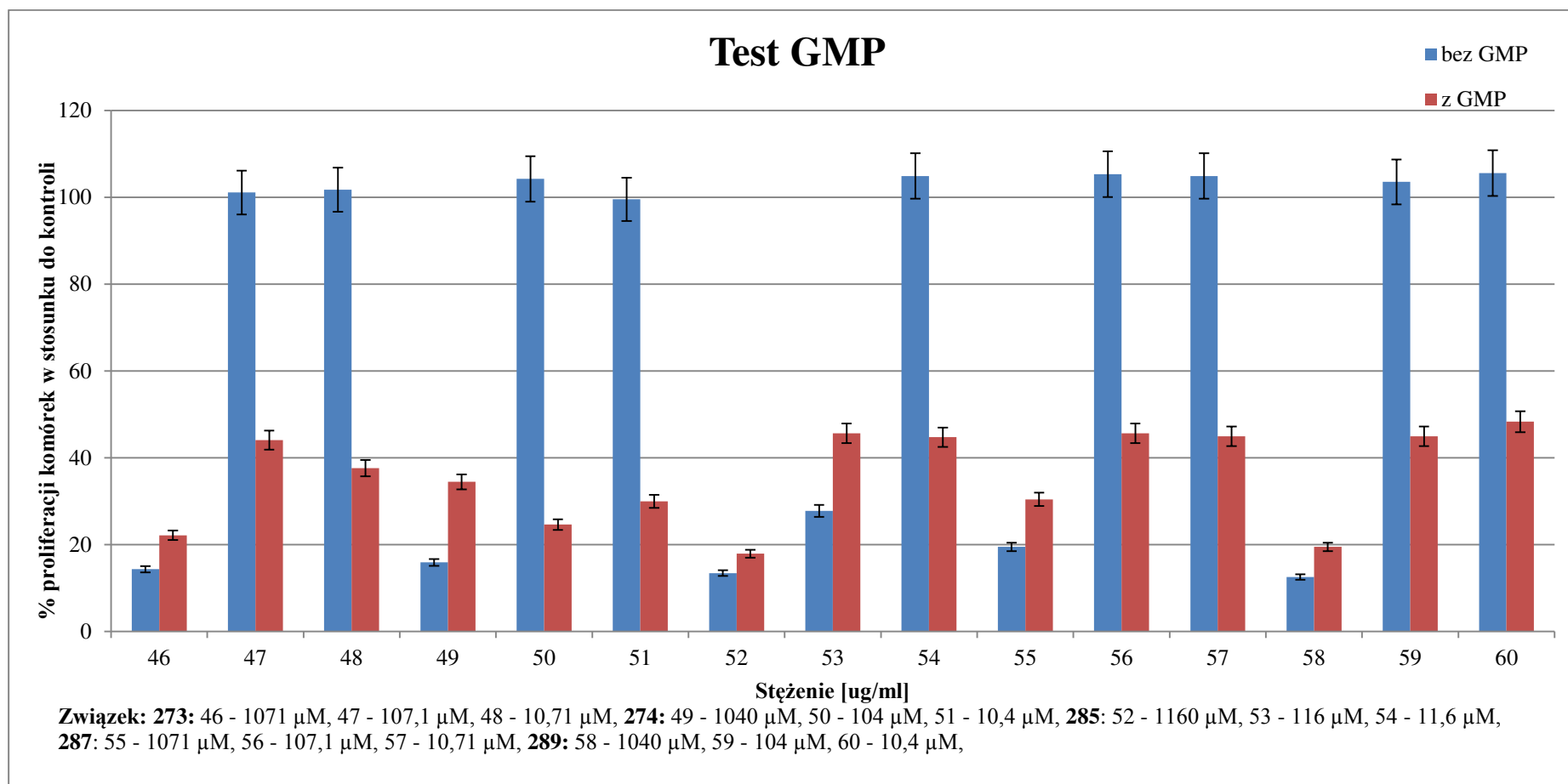
Na wykresach 5 i 6 przedstawiłam aktywność proliferacyjną komórek w stosunku do kontroli w określonych stężeniach. Mechanizm działania związków jest zgodny z działaniem MPA. W zakresie stężeń, w którym następuje zahamowanie proliferacji bez dodatku GMP, możemy zauważyć, że po dodaniu GMP proliferacja odwraca się i zdecydowanie wzrasta. Natomiast w stężeniach, w których proliferacja bez dodatku GMP wynosi ponad około 50% widać gwałtowny jej spadek po dodaniu GMP. W związku z tym po raz drugi obserwujemy odwrócenie proliferacji. W niższych stężeniach, w których związki nie zahamowują w znacznym stopniu proliferacji limfocytów, prawdopodobnie enzym IMPDH zostaje wyhamowany przez GMP (produkt), co może być spowodowane zaburzeniem równowagi substrat-produkt, z powodu nadmiaru guanozyno-5'-monofosforanu. W tych stężeniach możliwe jest także toksyczne działanie GMP znane z procesu netozy lub jego wpływ na inne szlaki metaboliczne (jako trzeci przekaźnik lub substrat dla innych enzymów).

Test GMP



Związek: 9: 1 - 312,2 μ M, 2 - 31,22 μ M, 3 - 3,122 μ M, 4 - 0,3122 μ M, 5 - 0,03122 μ M, **199:** 6 - 215,8 μ M, 7 - 21,58 μ M, 8 - 2,158 μ M, **200:** 9 - 229,6 μ M, 10 - 22,96 μ M, 11 - 2,296 μ M, **201:** 12 - 229,6 μ M, 13 - 22,96 μ M, 14 - 2,296 μ M, **202:** 15 - 223,4 μ M, 16 - 22,34 μ M, 17 - 2,234 μ M, 18 - 0,2234 μ M, **203:** 19 - 186,7 μ M, 20 - 18,67 μ M, 21 - 1,867 μ M, **204:** 22 - 1867 μ M, 23 - 186,7 μ M, 24 - 18,67 μ M, **205:** 25 - 222,5 μ M, 26 - 22,25 μ M, 27 - 2,225 μ M, **206:** 28 - 229,7 μ M, 29 - 22,97 μ M, 30 - 2,297 μ M, **207:** 31 - 237,3 μ M, 32 - 23,73 μ M, 33 - 2,373 μ M, **208:** 34 - 237,3 μ M, 35 - 23,73 μ M, 36 - 2,373 μ M, **209:** 37 - 230,7 μ M, 38 - 23,07 μ M, 39 - 2,307 μ M, **210:** 40 - 1917 μ M, 41 - 191,7 μ M, 42 - 19,17 μ M, **211:** 43 - 1917 μ M, 44 - 191,7 μ M, 45 - 19,17 μ M.

Wykres 5. Aktywność antyproliferacyjna aminokwasowych pochodnych MPA 199-211 w obecności GMP

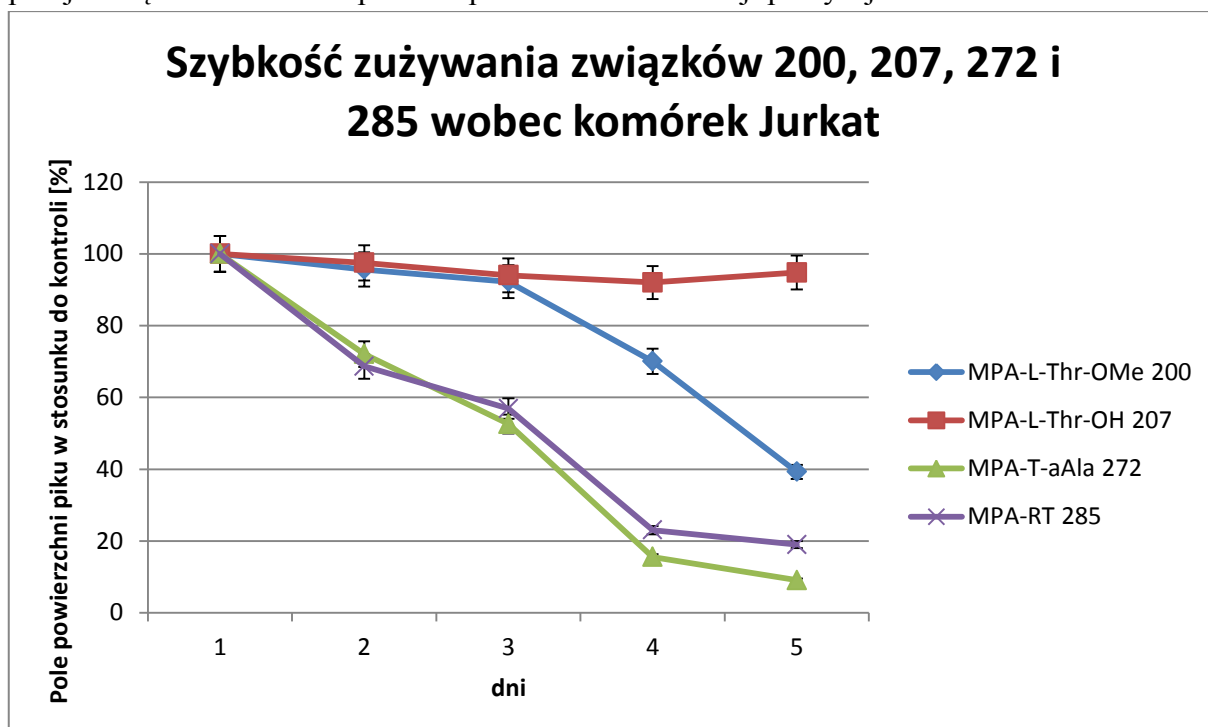


Wykres 6. Aktywność antyproliferacyjna wybranych peptydowych pochodnych MPA 273, 274, 285, 287, 289 w obecności GMP.

2.1.5. Oznaczenie szybkości zużywania wybranych związków przez komórki Jurkat z wykorzystaniem HPLC-MS

W celu sprawdzenia stabilności otrzymanych przeze mnie analogów MPA podczas hodowli komórkowych wykonałam test HPLC-MS, który pozwolił na oznaczenie ilości związków po kolejnych dniach inkubacji z komórkami Jurkat. Związki **200**, **207**, **272** i **285** w stężeniach odpowiadającym EC_{50} inkubowałam wraz z komórkami Jurkat przez 5 dni. Każdego dnia pobierałam próbkę do testu HPLC-MS. W tym celu do odpowiedniego dołka, z którego pobierałam próbkę danego dnia, dodawałam wody i mieszałam. Następnie wodny roztwór odwirowywałam, zbierałam nadsącz, a tak przygotowane do testu próbki przechowywałam w zamrażalniku.

Na wykresie 7 przedstawiłam szybkość zużywania związków **200**, **207**, **272** i **285** wobec komórek Jurkat podczas prowadzenia pięciodniowej inkubacji. Pole powierzchni pików dnia pierwszego oznaczyłam jako 100%. Analizując dane na poniższym wykresie, można zauważyć, że pochodna **207**, czyli aminokwasowy analog MPA z treoniną z wolną grupą karboksylową charakteryzuje się znaczną stabilnością, ilość związku w trakcie pięciodniowej inkubacji nie spada poniżej 90%. Analog MPA modyfikowany treoniną z grupą karboksylową osłoniętą estrem metylovym **200** także wykazuje dobrą stabilność wobec testowanej linii komórkowej, jednakże w piątym dniu inkubacji ilość pochodnej **200** wynosi około 40%. W związku z tym chcąc prowadzić inkubację dłuższą niż 5 dni, należałoby ponownie dodać odpowiednią porcję analogu **200**. Zdecydowanie mniej trwałe okazują się peptydowe pochodne MPA, co związane jest z ich rozbudowaną strukturą. Po 3 dniu inkubacji w dołku pozostaje nieznacznie ponad 50% analogów **272** i **285**. Fakt ten, skutkuje koniecznością dodania kolejnej porcji związków **272** i **285** podczas prowadzenia inkubacji powyżej 4 dni.



Wykres 7. Szybkość zużywania wybranych związków wobec komórek Jurkat podczas pięciodniowej inkubacji.

2.2. Badania przeciwnowotworowe *in vitro* na liniach komórkowych czerniaka i neuroblastomy

Aktywność biologiczną MPA **9** oraz otrzymanych wybranych aminokwasowych pochodnych: **200**, **201**, **203**, **204**, **207**, **208**, **210** i **211** oraz peptydowych **270** i **285** oceniano wobec komórek dwóch linii czerniaka amelanotycznego o różnym pochodzeniu: linia Ab czerniaka chomika Bomirskiego, linia A375 ludzkiego czerniaka oraz wobec komórek neuroblastomy SHSY5Y. Badania te prowadziłam we współpracy z Zakładem Embriologii oraz Zakładem Medycyny Laboratoryjnej w Gdańskim Uniwersytecie Medycznym.

Czerniak wywodzi się z melanocytów, czyli komórek wytwarzających i zawierających melaninę. Wyróżnia się dwie formy czerniaka: melanotyczną i amelanotyczną. Czerniak amelanotyczny jest odmianą rzadszą, którą znacznie trudniej zdiagnozować ze względu na brak charakterystycznych komórek wytwarzających melaninę, co jest charakterystyczne dla odmiany melanotycznej [188]. Złośliwe czerniaki są wysoce agresywnymi nowotworami z nieprzewidywalnym przebiegiem i złym rokowaniem. Czerniak amelanotyczny jest stosunkowo odporny chemicznie i odporny na promieniowanie [189].

Neuroblastoma (NB) jest guzem neuroendokrynnym, który najczęściej pochodzi z nadnerczy, ale może również rozwijać się w dowolnym miejscu wzdłuż współczulnego układu nerwowego w: szyi, klatce piersiowej, brzuchu lub miednicy [190]. Podstawą chemioterapii neuroblastomy jest terapia skojarzona obejmująca wysokie dawki cisplatyny i etopozydu naprzemiennie z winkrystyną, doksorubicyną i cyklofosfamidem [191]. Niektóre NB mogą zaniknąć u niemowląt bez stosowania leczenia (spontaniczna regresja). Inne mogą przetrwać bardzo intensywną wielolekową terapię. Z tego powodu NB jest znana jako jeden z najbardziej agresywnych i trudnych w leczeniu nowotworów u dzieci.

2.2.1. Wyznaczenie IC_{50} i analiza aktywności przeciwnowotworowej MPA oraz wybranych pochodnych aminokwasowych i peptydowych, za pomocą testu XTT

Komórki nowotworowe wysiewano na 96 dołkowe płytki w pożywce odpowiedniej dla danej linii. Po 24h wymieniano pożywkę i dodawano badane związki w ośmiu stężeniach (0,1; 1; 10; 20; 40; 50; 100; 150 μ M). Inkubację (w temp. 37°C, 5% CO₂) prowadzono przez 48 i 72 godziny. Wszystkie rozcieńczenia badanych związków przygotowywano w pożywce, a wyjściowe stężenie w wodzie z 5% DMSO.

Żywołność komórek mierzono za pomocą testu z wykorzystaniem XTT. Test ten polega na ocenie aktywności mitochondriów, które redukują sól tetrazolową XTT (sól sodowa 2,3-bis-(2-metoksy-4-nitro-5-sulfofenylo)-2H-tetrazolio-5-karboksyanilidu) do rozpuszczalnej w wodzie formy formazanu. Absorbancję pomarańczowego produktu mierzono przy pomocy spektrofotometru płytkowego przy długości fali 450 nm. Miarą aktywności cytotoksycznej testowanego związku była wartość stężenia IC_{50} , czyli takie jego stężenie, przy którym proliferacja/żywołność, mierzona aktywnością mitochondriów komórek, zostaje zahamowana w 50%, w odniesieniu do kontroli (100%). Gdy nie można było wyznaczyć IC_{50} miarą wpływu związku na komórki był

odsetek komórek żywych potraktowanych 150 μM stężeniem, czyli najwyższym badanym stężeniem.

Jako wzorce do badań użyliśmy dwa stosowane chemoterapeutyki: dakarbazynę oraz cisplatynę. Od połowy 2006 roku dakarbazyna jest powszechnie używana w leczeniu złośliwej odmiany czerniaka [192] [193], chłoniaka Hodgkina [194] oraz mięsaka [195] [196]. Natomiast cisplatyna stosowana jest w chemoterapii wielu nowotworów tj.: nowotwory jąder, jajników, szyjki macicy, pęcherza, płuc, szyi, głowy, przełyku, mózgu, międzybłoniaka i nerwiaka niedojrzałego [197].

Wyniki badań aktywności antynowotworowej MPA i wybranych otrzymanych pochodnych zestawiam w Tabeli 13. Dla wszystkich testowanych linii wyznaczyliśmy dawki IC_{50} dla MPA **9**, które wynosiły 0,2 μM , 2 μM , 0,4 μM odpowiednio dla komórek czerniaka Ab, A375 i komórek neuroblastomy SHSY5Y. Należy w tym miejscu dodać, iż dawki IC_{50} stosowanych w leczeniu obu nowotworów chemioterapeutyków: dakarbazyny (czerniak) i cisplatyny (neuroblastoma) wobec testowanych komórek wynosiły 69 μM , 35 μM , 2,5 μM odpowiednio dla komórek czerniaka Ab, A375 i komórek neuroblastomy SHSY5Y. Szczególną uwagę zwraca wielokrotnie niższa dawka MPA **9**, która jest konieczna do uzyskania efektu IC_{50} wobec komórek obu linii czerniaka amelanotycznego w porównaniu ze stosowaną w leczeniu systemowym tego nowotworu dakarbazyną. Ponadto, stężenie IC_{50} zostało obliczone po 48-godzinnej stymulacji, co nie było możliwe dla dakarbazyny.

W tym miejscu należy zwrócić uwagę, że dla linii nowotworowej SHSY5Y wartość IC_{50} dla MPA **9** była na podobnym poziomie jak dawka IC_{50} dla cisplatyny. Analizując wyniki można zauważyć, że kwas mykofenolowy wykazuje znacznie wyższą aktywność w stosunku do komórek czerniaka i prawie taką samą aktywność w stosunku do komórek neuroblastomy jak powszechnie stosowane leki przeciwnowotworowe. Poza tym zauważyliśmy szybsze działanie MPA niż dakarbazyny na obu testowanych liniach komórkowych czerniaka.

Pochodne MPA-Thr-OMe **200** i **201** wykazywały zdecydowanie niższą aktywność cytotoksyczną niż MPA **9** bez względu na konfigurację absolutną aminokwasu. Oba związki, zarówno MPA-L-Thr-OMe **200**, jak i MPA-D-Thr-OMe **201** hamowały aktywność mitochondriów w 50% komórek czerniaka Ab przy dawce ok. 20 μM . Jest to dawka wielokrotnie wyższa niż dla MPA **9** (0,2 μM) ale nadal trzykrotnie mniejsza niż dakarbazyny (69 μM). Warto również wspomnieć, że wartości IC_{50} dla tych dwóch pochodnych zostały obliczone po 48-godzinnej inkubacji (tak samo jak w przypadku MPA), co wskazuje na ich szybsze działanie niż dakarbazyna na tę linię komórkową. W związku z tym, że otrzymane związki **200** i **201** charakteryzowały się lepszą aktywnością w stosunku do linii komórkowej czerniaka chomika Bomirskiego, niż powszechnie stosowany chemoterapeutyk- dakarbazyna, sprawdziliśmy działanie tych pochodnych na linii komórkowej czerniaka ludzkiego A375. Niestety druga testowana linia komórkowa pozostaje oporna na działanie związków **200** i **201**, a dakarbazyna charakteryzuje się zdecydowanie większą cytotoksycznością. Komórki czerniaka A375 były nieco bardziej wrażliwe na działanie pochodnej MPA-D-Thr-OMe **201**, dla której IC_{50} wynosiło 104 μM . Pochodna MPA-L-Thr-OMe **200** zastosowana w dawce 150 μM powodowała zahamowanie mitochondriów w około 40% dla linii

komórkowej A375. Przeprowadzone testy na linii komórkowej neuroblastomy SHSY5Y ujawniły, że jest ona nieco bardziej wrażliwa na działanie pochodnej MPA-L-Thr-OMe **200** dla której IC_{50} wynosiło 139.2 μ M. Pochodna MPA-D-Thr-OMe **201** (150 μ M) zahamowała mitochondria w nieco ponad 20% komórek SHSY5Y. Oba związki wykazały zdecydowanie gorszą aktywność niż stosowany lek cisplatyna. Pochodne zawierające treoninę z wolną grupą karboksylową **207** i **208** nie wykazały aktywności na żadnej z badanych linii nowotworowych.

Związek MPA-L-Arg(NO₂)-OMe **203** w stężeniu 150 μ M był w stanie zahamować tylko 40-50 % aktywności mitochondriów na linii komórkowej czerniaka Ab, w związku z tym nie przeprowadzono dalszych badań. Natomiast pochodna MPA-D-Arg(NO₂)-OMe **204** okazała się nierozpuszczalna w wodzie z 5% DMSO co uniemożliwiło wykonanie badań. Ocena aktywności związków MPA-Arg(NO₂)-OH **210** i **211** wobec komórek czerniaka Ab, wykazała, że pochodna w stężeniu 62 μ l MPA-L-Arg-(NO₂)-OH **210** powoduje zahamowanie aktywności mitochondriów w 50% komórek. Wartość ta okazuje się, być bardzo podobna do IC_{50} wyznaczonego dla dakarbazyny, które wynosi 68,5 μ M. Natomiast pochodna MPA-D-Arg(NO₂)-OH **211** powodowała zbliżony efekt, ale przy zastosowaniu nieco ponad dwukrotnie wyższej dawki (150 μ M).

Tabela 13. IC₅₀ dla badanych związków na wybranych liniach nowotworowych.

Związek	Ab czerniak				A735 czerniak				SHSY5Y neuroblastoma	
	IC ₅₀ [uM]		% żywotności w stężeniu 150 μM		IC ₅₀ uM		% żywotności w stężeniu 150 μM		IC ₅₀ [uM]	% żywotności w stężeniu 150 μM
	48h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h	72h	72h
MPA 9	0.2±0.1	-	-	-	2.3±1.7	2±0.9			4.4±8.1	
MPA-L-Thr-OMe 200	15.9±0.4	18.9±6.2	-	-			51.4±8.6	59.5±11.3	139.2±7.7	
MPA-D-Thr-OMe 201	24.8±7.3	23.6±8.2	-	-	103.8±31.7			54.7±12.5		76.6±8.8
MPA-L-Thr-OH 207	NA	NA	NA	NA	NO	NO	NO	NO	NO	NO
MPA-D-Thr-OH 208	NA	NA	NA	NA	NO	NO	NO	NO	NO	NO
MPA-L-Arg(NO ₂)-OMe 203	-	-	50.7±12.6	61.9±27.5	NO	NO	NO	NO	NO	NO
MPA- L-Arg(NO ₂)-OH 210	85.9±36.4	62.3±12.1	-	-	NO	NO	NO	NO	NO	NO
MPA-D-Arg(NO ₂)-OH 211	NA	-	NA	48.4±29.4	NO	NO	NO	NO	NO	NO
MPA-T 270	NA	-	NA	75.1±12.6	NO	NO	NO	NO	NO	67.9±15.5
MPA-RT 285	NA	-	NA	68.9±15.4	NO	NO	NO	NO	NO	58.5± 6.7
Dakarbazyne	-	68.5±20.9	47.5±9.7	-	-	35.2±6.2	48.6±10.7	-	NO	NO
Cisplatyna	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	3.5±3.5	-

NA – nieaktywny związek
NO – nie oznaczono

Peptydowe analogi MPA zawierające w swojej strukturze tuftsynę **270** i retro-tuftsynę **285** (150 μ M) wpływały w podobnym stopniu na komórki czerniaka Ab i neuroblastomy SHSY5Y, powodując zahamowanie aktywności mitochondriów w ok. 30% komórek.

2.2.2. *Struktura vs aktywność biologiczna*

Jak widać z danych eksperymentalnych zawartych w Tabeli 8, pierwszym nasuwającym się spostrzeżeniem jest niewątpliwie wysoka aktywność związku macierzystego MPA **9** w stosunku do wszystkich badanych linii komórkowych. Można zatem wywnioskować, że odpowiedzialna za tak wysoką aktywność jest wolna, niezmodyfikowana grupa karboksylowa w cząsteczce kwasu mykofenolowego.

W przypadku pochodnych MPA z treoniną **200**, **201** i **207**, **208** zauważyliśmy zdecydowaną przewagę związków posiadających terminalną funkcję estru metylowego **200** i **201** w porównaniu do tych z wolną grupą karboksylową **207** i **208**, które to nie wykazały żadnej aktywności. Analizując wpływ konfiguracji aminokwasu widać, że analog MPA-L-Thr-OMe **200** lepiej inhibuje aktywność mitochondriów w przypadku dwóch linii komórkowych: czerniaka Ab i neuroblastomy SHSYBY niż pochodna o konfiguracji D **201**.

Wszystkie trzy testowane pochodne MPA modyfikowane arginina **203**, **210** i **211** wykazały aktywność biologiczną. Jednak wartość IC_{50} dało się wyznaczyć jedynie dla analogu o konfiguracji L z wolną grupą karboksylową **210**. Obecność grupy nitrowej, która pełni funkcję ochronną dla grupy guanidynowej, może mieć wpływ na aktywność wszystkich trzech związków. Analizując wpływ konfiguracji aminokwasu możemy stwierdzić, że związki **203** i **210** o konfiguracji L wykazują lepszą aktywność w porównaniu do enancjomeru D **211**.

Połączenie MPA z peptydami takimi jak tuftsyna **270** i retro-tuftsyna **285** pozwoliło na inhibicję aktywności komórek czerniaka Ab i neuroblastomy SHSYBY w około 30%. Nie zauważyliśmy znaczącej różnicy wpływu na aktywność biologiczną pomiędzy tymi dwoma peptydami. Stosunkowo niska inhibicja aktywności komórek może być spowodowana szybszym rozpadem związków **270** i **285** ze względu na ich skomplikowaną strukturę.

2.3. *Badania mikrobiologiczne*

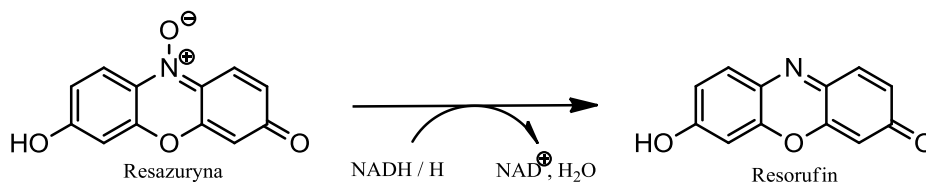
Oporność wielolekowa stanowi istotny problem w leczeniu zakażeń bakteryjnych, a modyfikacje struktury MPA mogą korzystnie wpłynąć na właściwości przeciwbakteryjne związku macierzystego. Otrzymane przeze mnie w ramach realizacji niniejszej pracy doktorskiej nowe pochodne MPA przebadano na sześciu szczepach referencyjnych: *Staphylococcus aureus* MSSA ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300, *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (ESBL), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 oraz trzech klinicznych: *Staphylococcus aureus* MSSA, *Klebsiella pneumoniae* ESBL+ i *Klebsiella pneumoniae* ESBL-. Opisane poniżej badania mikrobiologiczne wykonywane były we współpracy z Katedrą Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej.

2.3.1. Wyznaczenie MIC i analiza aktywności przeciwbakteryjnej MPA i otrzymanych pochodnych za pomocą metody mikrorozcieńczeń w bulionie

Wykorzystana podczas badań metoda mikrorozcieńczeń w bulionie umożliwiła określenie minimalnego stężenia inhibitora wzrostu mikrobiologicznego (MIC) w wąskim i dokładnym zakresie stężeń. Przeprowadzając badania na 96-dołkowych płytkach, wyniki analizować można polegając na wizualnej ocenie stopnia zmętnienia w danym dołku lub za pomocą spektrofotometru (OD600) [198] [199]. Podczas badania związków nierozpuszczalnych w wodzie zawierających w swej budowie fragment argininy, może wystąpić zakłócenie odczytywania absorbancji, w związku z czym zalecane jest stosowanie barwnych wskaźników wzrostu drobnoustrojów. Pomiar aktywności słabo rozpuszczalnych związków może być obarczony błędem.

Do 96-dołkowych płytek zaaplikowano związki **199, 200, 202, 203, 205, 273, 286 i 288** w stężeniach od 256,0 $\mu\text{g/mL}$ do 0,125 $\mu\text{g/mL}$ oraz **9, 201, 204, 206-211, 270-272, 274-276, 285, 287 i 289-291** w stężeniach 3000,0 $\mu\text{g/mL}$ do 5,9 $\mu\text{g/mL}$. Jako kontrolę stosowano dwa konwencjonalne antybiotyki: ampicylinę lub kanamycynę. W przypadku ampicyliny zakres stężenia wynosił od 256,0 do 0,125 $\mu\text{g/mL}$, dla kanamycyny od 1000,0 do 2,0 $\mu\text{g/mL}$. Do każdego dołka dodano odpowiednio przygotowaną zawiesinę bakteryjną. Inokulowane płytki inkubowano w $35\pm 1^\circ\text{C}$ przez 18-20 godzin. Po tym czasie określono wartość MIC za pomocą spektrofotometru oraz dokonano oceny wizualnej. MIC mierzone technikami spektrofotometrycznymi określono jako najmniejsze stężenie związku, powyżej którego hamowanie wzrostu komórek bakteryjnych wyrażano jako MIC₅₀ i MIC₉₀ (odpowiednio 50% i 90% zatrzymania wzrostu bakteryjnego).

W prezentowanej pracy jako wskaźnik obecności żywych mikroorganizmów obecnych w eksperymencie zastosowano wskaźnik redoks - resazurynę. Resazuryna zredukowana jest przez aktywność metaboliczną mikroorganizmów zmieniając kolor z niebieskiego (resazuryna) na różowy (resorufin) (Rysunek 32), a intensywność koloru koreluje z wielkością populacji. W tej i innych pracach stwierdzono, że zastosowanie resazuryny jako wskaźnika aktywności metabolicznej bakterii zwiększa czułość metody [200].



Rysunek 32. Redukcja resazuryny do resorufiny.

W przypadku standardowych antybiotyków i MPA dla szczepu *E. coli* można było określić MIC₉₀, dla pozostałych związków dla wszystkich testowanych bakterii określono MIC₅₀. Stężenia hamujące badanych związków **199-211, 270-276 i 285-291** dla wybranych mikroorganizmów ($\mu\text{g/mL}$) przedstawiono w Tabeli 14. Wykres 8 przedstawia porównanie wartości MIC ($\mu\text{g/mL}$) badanych związków oraz standardowych leków przeciwko badanym szczepom bakteryjnym.

Tabela 14. Stężenie hamujące badanych związków dla wybranych szczepów bakteryjnych (µg/ml).

Nr związku	MIC [µg/ml]								
	Gram-dodatnie bakterie				Gram-ujemne bakterie				
	<i>Staphylococcus aureus</i> MSSA ATCC 25923	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA ATCC 43300	<i>Staphylococcus aureus</i> MSSA clinical strain	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL+ clinical strain	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL- clinical strain	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
MPA	>>187,5	>>375,0	256	128	750	128	256	64	>>1500,0
199	32		64	256	256	256	256	256	NI
200	8		32	256	256	256	256	256	NI
201	NI	NI			>>1500,0	NI			>>1500,0
202	16		64	256	256	256	256	256	NI
203	32		64	128	256	64	256	64	NI
204	NI	NI			>>375,0	NI			>>1500,0
205	256		32	256	256	128	256	128	NI
206	NI	NI			>>750,0	NI			>>1500,0
207	NI	NI			>>750,0	>>375,0			>>1500,0
208	NI	NI			>1500,0	NI			>>1500,0
209	NI	NI			>>375,0	>>187,5			>750,0
210	NI	NI			>>750,0	NI			NI
211	NI	NI			>>3000,0	NI			>>1500,0
270	NI	NI			>>1500,0	NI			NI
271	NI	NI			>>3000,0	>>1500,0			NI
272	NI >>1500	NI >>750			NI	NI			NI
273	32		64	128	128	32	256	64	NI
274	NI >>1500	NI >>750			NI	NI >>750			NI

275	NI	NI >>750			NI	NI >>750			NI
276	NI	NI >>750			NI	NI >>750			NI
285	NI	NI			>>1500,0	NI			NI
286	64		256	128	256	16	256	64	NI
287	NI >>1500	NI >>750			NI	NI >>750			NI
288	32		256	128	256	32	256	128	NI
289	NI >>375	NI >>375			NI	NI >>750			NI
290	NI >>1500	NI >>375			NI	NI			NI
291	NI >>375	NI >>750			NI	NI			NI
Kanamycyna	7,8	125			15,6	NI			1500
Ampicylina	0,125	128	0,125	2	8	128	256	128	256

Wartość pogrubioną czcionką - MIC, tj. Najniższe stężenie powodujące całkowite zahamowanie wzrostu lub zmniejszenie liczby populacji bakteryjnych o ponad 90%;

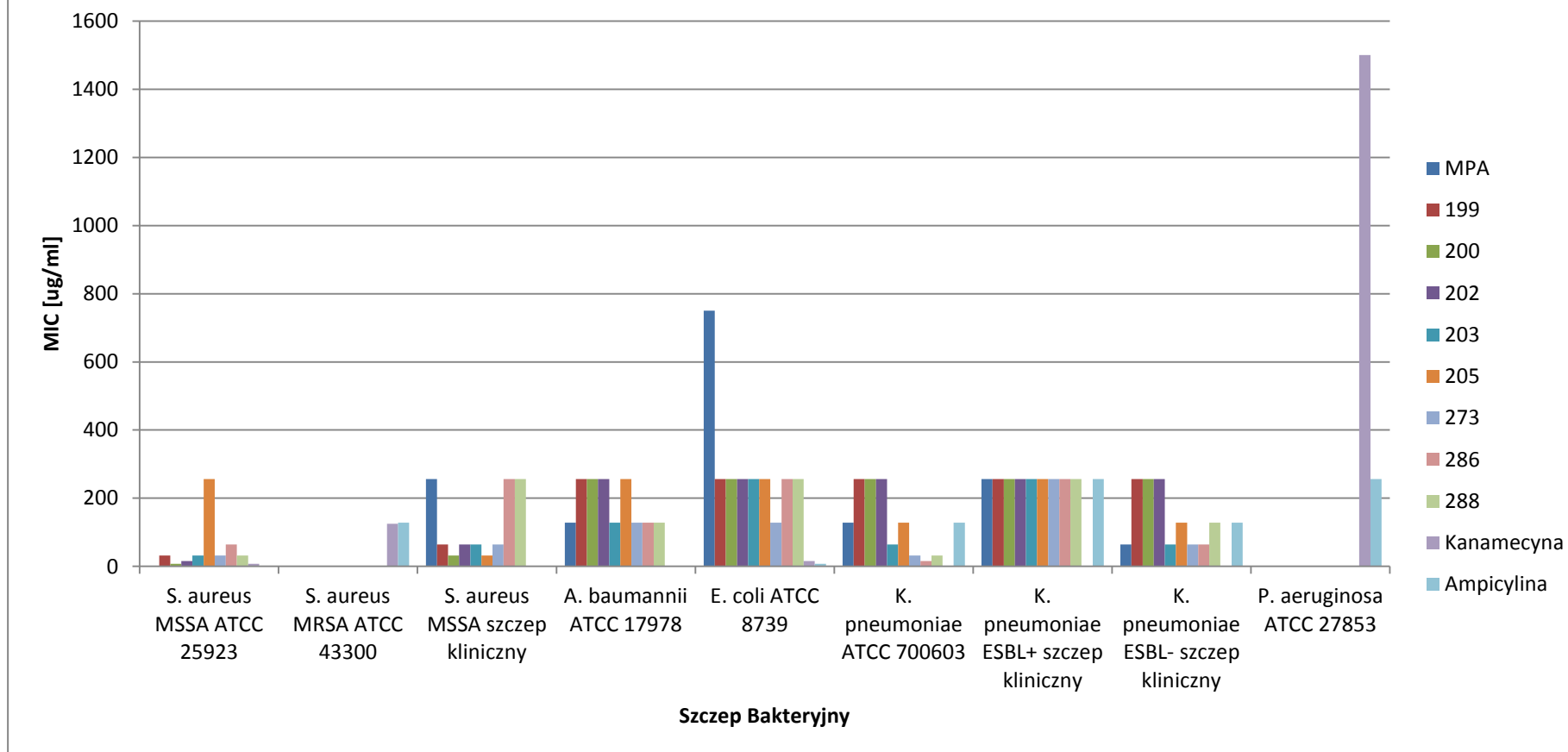
Inny - MIC50

Wartość z oznaczeniem ">" - stężenie hamujące wzrost o 10-50% w stosunku do pozytywnej kontroli

Wartość ze znakiem ">>" - stężenie powodujące bardzo słabe zahamowanie wzrostu (mniej niż 10% kontroli)

"NI" - nie działa hamująco na stężenia związków lub stymuluje wzrost

Porównanie wartości MIC dla wybranych związków w stosunku do poszczególnych szczepów bakteryjnych



Wykres 8. Porównanie wartości MIC [$\mu\text{g/mL}$] wybranych aktywnych związków w stosunku do różnych szczepów bakteryjnych.

Poszczególne testowane związki wywierały różne efekty w zależności od szczepu bakterii. Pochodne **199**, **200**, **202**, **203**, **205**, **273**, **286** i **288** odznaczały się największą aktywnością przeciw *S. aureus* (bakterie Gram dodatnie), z wyróżnieniem większej wrażliwości szczepu MSSA niż MRSA. Analizując wyniki, można zauważyć, że analog **200** dla szczepu *S. aureus* MSSA, wykazuje znaczącą inhibicję wzrostu ($MIC_{50} = 8 \mu\text{g/ml}$) w porównaniu ze związkiem macierzystym MPA **9** ($MIC_{50} > 187,5 \mu\text{g/ml}$) a także porównywalną do kanamycyny ($MIC_{50} = 7,8 \mu\text{g/ml}$).

W przypadku *K. pneumoniae* dla pochodnych **199**, **200**, **202** MIC_{50} wynosi 256 $\mu\text{g/ml}$ (stężenie graniczne) i jest wyższe niż dla MPA ($MIC_{50} = 128 \mu\text{g/ml}$). Natomiast, związki **203**, **273**, **286** i **288** ($MIC_{50} = 64, 16, 32, 32 \mu\text{g/ml}$) charakteryzowały się zwiększonym działaniem przeciwbakteryjnym w porównaniu z macierzystym MPA oraz stosowanymi antybiotykami: kanamycyną i ampicyliną. Związek **205** porównywalnie hamował *K. pneumoniae* do ampicyliny (128 $\mu\text{g/ml}$). MIC_{50} dla tego związku odpowiada MIC_{50} MPA.

Podczas badań antybakteryjnych nie zauważyliśmy interesującego wpływu testowanych związków na szczepy bakteryjne: *A. baumannii* oraz *Escherichia coli*. Ponadto nie stwierdziliśmy bakteriostatycznego wpływu badanych pochodnych na *Pseudomonas aeruginosa*. Pozostałe związki **201**, **204**, **206-211**, **270-272**, **274-276**, **285**, **287** i **289-291** powodowały bardzo słabe zahamowanie wzrostu (<10% kontroli) lub nie hamowały wzrostu bakterii. Podsumowując można zauważyć, że modyfikacje struktury MPA, takie jak **199**, **200**, **202**, **203**, **205**, **273**, **286** i **288** są obiecujące dla szczepu *S. aureus*, a **203**, **273**, **286** i **288** dla *K. pneumoniae*.

2.3.2. Struktura vs aktywność mikrobiologiczna

Analizując dane zawarte w tabeli 9 można powiedzieć, że aktywność mikrobiologiczna pochodnych zawierających estry aminokwasów zależy zarówno od podstawnika jak i konfiguracji w ugrupowaniu aminokwasowym. W przypadku enancjomerów treoniny **200**, **201** i argininy **203**, **204** wyraźnie widoczna jest mniejsza aktywność enancjomeru D niż L wobec wszystkich badanych szczepów. Hydroliza estrów metylowych **206-211** znacznie zmieniła aktywność związków. Można zauważyć znaczną przewagę pochodnych estrowych nad tymi, z wolną grupą karboksylową. Widoczne jest to w przypadku wszystkich badanych szczepów bakterii. Może być to spowodowane lepszą penetracją związku do błony komórkowej z powodu niższej polarności [76].

W przypadku peptydowych analogów MPA, interesujące wyniki otrzymano dla trzech pochodnych MPA połączonych z: tuftsyną modyfikowaną na grupie ϵ -aminowej β -alaniną **273** oraz retro-tuftsyną modyfikowaną na grupie ϵ -aminowej glicyną **286** i β -alaniną **288**. Pozostałe pochodne nie wykazały żadnej bądź zadawalającej aktywności. Związki **273**, **286** i **288** charakteryzują się lepszą aktywnością niż związek macierzysty MPA. Ponadto w przypadku szczepów *K. pneumoniae* ich wartości MIC były niższe niż dla antybiotyków referencyjnych: kanamycyny i ampicyliny. Nieznacznie lepszą aktywnością mikrobiologiczną w przypadku szczepu *S. aureus* wykazały pochodne **273** i **288** zawierające ugrupowanie β -alaninowe w strukturze peptydowej.

Nie zauważamy różnicy pomiędzy szkieletami tuftsyny a retro-tuftsyny we wpływie na badane szczepy bakteryjne.

CZEŚĆ EKSPERYMENTALNA

Wszystkie reakcje przeprowadzałam w bezw. DMF, który uprzednio oczyszczałam poprzez destylację z benzenu/wody. Do oczyszczania związków metodą chromatografii kolumnowej stosowałam żel krzemionkowy Merck 60 (0,063-0,2 mm). Do chromatografii cienkowarstwowej TLC stosowałam płytki pokryte żelem krzemionkowym [silica gel 60 (0,040-0,063mm); 1.05554.0001 Merck]. Używałam następujących układów:

A	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:CH ₃ COOH	15:1:0,1 v/v/v
B	CH ₂ Cl ₂ :MeOH	50:1 v/v
C	CHCl ₃ :MeOH:NH ₃	5:1:0,2 v/v/v
D	CHCl ₃ :MeOH	50:1 v/v
E	CHCl ₃ :MeOH	30:1 v/v
F	CHCl ₃ :MeOH	20:1 v/v
G	CHCl ₃ :MeOH	9:1 v/v
H	CHCl ₃ :MeOH:NH ₃	3:1:0,2 v/v/v

Jako odczynnik wywołujący zastosowałam roztwór ninhydryny (200 mg ninhydryny, 100 mL etanolu i 2 mL kwasu octowego).

Widma ¹H NMR i ¹³C NMR zostały wykonane za pomocą aparatu Varian Unity Plus 500 w Gdańskim Międzyuczelnianym Laboratorium NMR lub Bruker Avance III HD 400 MHz w Katedrze Chemii Nieorganicznej PG w CDCl₃, CD₃OD lub DMSO. Widma masowe wykonano w Laboratorium Spektrometrii Mas w Katedrze Chemii Analitycznej Politechniki Gdańskiej na aparacie BIFLEX III Bruker, z zastosowaniem CCA lub DHB jako matrycy.

Oznaczenia HPLC-MS/MS wykonywane były na aparacie Agilent 1290 Infinity LC with an Agilent 6540 Accurate Mass Q-TOF LC/MS System w Katedrze Chemii Analitycznej Politechniki Gdańskiej. Warunki rozdzielania i detekcji chromatograficznej HPLC badanych związków: kolumna - Poroshell EC-C18 (3,0 x 150 mm) / 2,7 mm, Agilent Technologies; temperatura kolumny: 40 ° C; objętość wtrysku: 2 µL; szybkość przepływu: 0,4 mL / min; eluenty: (A) 0,1% HCOOH w wodzie, (B) 0,1% HCOOH w ACN / MeOH (1: 1, v / v).

Pomiary spektrofotometryczne wykonane zostały za pomocą spektrofotometru PerkinElmer 2030Multilabel Reader VictorTMX4 natomiast pomiary cytometryczne wykonywane były z wykorzystaniem analizatora komórek BD LSRFortessa™ w Zakładzie Immunologii Klinicznej i Transplantologii.

Wartości EC_{50} oraz IC_{50} wyznaczone były za pomocą programu SigmaPlot 11. Wartości p i F wyznaczone były z wykorzystaniem programu STATISTICA 11.0.

1. Część syntetyczna

1.1. Materiały stosowane podczas syntezy analogów MPA

Nazwa	Firma
MPA	Tocris Bioscience
chronione aminokwasy	Bachem
chronione aminokwasy	Sigma-Aldrich
chronione aminokwasy	GL Biochem (Shanghai) Ltd
DMAP	Sigma-Aldrich
DMF	Sigma-Aldrich
EDCI	Sigma-Aldrich
T3P	Alfa Aesar
TEA	Alfa Aesar
DEA	Alfa Aesar
CH_2Cl_2	POCH
$CHCl_3$	POCH
płytki TLC	Merck
$LiOH \cdot H_2O$	POCH
MeOH	POCH
EtOAc	POCH

1.2. Synteza aminokwasowych analogów MPA w postaci estrów metylowych

Aminokwasowe pochodne MPA otrzymałam stosując procedury EDCI/DMAP oraz T3P/TEA.

1.2.1. EDCI/DMAP

Chlorowodorek estru metylowego aminokwasu (0,181 mmol), MPA (0,166 mmol) i DMAP (0,270 mmol) rozpuściłam w 2 ml bezwodnego DMF. Następnie roztwór ochłodziłam do $0^\circ C$ w łaźni lodowej, po czym dodałam (0,271 mmol) EDCI. Całość mieszałam przez 2h w $0^\circ C$, a następnie w temperaturze pokojowej przez 48h. Postęp reakcji kontrolowałam za pomocą TLC w układach A i B. Po zakończeniu syntezy rozpuszczalnik oddestylowałam pod zmniejszonym ciśnieniem, stosując pompę

próżniową. Produkt oczyszczałam za pomocą preparatywnej chromatografii cienkowsarstwowej.

1.2.1.1. Synteza estru metylowego N-mykofenoilo-L-asparaginy 199

Związek **199** otrzymałam za pomocą procedury EDCI/DMAP z wydajnością 73%.

Charakterystyka związku 199:

MPA-Asp(OMe)-OMe (199): ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 1,713 (s, 3H, f), 2,065 (s, 3H, e), 2,099 (m, 2H, g), 2,135 (m, 2H, h), 2,595 (m, 1H, β -D3b), 2,684 (dd, $J=16,3$ Hz, $J=6,3$ Hz, 1H, β -D3a), 3,271 (d, $J=6,8$ Hz, 2H, d), 3,580 (s, 3H, OMe), 3,587 (s, 3H, OMe), 3,679 (s, 3H, c), 4,541 (dd, $J=14,3$ Hz, $J=6,9$ Hz, 1H, α -D2), 5,089 (t, $J=6,5$ Hz, 1H, a), 5,225 (s, 2H, b), 8,321 (d, $J=12,8$ Hz, 1H, D-NH);

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ ppm: 11,488 (e), 16,424 (f), 22,857 (d), 34,264 (g), 35,248 (h), 36,057 (β -D3), 48, 822 (α -D2), 52,110 (OMe), 52,553 (OMe), 61,061 (c), 69,042 (b), 107,383(l), 116,188 (r), 122,910 (o), 123,078 (a), 134,294 (j), 146,228 (m), 153,461 (p), 163,006 (k), 170,667 (n), 170,873 (D1), 171,690 (D4), 172,247 (D-NH);

MS m/z obliczone dla $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{NO}_9$ 463,1842; znalezione 462,1827 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

$R_f = 0,5$ (układ B);

Czystość HPLC 89,15%.

1.2.1.2. Synteza estru metylowego N-mykofenoilo-L-treoniny 200

Związek **200** otrzymałam za pomocą procedury EDCI/DMAP z wydajnością 71%.

Charakterystyka związku 200:

MPA-L-Thr-OMe (200): ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 - d_1) δ ppm: 1,18 (d, $J=6,4$ Hz, 3H, γ -T4), 1,83 (s, 3H, f), 2,16 (s, 3H, e), 2,33 (m, 2H, g), 2,40 (m, 2H, h), 3,4 (d, $J=6,8$ Hz, 2H, d), 3,75 (s, 3H, c), 3,77 (s, 3H, OMe), 4,31 (m, 1H, β -T3), 4,59 (dd, $J=8,8$ Hz, $J=2,4$ Hz, 1H, α -T2), 5,21 (s, 2H, b), 5,27 (t, $J=6,6$ Hz, 1H, a), 6,34 (d, $J=8,7$ Hz, 1H, T-NH);

^{13}C NMR (CDCl_3 - d_1) δ ppm: 11,564 (e), 16,249 (f), 19,842 (γ -T4), 22,681 (d), 34,904 (g), 34,981 (h), 52,568 (OMe), 57,070 (β -T3), 61,053 (c), 68, 042 (α -T2), 70,018 (b), 106,452 (l), 116,730 (r), 122,193 (o), 122,949 (a), 134,394 (j), 144,130 (m), 153,637 (p), 163,587 (k), 171,614 (n), 173,475 (T-NH);

MS m/z obliczone dla $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{NO}_8$ 435,1893; znalezione 436,2009 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

$R_f = 0,5$ (układ A);

Czystość HPLC 99,77%.

1.2.1.3. Synteza estru metylowego *N*-mykofenoilo-*D*-treoniny **201**

Związek **201** otrzymałam za pomocą procedury EDCI/DMAP z wydajnością 70%.

Charakterystyka związku **201**:

MPA-D-Thr-OMe (201): ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 0,98 (d, $J=6,4$ Hz, 3H, γ -T4), 1,723 (s, 3H, f), 2,054 (s, 3H, e), 2,125 (m, 2H, g), 2,187 (m, 2H, h), 3,262 (d, $J=6,8$ Hz, 2H, d), 3,587 (s, 3H, c), 3,670 (s, 3H, OMe), 4,018 (m, 1H, β -T3), 4,214 (dd, $J=8,5$ Hz, $J=3,5$ Hz, 1H, α -T2), 5,1 (t, $J=6,5$ Hz, 1H, a), 5,21 (s, 2H, b), 7,945 (d, $J=8,5$ Hz, 1H, T-NH);

^{13}C NMR (CDCl_3 - d_1) δ ppm: 11,56 (e), 16,24 (f), 19,84 (γ -T4), 22,67 (d), 34,90 (g), 34,97 (h), 52,56 (OMe), 57,06 (β -T3), 61,05 (c), 68,03 (α -T2), 70,01 (b), 106,44 (l), 116,72 (r), 122,18 (o), 122,93 (a), 134,37 (j), 144,12 (m), 153,62 (p), 163,57 (k), 171,60 (n), 173,47 (T-NH);

MS m/z obliczone dla $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{NO}_8$ 435,1792; znalezione 436,1132 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

$R_f = 0,5$ (układ A);

Czystość HPLC 99,72%.

1.2.1.4. Synteza estru metylowego *N*-mykofenoilo-*L*-argininy **203**

Związek **203** otrzymałam za pomocą procedury EDCI/DMAP z wydajnością 70,5%.

Charakterystyka związku **203**:

MPA-L-Arg(NO₂)OMe (203): ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 - d_1) δ ppm: 1,582 (m, 3H, γ -R4, β -R3b), 1,769 (s, 3H, f), 1,836 (m, 1H, β -R3a), 2,103 (s, 3H, e), 2,218 (m, 2H, g), 2,345 (m, 2H, h), 3,231 (m, 2H, δ -R5), 3,323 (d, $J=6,5$ Hz, 2H, d), 3,703 (s, 3H, c), 3,721 (s, 3H, OMe), 4,558 (m, 1H, α -R2), 5,163 (s, 2H, b), 5,209 (t, $J=6,4$ Hz, 1H, a), 8,641 (m, 1H, R-NH);

^{13}C NMR (CDCl_3 - d_1) δ ppm: 11,5 (e), 16,12 (f), 22,60 (d), 24,12 (β -3R), 30,60 (γ -R4), 34,70 (g), 34,99 (h), 40,35 (δ -R5), 50,68 (α -R2), 52,68 (OMe), 60,99 (c), 70,12 (b), 106,29 (l), 116,96 (r), 121,95 (o), 122,90 (a), 134,24 (j), 144,26 (m), 153,45 (p), 159,27 (k), 163,6 (n), 172,66 (R1), 172,92 (R-NH);

MS m/z obliczone dla $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_9$ 535,5521; znalezione 535,2348 M^+ ;

$R_f = 0,4$ (układ A);

Czystość HPLC 100%.

1.2.1.5. Synteza estru metylowego *N*-mykofenoilo-*D*-argininy **204**

Związek **204** otrzymałam za pomocą procedury EDCI/DMAP z wydajnością 66%.

Charakterystyka związku 204:

MPA-D-Arg(NO₂)-OMe (204): ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 1,469 (m, 3H, γ-R4, β-R3b) 1,650 (m, 1H, β-R3a), 1,718 (s, 3H, f), 2,059 (s, 3H, e), 2,108 (m, 2H, g), 2,144 (m, 2H, h), 3,101 (m, 2H, δ-R5), 3,269 (d, J=6,7 Hz, 2H, d), 3,587 (s, 3H, c), 3,673 (s, 3H, OMe), 4,160 (q, J=13,2 Hz, 1H, α-R2), 5,095 (t, J=6,6 Hz, 1H, a), 5,221 (s, 2H, b), 8,175 (d, J=7,5 Hz, 1H, R-NH);

¹³C NMR (CDCl₃-d₁) δ ppm: 11,5 (e), 16,12 (f), 22,60 (d), 24,12 (β-3R), 30,60 (γ-R4), 34,70 (g), 34,99 (h), 40,35 (δ-R5), 50,68 (α-R2), 52,68 (OMe), 60,99 (c), 70,12 (b), 106,29 (l), 116,96 (r), 121,95 (o), 122,90 (a), 134,24 (j), 144,26 (m), 153,45 (p), 159,27 (k), 163,6 (n), 172,66 (R1), 172,92 (R-NH);

MS *m/z* obliczone dla C₂₄H₃₃N₅O₉ 535,5541; znalezione 535,4514 M⁺;

R_f = 0,46 (układ A);

Czystość HPLC 100%.

1.2.2. T3P/TEA

Chlorowodorek estru metylowego odpowiedniego aminokwasu (0,342 mmola), MPA (0,313 mmola) i TEA (1,563 mmola) rozpuściłam w 2 ml bezwodnego DMF. Następnie roztwór ochłodziłam do 0°C, po czym dodałam roztwór (0,625 mmola) T3P w 50% DMF. Całość mieszałam w atmosferze gazu obojętnego (azotu) w temp. 0°C przez 2 godz., a następnie w temp. pokojowej przez 48 h. Postęp reakcji kontrolowałam za pomocą TLC w układzie A i B. Po zakończeniu syntezy rozpuszczalnik oddestylowałam pod zmniejszonym ciśnieniem, za pomocą pompy próżniowej. Produkt oczyściłam używając preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej.

1.2.2.1. Synteza estru metylowego N-mykofenoilo-L-izoleucyny 202

Związek **202** otrzymałam za pomocą procedury T3P/TEA z wydajnością 68%.

Charakterystyka związku 202:

MPA-L-Ile-OMe (202): ¹H NMR (DMSO-d₆) δ ppm: ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 0,761 (m, 6H, δ-I5, ε-I6) 1,084 (m, 1H, γ-I4b), 1,301 (m, 1H, γ-I4a), 1,659 (m, 1H, β-I3), 1,718 (s, 3H, f), 2,066 (s, 3H, e), 2,1 (m, 2H, g), 2,189 (m, 2H, h), 3,268 (d, J=7,4 Hz, 2H, d), 3,583 (s, 3H, c), 3,676 (s, 3H, OMe), 4,134 (dd, J=7,8 Hz, J=6,8 Hz, 1H, α-I2), 5,063 (t, J=6,6 Hz, 1H, a), 5,231 (s, 2H, b), 8,062 (d, J=8,1 Hz, 1H, I-NH);

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 11,49 (e), 11,50 (δ-I5), 15,83 (ε-I6), 16,49 (f), 22,84 (d), 25,21 (γ-I4), 34,111 (β-I3), 35,36 (g), 36,71(h), 51,95 (OMe), 56,60 (α-I2), 61,06 (c), 69,05 (b), 107,39 (l), 116,39 (r), 122,89 (o), 122,91 (a), 134,41 (j), 146,21 (m), 153,17 (p), 163,02 (k), 170,59 (n), 172,49 (l1), 172,66 (I-NH);

MS *m/z* obliczone dla C₂₄H₃₃NO₇ 447,2257; znalezione 448,2390 [M+H]⁺;

$R_f = 0,46$ (układ B);

Czystość HPLC 98,37%.

1.2.2.2. Synteza estru metylowego *N*-mykofenoiloaminomalonianu **205**

Związek **205** otrzymałam za pomocą procedury T3P/TEA z wydajnością 45%.

Charakterystyka związku **205**:

MPA-Mal-(OMe)₂ (205): ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃-d₁) δ ppm: 1,81 (s, 3H, f), 2,15 (s, 3H, e), 2,31 - 2,40 (m, 4H, g, h), 3,39-3,40 (d, 2H, J = 6,8 Hz, d), 3,77 (s, 3H, c), 3,81 (s, 6H, OMe), 5,20 (s, 2H, b), 5,22-5,28 (m, 1H, a), 6,46 - 6,48 (d, 1H, J = 6,8 Hz, α-M2), 7,67 (m, 1H, M-NH);

¹³C NMR (CDCl₃-d₁) δ ppm: 11,8 (e), 16,4 (f), 22,8 (d), 34,8 (g), 35,0 (h), 53,7 (OMe), 56,2 (OMe), 61,3 (c), 70,3 (b), 106,6 (l), 117,0 (r), 122,3 (o), 123,2 (a), 134,4 (j), 144,3 (m), 153,9 (p), 163,9 (k), 167,0 (α-M2), 172,6 (n), 173,1 (M-NH);

MS *m/z* obliczone dla C₂₂H₂₈NO₉ 450,1764; znalezione 450,1801 [M+H]⁺;

$R_f = 0,6$ (układ B);

Czystość HPLC 99,5%.

1.3. Synteza aminokwasowych analogów kwasu mykofenolowego z wolną grupą karboksylową

Ester metylowy odpowiedniego aminokwasu (0,18 mmol) rozpuszczałam w 1,8 ml metanolu. Następnie dodawałam (0,54 mmola) monohydratu wodorotlenku litu rozpuszczonego w 1,18 ml wody. Całość mieszałam na mieszadle magnetycznym przez 24h w temp. pokojowej. Postęp reakcji monitorowałam za pomocą chromatografii TLC (eleunt A, B, C) Kolejno roztwór zakwaszałam 2N HCl i ekstrahowałam octanem etylu (EtOAc). Ekstrakt suszyłam z wykorzystaniem MgSO₄, rozpuszczalnik oddestylowywałam a związek oczyszczałam za pomocą preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej.

1.3.1. Synteza *N*-mykofenoilo-*L*-asparaginy **206**

Związek **206** otrzymałam z wydajnością 87%.

Charakterystyka związku **206**:

MPA-L-Asp(OH)-OH (206): ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 1,71 (s, 3H, f), 2,06 (s, 3H, e), 2,12 (m, 4H, g, h), 2,49 (m, 1H, β-D3b), 2,63 (dd, J=15,7 Hz, J=6,3 Hz, 1H, β-D3a), 3,27 (d, J=6,6 Hz, 2H, d), 3,67 (s, 3H, c), 4,35 (dd, J=14,1 Hz, J=7,0 Hz, 1H, α-D2), 5,07 (t, J=6,5 Hz, 1H, a), 5,21 (s, 2H, b), 7,94 (d, J=7,7 Hz, 1H, D-NH), 9,42 (s, 1H, COOH);

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ ppm: 11,48 (e), 16,44 (f), 22,97 (d), 34,43 (g), 35,39 (h), 36,86 (β -D3), 50,01 (α -D2), 61,03 (c), 68,97 (b), 107,47(l), 115,72 (r), 122,97 (o), 133,96 (j), 146,27 (m), 161,06 (k), 170,88 (n), 171,49 (D1), 171,89 (D4), 173,36 (D-NH);

MS m/z obliczone dla $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{NO}_9$ 435,4744; znalezione 436,1632 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

$R_f = 0$ we wszystkich sprawdzanych eleuntach;

Czystość HPLC 99,49%.

1.3.2. Synteza *N*-mykofenoilo-*L*-treoniny **207**

Związek **207** otrzymałam z wydajnością 88%.

Charakterystyka związku **207**:

MPA-L-Thr-OH (207): ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 0,97 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H, γ -T4), 1,74 (s, 3H, f), 2,08 (s, 3H, e), 2,16 (m, 2H, g), 2,25 (m, 2H, h), 3,29 (d, $J = 6,7$ Hz, 2H, d), 3,69 (s, 3H, c), 3,99 (m, 1H, β -T3), 4,08 (dd, $J = 8,2$ Hz, $J = 3,5$ Hz, 1H, α -T2), 5,12 (t, $J = 6,4$ Hz, 1H, a), 5,23 (s, 2H, b), 7,66 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, T-NH), 7,95 (s, 1H, COOH);

^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 11,49 (e), 16,45 (f), 20,39 (γ -T4), 21,60 (d), 34,49 (g), 35,50 (h), 55,36 (β -T3), 61,06 (c), 66,32 (α -T2), 69,04 (b), 107,41 (l), 116,03 (r), 122,97 (o), 134,34 (j), 146,21 (m), 162,71 (k), 170,81 (n), 172,52 (T-NH);

MS m/z obliczone dla $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{NO}_8$ 421,4432; znalezione 422,1812 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

$R_f = 0,39$ (układ C);

Czystość HPLC 98,65%.

1.3.3. Synteza *N*-mykofenoilo-*D*-treoniny **208**

Związek **208** otrzymałam z wydajnością 86%.

Charakterystyka związku **208**:

MPA-D-ThrOH (206): ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 0,926 (d, $J=8,6$ Hz, 3H, γ -T4), 1,721 (s, 3H, f), 2,058 (s, 3H, e), 2,107 (m, 2H, g), 2,168 (m, 2H, h), 3,263 (d, $J=6,7$ Hz, 2H, d), 3,671 (s, 3H, c), 3,936 (m, 1H, β -T3), 4,029 (m, 1H, α -T2), 5,087 (t, $J=6,5$ Hz, 1H, a), 5,219 (s, 2H, b), 7,561 (d, $J=8$ Hz, 1H, T-NH) 7,96 (s, 1H, COOH);

^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 11,49 (e), 16,45 (f), 20,39 (γ -T4), 21,60 (d), 34,49 (g), 35,50 (h), 55,36 (β -T3), 61,06 (c), 66,32 (α -T2), 69,04 (b), 107,41 (l), 116,03 (r), 122,97 (o), 134,34 (j), 146,21 (m), 162,71 (k), 170,81 (n), 172,52 (T-NH);

MS m/z obliczone dla $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{NO}_8$ 421,4432; znalezione 422,5721 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

$R_f = 0,46$ (układ C);

Czystość HPLC 99,02%.

1.3.4. Synteza *N*-mykofenoilo-*L*-izoleucyny **209**

Związek **209** otrzymałam z wydajnością 80%.

Charakterystyka związku **209**:

MPA-Ile-OH (209): ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 0,771 (d, $J=7,3$ Hz, 3H, δ -I5), 0,793 (t, $J=7,5$ Hz, 3H, ϵ -I6) 1,071 (m, 2H, γ -I4), 1,658 (m, 1H, β -I3), 1,717 (s, 3H, f), 2,053 (s, 3H, e), 2,053 (m, 2H, g), 2,092 (m, 2H, h), 3,259 (d, $J=6,7$ Hz, 2H, d), 3,665 (s, 3H, c), 4,051 (m, 1H, α -I2), 5,067 (t, $J=6,5$ Hz, 1H, a), 5,214 (s, 2H, b), 7,810 (d, $J=8,5$ Hz, 1H, I-NH) 8,38 (s, 1H, COOH);

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ ppm: 11,49 (e), 11,76 (δ -I5), 16,04 (ϵ -I6), 16,49 (f), 22,92 (d), 25,15 (γ -I4), 34,29 (β -I3), 35,52 (g), 36,83 (h), 57,07 (α -I2), 61,02 (c), 68,98 (b), 107,39 (l), 115,791 (r), 122,96 (o), 123,27 (a), 134,18 (j), 146,20 (m), 154,061 (p), 163,06 (k), 170,858 (n), 172,216 (II), 174,116 (I-NH);

MS m/z obliczone dla $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{NO}_7$ 433,4924; znalezione 432,1996 M^+ ;

$R_f = 0,674$ (układ C);

Czystość HPLC 100%.

1.3.5. Synteza *N*-mykofenoilo-*L*-argininy **210**

Związek **210** otrzymałam z wydajnością 87%.

Charakterystyka związku **210**:

MPA-L-Arg(NO₂)OH (210): ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 1,53 (m, 3H, γ -R4, β -R3) 1,68 (m, 1H, β -R3), 1,73 (s, 3H, c), 2,07 (s, 3H, e), 2,14 (m, 2H, g), 2,18 (m, 2H, h), 3,13 (m, 2H, d-R5), 3,28 (d, $J = 6,7$ Hz, 2H, d), 3,68 (s, 3H, c), 4,06 (m, 1H, α -R2), 5,11 (t, $J = 6,3$ Hz, 1H, a), 5,23 (s, 2H, b), 7,86 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H, R-NH), 8,52 (s, 1H, COOH);

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ ppm: 11,48 (e), 16,46 (f), 21,65 (d), 22,96 (b-R3), 29,23 (g-R4), 34,53 (g), 35,51 (h), 40,57 (d-R5), 52,71 (a-R2), 61,03 (c), 69,00 (b), 107,41 (l), 122,97 (o), 123,42 (a), 134,17 (j), 146,22 (m), 159,74 (k), 163,09 (n), 172,08 (R1), 172,59 (R-NH);

MS m/z obliczone dla $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_9$ 521,5224; znalezione 522,3923 $[\text{M}+\text{H}]^+$;

$R_f = 0,22$ (układ C);

Czystość HPLC 100%.

1.3.6. Synteza *N*-mykofenoilo-*D*-argininy **211**

Związek **211** otrzymałam z wydajnością 89%.

Charakterystyka związku 211:

MPA-D-Arg(NO₂)OH (211): ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 1,476 (m, 3H, γ-R4, β-R3b) 1,618 (m, 1H, β-R3a), 1,715 (s, 3H, f), 2,043 (s, 3H, e), 2,104 (m, 2H, g), 2,147 (m, 2H, h), 3,115 (m, 2H, δ-R5), 3,249 (d, J=6,3 Hz, 2H, d), 3,657 (s, 3H, c), 3,956 (q, J=13 Hz, 1H, α-R2), 5,061 (t, J=6,4 Hz, 1H, a), 5,199 (s, 2H, b), 8,205 (d, J=8,17 Hz, 1H, R-NH), 8,54 (s, 1H, COOH);

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 11,48 (e), 16,46 (f), 21,65 (d), 22,96 (b-R3), 29,23 (g-R4), 34,53 (g), 35,51 (h), 40,57 (d-R5), 52,71 (a-R2), 61,03 (c), 69,00 (b), 107,41 (l), 122,97 (o), 123,42 (a), 134,17 (j), 146,22 (m), 159,74 (k), 163,09 (n), 172,08 (R1), 172,59 (R-NH);

MS *m/z* obliczone dla C₂₃H₃₁N₅O₉ 521,5224; znalezione 522,3921[M+H]⁺;

R_f = 0,195 (układ C);

Czystość HPLC 99,06%.

1.4. Synteza peptydów

1.4.1. Synteza pochodnych tuftsyny

Peptydy: tuftsynę oraz jej pochodne otrzymałam za pomocą metody mieszanych bezwodników.

1.4.1.1. *Tetrapeptyd Boc-Thr-Lys(Fmoc)-Pro-Arg(NO₂)-OMe*

Dipeptyd Boc-Pro-Arg(NO₂)-OMe

3,18 g (14,77 mmola) Boc-Pro-OH rozpuściłam w 5 ml bezwodnego DMF, ochłodziłam do -15°C, a następnie dodałam 1,5 ml (14,77 mmola) NMM oraz 2 ml (14,77 mmola) chloromrówczanu izobutyli. Po 5 minutach dodałam ochłodzony roztwór HClxArg(NO₂)-OMe (3,98 g, 14,77 mmola) wcześniej rozpuszczony w 5 ml bezwodnego metanolu z dodatkiem 1,6 ml (15,8 mmola) NMM. Całość mieszałam magnetycznie z zabezpieczeniem przed dostępem wilgoci w -15°C przez 4 godz. a później w temperaturze pokojowej do dnia następnego. Reakcję kontrolowałam za pomocą TLC w układzie G używając jako wywoływacza roztworu ninhydryny. Po oddestylowaniu DMF pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymany produkt rozpuściłam w octanie etylu oraz przemywałam: 5% HCl (x2), H₂O (x2), nasyc. NaHCO₃ (x2), H₂O i nasyc. NaCl oraz suszyłam wykorzystując MgSO₄. Środek suszący odsączyłam a rozpuszczalnik oddestylowałam przy użyciu wyparki rotacyjnej.

Związek **214** otrzymałam z wydajnością 78% w postaci oleju.

Tripeptyd Boc-Lys(Fmoc)-Pro-Arg(NO₂)-OMe

2,08 g (4,45 mmola), Boc-Lys(Fmoc)-OH rozpuściłam w 4 ml bezwodnego DMF, ochłodziłam do -15°C, a następnie dodałam 0,45 ml (4,45 mmola) NMM oraz 0,6 ml (4,45 mmola) chloromrówczanu izobutyli. Po 5 minutach dodałam ochłodzony roztwór 2 g (4,45 mmola) TFAxPro-Arg(NO₂)-OCH₃ z 0,45 ml (4,45 mmola) TEA w 4 ml



bezwodnego DMF. Całość mieszałam magnetycznie z zabezpieczeniem przed dostępem wilgoci w -15°C przez 4 godz. a następnie w temperaturze pokojowej do dnia następnego. Reakcję kontrolowałam za pomocą TLC w układzie G używając jako wywoływacza roztworu ninhydryny. Po oddestylowaniu DMF pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymany produkt rozpuściłam w octanie etylu oraz przemywałam: 5% HCl (x2), H_2O (x2), nasyc. NaHCO_3 (x2), H_2O i nasyc. NaCl oraz suszyłam wykorzystując MgSO_4 . Środek suszący odsączyłam, a rozpuszczalnik oddestylowałam przy użyciu wyparki rotacyjnej.

Związek **217** Otrzymałam z wydajnością 67% w postaci szklistej piany.

Tetrapeptyd Boc-Thr-Lys(Fmoc)-Pro-Arg(NO_2)-OMe

0,6 g Boc-Thr-OH (2,74 mmola) rozpuściłam w 2 ml bezwodnego DMF, ochłodzono do -15°C a następnie dodano 0,28 ml (2,74 mmola) NMM oraz 0,37 ml (2,74 mmola) chloromrówczanu izobutylu. Po 5 minutach dodałam ochłodzony roztwór 2,18 g (2,74 mmola) TFAXLys(Fmoc)-Pro-Arg(NO_2)- OCH_3 z 0,28 ml (2,74 mmola) TEA w 4 ml bezwodnego DMF. Całość mieszałam magnetycznie z zabezpieczeniem przed dostępem wilgoci w -15°C przez 4 godz. a następnie w temperaturze pokojowej do dnia następnego. Reakcję kontrolowałam za pomocą TLC w układzie G używając jako wywoływacza roztworu ninhydryny. Po oddestylowaniu DMF pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymany produkt rozpuściłam w octanie etylu oraz przemywałam: 5% HCl (x2), H_2O (x2), nasyc. NaHCO_3 (x2), H_2O i nasyc. NaCl oraz suszyłam wykorzystując MgSO_4 . Środek suszący odsączyłam a rozpuszczalnik oddestylowałam przy użyciu wyparki rotacyjnej. Tetrapeptyd oczyszczałam dodatkowo na kolumnie chromatograficznej stosując układy D, E, F i G.

Związek **220** Otrzymałam z wydajnością 57% w postaci szklistej piany.

Charakterystyka związku 220:

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 1,12 (d, $J=6,4$ Hz, 3H, γ -T4), 1,37 (m, 2H, γ -K4), 1,408 (m, 11H, CCH_3 , δ -K5), 1,46 (m, 1H, β -K3), 1,51 (m, 2H, γ -R4), 1,62 (m, 1H, β -R3), 1,74 (m, 2H, β -R3, β -K3), 1,97 (m, 1H, γ -P4), 2,04 (m, 1H, β -P3), 2,13 (m, 1H, γ -P4), 2,20 (m, 1H, β -P3), 3,12 (m, 2H, ϵ -K6), 3,23 (m, 2H, δ -R5), 3,62 (m, 1H, δ -P5), 3,66 (s, 3H, OCH_3), 3,71 (m, 1H, δ -P5), 3,86 (m, 1H, β -T3), 4,21 (t, $J=7,2$ Hz, 1H, Fmoc-**CH**), 4,26 (m, 1H, α -R2), 4,31 (m, 1H, α -P2), 4,39 (m, 3H, Fmoc-**CH**₂, α -K2), 4,67 (m, 2H, T-OH, α -T2), 5,73 (m, 1H, α -TNH), 7,05 (m, 1H, α -RNH), 7,30 (m, 2H, Ph-**H**), 7,38 (t, $J=7,5$ Hz, 2H, Ph-**H**), 7,61 (d, $J=7,5$ Hz, 2H, Ph-**H**), 7,75 (d, $J=7,5$ Hz, 2H, Ph-**H**), 7,85 (m, 2H, NH, α -KNH), 8,44 (m, 1H, δ -RNH);

MS m/z obliczone dla $\text{C}_{42}\text{H}_{59}\text{N}_9\text{O}_{12}$ 881,97; znalezione 882,44 $[\text{M}+\text{H}]^+$ i 904,44 $[\text{M}+\text{Na}]^+$;

temp. top. 119-124 $^{\circ}\text{C}$;

R_f = 0,65 (układ G).

1.4.1.2. Deprotekcja osłony Boc

Di-, tri- i terapeptyd rozpuszczałam w 10 ml kwasu trifluoroctowego (TFA) i pozostawiałam na godzinę, co jakiś czas mieszając. Zdjęcie osłony kontrolowałam za pomocą TLC w układzie G. Następnie kwas trifluoroctowy oddestylowałam przy użyciu wyparki rotacyjnej, a otrzymany olej zalałam (dwukrotnie) eterem dietylowym i wytrząsałam. Eter zdekantowałam i otrzymałam produkty w postaci sypkiego białego proszku.

Charakterystyka związku TFAxThr-Lys(Fmoc)-Pro-Arg(NO₂)-OCH₃:

temp. top. 165-169°C;

R_f = 0,67 (układ H).

1.4.1.3. Deprotekcja osłony Fmoc

Peptydy rozpuszczałam w 1 ml chloroformu i dodawałam 0,2-0,3 ml dietyloaminy. Roztwór pozostawiałam na noc. Usunięcie osłony kontrolowałam za pomocą TLC w układzie G. Następnie dietyloaminę i chloroform oddestylowałam przy użyciu wyparki rotacyjnej, a otrzymany olej zalałam eterem dietylowym i wytrząsałam. Eter zdekantowałam i otrzymując produkt.

Charakterystyka związku Boc-Thr-Lys-Pro-Arg(NO₂)-OCH₃:

MS *m/z* obliczone dla C₂₇H₄₉N₉O₁₀ 659,7341; znalezione 660,3886 M⁺.

1.4.2. *Pentapeptydy pochodne tuftsyny*

Do syntezy penatpeptydowych analogów tuftsyny sprawdziłam dwie metody: mieszanych bezwodników oraz odczynnik kondensujący EDCI.

1.4.2.1. *Metoda mieszanych bezwodników*

0,8 mmola Fmoc-Gly-OH rozpuściłam w 2 ml DMF, ochłodziłam do -15°C a następnie dodałam 0,08 mmola NMM oraz 0,08 mmola chloromrówczanu izobutyli. Po 5 minutach dodałam ochłodzony roztwór 0,08 mmola Boc-Thr-Lys-Pro-Arg(NO₂)-OCH₃ w 1 ml DMF. Całość mieszałam na mieszadle magnetycznym w kolbie kulistej zaopatrzonej w rurkę z CaCl₂ w -15°C przez 4 godz., a następnie w temperaturze pokojowej do dnia następnego. Reakcję kontrolowałam za pomocą TLC w układzie G używając jako wywoływacza roztworu ninhydryny. Po oddestylowaniu DMF pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymany produkt rozpuściłam w octanie etylu oraz przemywałam: 5% HCl (x2), H₂O (x2), nasyc. NaHCO₃ (x2), H₂O i nasyc. NaCl oraz suszyłam wykorzystując MgSO₄. Środek suszący odsączyłam a rozpuszczalnik oddestylowałam przy użyciu wyparki rotacyjnej.

Związek **237** otrzymałam z 65% wydajnością.

1.4.2.2. *Procedura z wykorzystaniem EDCI*

0,5 mmola związku Boc-Thr-Lys-Pro-Arg(NO₂)-OCH₃, 0,5 mmola Fmoc-Gly-OH i 0,5 mmola DMAP rozpuściłam w 2 ml bezwodnego DMF. Następnie roztwór

ochłodziłam do 0°C, po czym dodałam 0,5 mmola EDCI. Całość mieszałam w atmosferze gazu obojętnego (azotu) w temp. 0°C przez 2 godz. a następnie w temp. pokojowej przez 48 godz.

Reakcję kontrolowałam za pomocą TLC w układzie G używając jako wywoływacza roztworu ninhydryny. DMF oddestylowałam używając pompy próżniowej a związek oczyszczałam za pomocą preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej (PTLC) w układzie F i G.

Związek **237** otrzymałam z 48% wydajnością.

1.4.2.3. Pentapeptydy

Wszystkie pentapeptydy pochodne tuftsyny otrzymałam metodą mieszanych bezwodników zgodnie z procedura opisaną w punkcie 1.4.2.1.

Pentapeptyd Boc-Thr-Lys(FmocGly)-Pro-Arg(NO₂)-OMe **237**

Związek **237** otrzymałam z 65% wydajnością w postaci sypkiego białego proszku.

MS *m/z* obliczone dla C₄₄H₆₂N₁₀O₁₃ 939,02; znalezione 939,4625 M⁺ i 961,4431 [M+Na]⁺;

temp. top. 93-97°C;

R_f = 0,293 (układ G).

Pentapeptyd Boc-Thr-Lys(Fmoc-αAla)-Pro-Arg(NO₂)-OMe **238**

Związek **238** otrzymałam z 58% wydajnością.

MS *m/z* obliczone dla C₄₅H₆₄N₁₀O₁₃ 953,0571; znalezione 953,4732 M⁺ i 975,3816 [M+Na]⁺;

R_f = 0,359 (układ G).

Pentapeptyd Boc-Thr-Lys(Fmoc-βAla)-Pro-Arg(NO₂)-OMe **239**

Związek **239** otrzymałam z 63% wydajnością w postaci sypkiego białego proszku.

MS *m/z* obliczone dla C₄₅H₆₄N₁₀O₁₃ 953,0531; znalezione 953,4719 M⁺ i 975,4552 [M+Na]⁺;

temp. top. 99-103°C;

R_f = 0,326 (układ G).

Pentapeptyd Boc-Thr-Lys(FmocVal)-Pro-Arg(NO₂)-OMe **240**

Związek **240** otrzymałam z 53% wydajnością w postaci białego sypkiego proszku.

MS *m/z* obliczone dla C₄₇H₆₈N₁₀O₁₃ 981,1071; znalezione 981,5930 M⁺;

temp. top. 123-127°C;

R_f = 0,359 (układ G).

Pentapeptyd Boc-Thr-Lys(FmocLeu)-Pro-Arg(NO₂)-OMe **241**

Związek **241** otrzymałam z 41% wydajnością.

MS *m/z* obliczone dla C₄₉H₇₂N₁₀O₁₃ 1009,1631; znalezione 1009,3884 M⁺;

R_f = 0,523 (układ G).

Pentapeptyd Boc-Thr-Lys(FmocIle)-Pro-Arg(NO₂)-OMe **242**

Związek **242** otrzymałam z 45% wydajnością.

MS *m/z* obliczone dla C₄₉H₇₂N₁₀O₁₃ 1009,1675; znalezione 1009,4396 M⁺

R_f = 0,5 (układ G).

1.4.3. Synteza pochodnych retro-tuftsyny

Peptydy: retro-tuftsynę oraz jej pochodne otrzymałam również za pomocą metody mieszanych bezwodników.

Tetrapeptyd Boc- Arg(NO₂)-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OMe

Dipeptyd Boc- Lys(Fmoc)-Thr-OMe **223**

2,44 g (5,2 mmola) Boc-Lys(Fmoc)-OH rozpuściłam w 10 ml bezwodnego DMF, ochłodziłam do -15°C, a następnie dodałam 0,53 ml (5,2 mmola) NMM oraz 0,71 ml (5,2 mmola) chloromrówczanu izobutyli. Po 5 minutach dodałam ochłodzony roztwór HClxThr-OMe 0,88 g (5,2 mmola) wcześniej rozpuszczony w 4 ml bezwodnego DMF z dodatkiem 0,53 ml (5,2 mmola) TEA. Całość mieszałam magnetycznie z zabezpieczeniem przed dostępem wilgoci w -15°C przez 4 godz. a później w temperaturze pokojowej do dnia następnego. Reakcję kontrolowałam za pomocą TLC w układzie G używając jako wywoływacza roztworu ninhydryny. Po oddestylowaniu DMF pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymany produkt rozpuściłam w octanie etylu oraz przemywałam: H₂O (x2), 5% HCl, 10% KHSO₄ (x2), H₂O, 0,5 N KHCO₃ (x2), H₂O i nasyc. NaCl oraz suszyłam wykorzystując MgSO₄. Środek suszący odsączyłam a rozpuszczalnik oddestylowałam przy użyciu wyparki rotacyjnej.

Związek **223** otrzymałam z 83% wydajnością w postaci szklistej piany.

Tripeptyd Boc-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OMe **226**

1,03 g (4,78 mmola) Boc-Pro-OH rozpuściłam w 10 ml bezwodnego DMF, ochłodziłam do -15°C, a następnie dodałam 0,48 ml (4,78 mmola) NMM oraz 0,65 ml (4,78 mmola) chloromrówczanu izobutyli. Po 5 minutach dodałam ochłodzony roztwór TFAxLys(Fmoc)-Thr-OMe 2,87 g (4,78 mmola) wcześniej rozpuszczony w 4 ml bezwodnego DMF z dodatkiem 0,48 ml (4,78 mmola) TEA. Całość mieszałam



magnetycznie z zabezpieczeniem przed dostępem wilgoci w -15°C przez 4 godz. a później w temperaturze pokojowej do dnia następnego. Reakcję kontrolowałam za pomocą TLC w układzie G używając jako wywoływacza roztworu ninhydryny. Po oddestylowaniu DMF pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymany produkt rozpuściłam w octanie etylu oraz przemywałam: H_2O (x2), 5% HCl, 10% KHSO_4 (x2), H_2O , 0,5 N KHCO_3 (x2), H_2O i nasyc. NaCl oraz suszyłam wykorzystując MgSO_4 . Środek suszący odsączyłam a rozpuszczalnik oddestylowałam przy użyciu wyparki rotacyjnej.

Związek **226** otrzymałam z 76% wydajnością w postaci szklistej piany.

Tetrapeptyd Boc-Arg(NO_2)-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OMe **229**

0,85 g (3,93 mmola) Boc-Arg(NO_2)-OH rozpuściłam w 10 ml bezwodnego DMF, ochłodziłam do -15°C , a następnie dodałam 0,4 ml (3,93 mmola) NMM oraz 0,54 ml (3,93 mmola) chloromrówczanu izobutyli. Po 5 minutach dodałam ochłodzony roztwór TFA×Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OMe 2,86 g (3,93 mmola) wcześniej rozpuszczony w 4 ml bezwodnego DMF z dodatkiem 0,44 ml (3,93 mmola) TEA. Całość mieszałam magnetycznie z zabezpieczeniem przed dostępem wilgoci w -15°C przez 4 godz. a później w temperaturze pokojowej do dnia następnego. Reakcję kontrolowałam za pomocą TLC w układzie G używając jako wywoływacza roztworu ninhydryny. Po oddestylowaniu DMF pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymany produkt rozpuściłam w octanie etylu oraz przemywałam: H_2O (x2), 5% HCl, 10% KHSO_4 (x2), H_2O , 0,5 N KHCO_3 (x2), H_2O i nasyc. NaCl oraz suszyłam wykorzystując MgSO_4 . Środek suszący odsączyłam a rozpuszczalnik oddestylowałam przy użyciu wyparki rotacyjnej.

Związek **229** otrzymałam z 65% wydajnością w postaci szklistej piany.

Charakterystyka związku Boc-Arg(NO_2)-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OMe **229**

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 1,24 (m, 5H, γ -T4, γ -K4), 1,33 (m, 11H, CCH_3 , δ -K5), 1,43 (m, 4H, β -R2, β -K3, γ -R4), 1,71 (m, 2H, β -R3, β -K3), 1,92 (m, 2H, β -P3, γ -P4), 2,07 (m, 1H, γ -P4), 2,22 (m, 1H, β -P3), 3,08 (m, 2H, ϵ -K6), 3,22 (m, 2H, δ -R5), 3,59 (m, 1H, δ -P5), 3,72 (s, 3H, OCH_3), 3,74 (m, 1H, δ -P5), 4,21 (m, 2H, β -T3, Fmoc-CH), 4,33 (m, 1H, α -R2), 4,41 (m, 1H, α -T2), 4,49 (m, 3H, Fmoc- CH_2 , α -K2), 4,62 (m, 1H, α -P2), 5,56 (m, 1H, T-OH), 5,91 (m, 1Hm R- α NH), 6,98 (m, 1H, T- α NH), 7,28 (m, 2H, Ph-H), 7,38 (t, $J=7,4$ Hz, 2H, Ph-H), 7,58 (d, $J=7,4$ Hz, 2H, Ph-H), 7,75 (d, $J=7,4$ Hz, 2H, Ph-H), 7,76 (m, 2H, α -KNH, ϵ -KNH), 8,73 (m, 1H, δ -RNH);

MS m/z obliczone dla $\text{C}_{42}\text{H}_{59}\text{N}_9\text{O}_{12}$ 881,9716; znalezione 882,4431 $[\text{M}+\text{H}]^+$ i 904,4852 $[\text{M}+\text{Na}]^+$;

temp. top. 106-110 $^{\circ}\text{C}$;

R_f = 0,62 (układ G).

1.4.3.2. Deprotekcja osłony Boc

Oslonę Boc usuwałam zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 1.4.1.2.

Charakterystyka związku TFAxArg(NO₂)-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OCH₃:

temp. top. 162-166°C;

R_f = 0,47 (układ H).

1.4.3.3. Deprotekcja osłony Fmoc

Oslonę Fmoc usunęłam zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 1.4.1.3.

Charakterystyka związku Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys-Thr-OCH₃:

MS *m/z* obliczone dla C₂₇H₄₉N₉O₁₀ 659,73; znalezione 660,43 M⁺.

1.4.4. Pentapeptydy pochodne retro-tuftsyny

Do syntezy penatpeptydowych analogów retro-tuftsyny sprawdziłam trzy metody: mieszanych bezwodników, odczynnik kondensujący EDCI oraz EEDQ.

1.4.4.1. Metoda mieszanych bezwodników

0,025 g (0,08 mmola) Fmoc-βAla-OH rozpuściłam w 1 ml DMF, ochłodziłam do -15°C, a następnie dodałam 0,008 ml (0,08 mmola) NMM oraz 0,011 ml (0,08 mmola) chloromrówczanu izobutyli. Po 5 minutach dodałam ochłodzony roztwór 0,053 g (0,08 mmola) Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys-Thr-OCH₃ w 0,3 ml DMF. Całość mieszałam na mieszadle magnetycznym w kolbie kulistej zaopatrzonej w rurkę z CaCl₂ w -15°C przez 4 godz. a następnie w temperaturze pokojowej do dnia następnego.

Reakcję kontrolowałam za pomocą TLC w układzie G używając jako wywoływacza roztworu ninhydryny. Po oddestylowaniu DMF pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymany produkt rozpuściłam w octanie etylu oraz przemywałam: 5% HCl (x2), H₂O (x2), nasyc. NaHCO₃ (x2), H₂O i nasyc. NaCl oraz suszyłam wykorzystując MgSO₄. Środek suszący odsączyłam a rozpuszczalnik oddestylowałam oddestylowałam przy użyciu wyparki rotacyjnej.

Związek **252** otrzymałam z 51% wydajnością.

1.4.4.2. Procedura z wykorzystaniem EDCI

Pochodną Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys-Thr-OCH₃ 0,033 g (0,05 mmola), Fmoc-βAla-OH 0,016 g (0,05 mmola) i DMAP 0,078 g (0,05 mmola) rozpuściłam w 1 ml bezwodnego DMF. Następnie roztwór ochłodziłam do 0°C, po czym dodałam 0,0061 g (0,05 mmola) EDCI. Całość mieszałam w atmosferze gazu obojętnego (azotu) w temp. 0°C przez 2 godz. a następnie w temp. pokojowej przez 48 godz. Reakcję kontrolowałam za pomocą TLC w układzie G używając jako wywoływacza roztworu ninhydryny. DMF oddestylowałam używając pompy próżniowej a związek oczyszczałam za pomocą preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej (PTLC) w układzie F i G.

Związek **252** otrzymałam z 42% wydajnością.

1.4.4.3. Procedura z wykorzystaniem EEDQ

Pochodną Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys-Thr-OCH₃ 0,014 g (0,021 mmola), Fmoc-β-Ala-OH 0,0065 g (0,021 mmola) i Py 0,008 ml (0,105 mmola) rozpuściłam w 1 ml bezwodnego DMF. Następnie roztwór ochłodziłam do 0°C, po czym dodałam 0,026 g (0,105 mmola) EDDQ. Całość mieszałam w atmosferze gazu obojętnego (azotu) w temp. 0°C przez 2 godz. a następnie w temp. pokojowej przez 48 godz. Reakcję kontrolowałam za pomocą TLC w układzie G używając jako wywoływacza roztworu ninhydryny. DMF oddestylowałam używając pompy próżniowej, a związek oczyszczałam za pomocą preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej (PTLC) w układzie F i G.

Związek **252** otrzymałam z 35% wydajnością.

1.4.4.4. Pentapeptydy

Wszystkie pentapeptydy pochodne retro-tuftsyny otrzymałam metodą mieszanych bezwodników zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 1.4.4.1..

Penatpeptyd Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(FmocGly)-Thr-OCH₃ **250**:

Związek **250** otrzymałam z 56% wydajnością w postaci sypkiego białego proszku.

MS *m/z* obliczone dla C₄₄H₆₂N₁₀O₁₃ 939,0213; znalezione 939,4664 M⁺ i 961,4473 [M+Na]⁺;

temp. top. 93-97°C;

R_f = 0,293 (układ G).

Penatpeptyd Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(FmocαAla)-Thr-OCH₃ **251**:

Związek **251** otrzymałam z 53% wydajnością.

MS *m/z* obliczone dla C₄₅H₆₄N₁₀O₁₃ 953,0542; znalezione 953,4770 M⁺ i 975,3801 [M+Na]⁺;

R_f = 0,359 (układ G).

Penatpeptyd Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(Fmocβ-Ala)-Thr-OCH₃ **252**:

Związek **252** otrzymałam z 51% wydajnością w postaci sypkiego białego proszku.

MS *m/z* obliczone dla C₄₅H₆₄N₁₀O₁₃ 953,0547; znalezione 953,4735 M⁺;

temp. top. 99-103°C;

R_f = 0,326 (układ G).

Penatpeptyd Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(FmocVal)-Thr-OCH₃ **253**:

Związek **253** otrzymałam z 48% wydajnością w postaci sypkiego białego proszku.

MS m/z obliczone dla $C_{47}H_{68}N_{10}O_{13}$ 981,1026; znalezione 981,5821 M^+ ;

temp. top. 123-127°C;

R_f = 0,435 (układ G).

Penatpeptyd Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(FmocLeu)-Thr-OCH₃ **254**:

Związek **254** otrzymałam z 35% wydajnością.

MS m/z obliczone dla $C_{49}H_{72}N_{10}O_{13}$ 1009,1664; znalezione 1009,4303 M^+ ;

R_f = 0,457 (układ G).

Penatpeptyd Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(FmocIle)-Thr-OCH₃ **255**:

Związek **255** otrzymałam z 32% wydajnością.

MS m/z obliczone dla $C_{49}H_{72}N_{10}O_{13}$ 1009,1645; znalezione 1009,4374 M^+ ;

R_f = 0,522 (układ G).

1.5. Synteza peptydowych pochodnych MPA

1.5.1. Synteza peptydowych pochodnych MPA zawierających w swojej strukturze analogi tuftsyny

W celu wyselekcjonowania metody syntezy kwasu mykofenolowego z analogami tuftsyny sprawdziłam kilka metod tworzenia wiązania amidowego wykorzystując odczynniki kondensujące EDCI, EEDQ i T3P.

1.5.1.1 Procedura z wykorzystaniem EDCI/DMAP

Pochodną TFA×Thr-Lys(Fmoc)-Pro-Arg(NO₂)-OCH₃ 0,013 g (0,015 mmola), MPA 0,0034 g (0,011 mmola) i DMAP 0,018 g (0,015 mmola) rozpuściłam w 1 ml bezwodnego DMF. Następnie roztwór ochłodziłam do 0°C, po czym dodałam 0,0022 g (0,014 mmola) EDCI. Całość mieszałam w atmosferze gazu obojętnego (azotu) w temp. 0°C przez 2 godz. a następnie w temp. pokojowej przez 48 godz. Reakcję kontrolowałam za pomocą TLC w układzie G. DMF oddestylowałam używając pompy próżniowej a związek oczyszczałam za pomocą preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej (PTLC) w układzie G.

Związek **263** otrzymałam z 43% wydajnością.

1.5.1.2. Procedura z wykorzystaniem EEDQ

Pochodną TFA×Thr-Lys(Fmoc)-Pro-Arg(NO₂)-OCH₃ 0,010 g (0,011 mmola), MPA 0,0035 g (0,011 mmola) i TEA 0,0022 ml (0,022 mmola) rozpuściłam w 1 ml bezwodnego DMF. Następnie roztwór ochłodziłam do 0°C, po czym dodałam 0,0054 g

(0,022 mmola) EDDQ. Całość mieszałam w atmosferze gazu obojętnego (azotu) w temp. 0°C przez 2 godz. a następnie w temp. pokojowej przez 48 godz. Reakcję kontrolowałam za pomocą TLC w układzie G. DMF oddestylowałam używając pompy próżniowej a związek oczyszczałam za pomocą preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej (PTLC) w układzie G.

Związek **263** otrzymałam z 33% wydajnością.

1.5.1.3. Procedura z wykorzystaniem T3P

Pochodną TFA×Thr-Lys(Fmoc)-Pro-Arg(NO₂)-OCH₃ 0,025 g (0,0289 mmola), MPA 0,0068 g (0,0212 mmola) i TEA 0,0014 ml (0,0112 mmola) rozpuściłam w 1 ml bezwodnego DMF. Następnie roztwór ochłodziłam do 0°C, po czym dodałam 0,030 ml (0,052 mmola) T3P w 50% roztworze DMF Całość mieszałam w atmosferze gazu obojętnego (azotu) w temp. 0°C przez 2 godz. a następnie w temp. pokojowej przez 48 godz. Reakcję kontrolowałam za pomocą TLC w układzie G. DMF oddestylowałam używając pompy próżniowej a związek oczyszczałam za pomocą preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej (PTLC) w układzie G.

Związek **263** otrzymałam z 65% wydajnością.

1.5.1.4. Pochodne MPA i analogów tuftsyny 263-269

Związki **263-269** otrzymałam wykorzystując metodę T3P/TEA zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 1.5.1.3..

Charakterystyka związku MPA-Thr-Lys(Fmoc)-Pro-Arg(NO₂)-OMe **263**:

Związek **263** otrzymałam z 65% wydajnością w postaci sypkiego białego proszku.

MS *m/z* obliczone dla C₅₄H₆₉N₉O₁₅ 1084,1180; znalezione 1084,4991 [M+H]⁺ i 1106,4817 [M+Na]⁺;

temp. top. 133-138°C;

R_f = 0,512 (układ G).

Charakterystyka związku MPA-Thr-Lys(FmocGly)-Pro-Arg(NO₂)-OMe **264**:

Związek **264** otrzymałam z 48% wydajnością.

MS *m/z* obliczone dla C₅₆H₇₂N₁₀O₁₆ 1141,2364; znalezione 1141,5202 M⁺;

R_f = 0,589 (układ G).

Charakterystyka związku MPA-Thr-Lys(FmocαAla)-Pro-Arg(NO₂)-OMe **265**:

Związek **265** otrzymałam z 53% wydajnością.

MS m/z obliczone dla $C_{58}H_{76}N_{10}O_{16}$ 1155,2521; znalezione 1155,5356 M^+ ;

$R_f = 0,542$ (układ G).

Charakterystyka związku MPA-Thr-Lys(Fmoc β Ala)-Pro-Arg(NO₂)-OMe **266**:

Związek **266** otrzymałam z 51% wydajnością.

MS m/z obliczone dla $C_{58}H_{76}N_{10}O_{16}$ 1155,2581; znalezione 1155,5460 M^+ ;

$R_f = 0,502$ (układ G).

Charakterystyka związku MPA-Thr-Lys(FmocVal)-Pro-Arg(NO₂)-OMe **267**:

Związek **267** otrzymałam z 49% wydajnością.

MS m/z obliczone dla $C_{59}H_{78}N_{10}O_{16}$ 1183,3174; znalezione 1183,5718 M^+ ;

$R_f = 0,583$ (układ G).

Charakterystyka związku MPA-Thr-Lys(FmocLeu)-Pro-Arg(NO₂)-OMe **268**:

Związek **268** otrzymałam z 42% wydajnością.

MS m/z obliczone dla $C_{60}H_{80}N_{10}O_{16}$ 1197,3341; znalezione 1197,5756 M^+ ;

$R_f = 0,602$ (układ G).

Charakterystyka związku MPA-Thr-Lys(FmocIle)-Pro-Arg(NO₂)-OMe **269**:

Związek **269** otrzymałam z 45% wydajnością.

MS m/z obliczone dla $C_{60}H_{80}N_{10}O_{16}$ 1197,3326; znalezione 1197,5822 M^+ ;

$R_f = 0,571$ (układ G).

1.5.1.5. Usunięcie osłony Fmoc z peptydowych analogów MPA zawierających tuftsynę

0,05 g (0,046 mmola) MPA-Thr-Lys(Fmoc)-Pro-Arg(NO₂)-OMe rozpuszczałam w 1 ml chloroformu, a następnie dodawałam 0,2-0,3 ml dietyloaminy. Mieszałam i roztwór pozostawiałam na noc. Reakcję kontrolowałam za pomocą TLC w układzie G. Chloroform i dietyloaminę oddestylowałam używając wyparki obrotowej, a związek oczyszczałam za pomocą preparatywnej chromatografii cienkwarstwowej (PTLC) w układzie C i H.

Związek **270** otrzymałam z 84% wydajnością.

Charakterystyka związku MPA-Thr-Lys-Pro-Arg(NO₂)-OMe **270**:

Związek **270** otrzymałam z 84% wydajnością.

MPA-T (270): ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 0,97 (d, $J=6,3$ Hz, 3H, γ -T4), 1,36 (m, 2H, γ -K4), 1,53 (m, 5H, δ -K5, β -K3b, γ -R4), 1,63 (m, 2H, β -K3a, β -R3a), 1,74 (s, 3H, f), 1,86 (m, 3H, β -P3b, γ -P4b, γ -P4a), 2,03 (m, 1H, β -P3a), 2,07 (s, 3H, e), 2,14 (m, 2H, g), 2,125 (m, 2H, h), 2,88 (m, 2H, ϵ -K6), 3,17 (m, 2H, δ -R5), 3,29 (d, $J=6,8$ Hz, 2H, d), 3,52 (m, 1H, δ -P5b), 3,62 (s, 3H, COOMe), 3,65 (m, 1H, δ -P5a), 3,69 (s, 3H, c), 3,92 (m, 1H, β -T3), 4,17 (m, 1H, α -T2), 4,21 (m, 1H, α -R2), 4,35 (m, 1H, α -P2), 4,50 (m, 1H, α -K2), 5,14 (t, $J=6,4$ Hz, 1H, a), 5,23 (s, 2H, b), 7,81 (m, 2H, α -KNH, α -TNH), 8,34 (d, $J=8,34$ Hz, 1H, α -RNH);

^{13}C NMR (CD $_3$ OD, 400 MHz, CD $_3$ OD- d_4): 10,02 (e), 14,93 (f), 18,83 (γ -T4), 21,73 (γ -K4), 22,25 (d), 24,79 (γ -P4), 26,7 (γ -R4), 28,19 (β -R3), 29,11 (δ -K5), 30,28 (β -P3), 34,26 (h), 35,13 (g), 39,10 (ϵ -K6), 40,15 (δ -R5), 42,15 (δ -P5), 48,46 (α -R2), 50,83 (α -K2), 51,46 (OMe), 56,93 (α -T2), 58,87 (α -P2), 61,17 (c), 66,99 (β -T3), 69,39 (b), 106,36 (l), 116,21 (r), 122,31 (o), 123,11 (a), 133,70 (j), 145,27 (m), 153,82 (p), 163,43 (k), 170,83 (T1), 171,31 (K1), 172,12 (n), 172,47 (R1), 173,10 (P1), 174,75 (i);

MS m/z obliczone dla C $_{39}$ H $_{59}$ N $_9$ O $_{13}$ 861,4231; znalezione 861,9248 M $^+$;

R_f = 0,458 (układ C);

Czystość HPLC 100%.

Charakterystyka związku MPA-Thr-Lys(Gly)-Pro-Arg(NO $_2$)-OMe 271:

Związek **271** otrzymałam z 81% wydajnością.

MPA-T-Gly (271): ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 0,94 (d, $J=6,3$ Hz, 3H, γ -T4), 1,24 (m, 2H, γ -K4), 1,33 (m, 2H, δ -K5), 1,46 (m, 5H, β -K3b, γ -R4, β -K3a, β -K3a), 1,67 (m, 4H, f, β -R3a), 1,75 (m, 3H, β -P3b, γ -P4b, γ -P4a), 2,01 (m, 4H, β -P3a, e), 2,10 (m, 2H, g), 2,17 (m, 2H, hb, ha), 3,03 (m, 2H, ϵ -K6), 3,10 (m, 4H, δ -R5, α -G2), 3,23 (d, $J=6,8$ Hz, 2H, d), 3,48 (m, 1H, δ -P5b), 3,61 (s, 3H, COOMe), 3,63 (m, 1H, δ -P5a), 3,65 (s, 3H, c), 3,89 (m, 1H, β -T3), 4,14 (m, 1H, α -T2), 4,18 (m, 1H, α -R2), 4,32 (m, 1H, α -P2), 4,44 (m, 1H, α -K2), 5,09 (t, $J=6,5$ Hz, 1H, a), 5,15 (s, 2H, b), 6,70 (m, 2H, α -KNH, α -TNH), 7,86 (t, $J=5,5$ Hz, 1H, ϵ -NHK), 8,22 (d, $J=7,4$ Hz, 1H, α -RNH);

^{13}C NMR (CD $_3$ OD, 400 MHz, CD $_3$ OD- d_4): 11,48 (e), 16,51 (f), 20,19 (γ -T4), 22,52 (γ -K4), 22,95 (d), 24,90 (γ -P4/ γ -R4), 28,46 (β -R3), 29,17 (δ -K5), 39,45 (β -P3), 31,24 (β -K3), 34,58 (h), 35,50 (g), 38,54 (ϵ -K6), 40,63 (δ -P5), 43,71 (α -G2), 50,63 (α -R2), 52,02 (α -K2), 52,29 (COOMe), 58,44 (α -T2), 59,43 (α -P2), 60,99 (c), 67,03 (β -T3), 68,86 (b), 105,90 (l), 107,27 (r), 123,01 (o), 123,23 (a), 134,18 (j), 146,11 (m), 159,78 (p), 162,98 (k), 170,29 (T1), 170,42 (K1), 170,91 (n), 171,93 (G1), 172,24 (P1), 172,56 (R1), 172,80 (i);

MS m/z obliczone dla C $_{41}$ H $_{62}$ N $_{10}$ O $_{14}$ 918,9926; znalezione 919,4530 M $^+$;

R_f = 0,372 (układ C);

Czystość HPLC 100%.

Charakterystyka związku MPA-Thr-Lys(α Ala)-Pro-Arg(NO₂)-OMe **272**:

Związek **272** otrzymałam z 79% wydajnością.

MPA-T- α Ala (272): ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 0,97 (d, J=6,3 Hz, 3H, γ -T4), 1,18 (d, J=6,3 Hz, 3H, β -A3), 1,29 (m, 2H, γ -K4), 1,39 (m, 3H, δ -K5, β -K3b), 1,48 (m, 2H, γ -R4) 1,56 (m, 1H, β -R3b), 1,62 (m, 1H, β -K3a), 1,68 (m, 1H, β -R3a), 1,74 (s, 3H, f), 1,79 (m, 2H, β -P3b, γ -P4b), 1,89 (m, 1H, γ -P4a), 2,03 (m, 1H, β -P3a), 2,07 (s, 3H, e), 2,15 (m, 2H, g), 2,27 (m, 2H, h), 3,05 (m, 2H, ϵ -K6), 3,17 (m, 2H, δ -R5), 3,28 (d, J=6,8 Hz, 2H, d), 3,05 (m, 1H, δ -P5b), 3,41 (dd, J=13,9 Hz, J=6,9 Hz, 1H, α -A2), 3,62 (s, 3H, COOMe), 3,65 (m, 1H, δ -P5a), 3,69 (s, 3H, c), 3,92 (m, 1H, β -T3), 4,17 (m, 1H, α -T2), 4,22 (m, 1H, α -R2), 4,35 (m, 1H, α -P2), 4,47 (m, 1H, α -K2), 5,15 (t, J=6,5 Hz, 1H, a), 5,21 (s, 2H, b), 7,74 (m, 2H, α -KNH, α -TNH), 7,97 (m, 1H, ϵ -KNH), 8,30 (d, J=7,4 Hz, 1H, α -RNH);

¹³C NMR (CD₃OD, 400 MHz, CD₃OD-d₄) δ ppm: 10,05 (e), 14,98 (f), 18,86 (γ -T4), 18,92 (β -A3), 22,17 (γ -K4), 22,29 (d), 24,81 (γ -P4), 28,22 (γ -R4), 28,50 (β -R3), 29,04 (δ -K5), 30,49 (β -P3), 31,28 (β -K3), 34,32 (g), 35,15 (h), 38,55 (ϵ -K6), 40,15 (δ -R5), 46,89 (δ -P5), 48,48 (α -R2), 49,81 (α -A2), 51,1 (α -K2), 51,48 (OMe), 58,67 (α -T2), 59,76 (α -P2), 61,17 (c), 69,03 (β -T3), 69,33 (b), 106,37 (l), 115,91 (r), 122,40 (o), 123,17 (a), 133,65 (j), 145,26 (m), 154,20 (p), 163,40 (k), 171,12 (T1), 171,30 (K1, A1), 172,07 (n), 172,51 (R1), 173,01 (P1), 174,67 (i);

$R_f = 0,442$ (układ C);

Czystość HPLC 100%.

Charakterystyka związku MPA-Thr-Lys(β Ala)-Pro-Arg(NO₂)-OMe **273**:

Związek **273** otrzymałam z 78% wydajnością.

MPA-T- β Ala (273): ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 0,97 (d, J=6,3 Hz, 3H, γ -T4), 1,33 (m, 2H, γ -K4), 1,38 (m, 3H, δ -K5, β -K3b), 1,47 (m, 2H, γ -R4) 1,55 (m, 1H, β -R3b), 1,63 (m, 1H, β -K3a), 1,71 (m, 1H, β -R3a), 1,74 (s, 3H, f), 1,78 (m, 1H, β -P3b), 1,88 (m, 2H, γ -P4b, γ -P4a), 2,04 (m, 1H, β -P3a), 2,08 (s, 3H, e), 2,16 (m, 2H, g), 2,27 (m, 2H, h), 2,46 (m, 2H, α -A2), 2,89 (q, J=7,3 Hz, 2H, β -A3), 3,02 (m, 2H, ϵ -K6), 3,15 (m, 2H, δ -R5), 3,30 (d, J=7,0 Hz, 2H, d), 3,5 (m, 1H, δ -P5b), 3,65 (s, 3H, COOMe), 3,65 (m, 1H, δ -P5a), 3,70 (s, 3H, c), 3,91 (m, 1H, β -T3), 4,18 (m, 2H, α -T2, α -R2), 4,35 (m, 1H, α -P2), 4,47 (m, 1H, α -K2), 5,13 (t, J=6,4 Hz, 1H, a), 5,25 (s, 2H, b), 7,79 (m, 2H, α -KNH, α -TNH), 7,81 (m, 1H, ϵ -KNH), 8,33 (d, J=7,2 Hz, 1H, α -RNH);

¹³C NMR (CD₃OD, 400 MHz, CD₃OD-d₄) δ ppm: 10,07 (e), 14,95 (f), 18,82 (γ -T4), 22,18 (γ -K4), 22,24 (d), 24,81 (γ -P4), 28,21 (γ -R4), 28,45 (β -R3), 29,03 (δ -K5), 30,46 (β -P3), 31,39 (β -K3), 34,33 (h), 35,16 (g), 35,88 (α -A2), 38,54 (β -A3), 40,18 (ϵ -K6), 42,15 (δ -R5), 46,92 (δ -P5), 48,48 (α -R2, α -K2), 51,49 (OMe), 58,63 (α -T2), 60,08 (α -

P2), 60,22 (c), 67,10 (β -T3), 69,47 (b), 106,33 (l), 116,53 (r), 122,24 (o), 123,01 (a), 133,82 (j), 145,28 (m), 153,28 (p), 163,44 (k), 170,77 (T1), 171,13 (K1), 171,25 (A1), 172,15 (n), 172,41 (R1), 173,04 (P1), 174,67 (i);

MS m/z obliczone dla $C_{42}H_{64}N_{10}O_{14}$ 933,0201; znalezione 933,4666 M^+ ;

$R_f = 0,370$ (układ C);

Czystość HPLC 94,8 %.

Charakterystyka związku MPA -Thr-Lys(Val)-Pro-Arg(NO₂)-OMe **274**:

Związek **274** otrzymałam z 82% wydajnością.

MPA-T-Val (274): ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 0,81 (d, J=6,8 Hz, 3H, γ -V4), 0,86 (d, J=6,9 Hz, 3H, γ -V4), 0,96 (d, J=6,3 Hz, 3H, γ -T4), 1,22 (m, 5H, γ -K4, δ -K5, β -K3b), 1,48 (m, 5H, γ -R4, β -K3a, β -R3a, β -R3b), 1,68 (s, 3H, f), 1,77 (m, 4H, β -P3b, β -V2, γ -P4b, γ -P4a), 2,01 (m, 4H, β -P3a, e), 2,10 (m, 4H, g,h), 2,99 (m, 5H, ϵ -K6, δ -R5, α -V2), 3,25 (d, J=6,9 Hz, 2H, d), 3,48 (m, 1H, δ -P5b), 3,59 (s, 3H, COOMe), 3,64 (m, 1H, δ -P5a), 3,66 (s, 3H, c), 3,88 (m, 1H, β -T3), 4,15 (m, 2H, α -T2, α -R2), 4,33 (m, 1H, α -P2), 4,44 (m, 1H, α -K2), 5,10 (t, J=5,14 Hz, 1H, a), 5,20 (s, 2H, b), 7,72 (m, 2H, α -KNH, α -TNH), 7,98 (m, 1H, ϵ -NHK), 8,29 (d, J=8,3 Hz, 1H, α -RNH);

¹³C NMR (CD₃OD, 400 MHz, CD₃OD-d₄): 10,03 (e), 14,92 (f), 16,70 (γ -V4), 18,02 (γ -T5), 18,83 (γ -T4), 22,25 (d), 24,81 (γ -R4), 24,87 (γ -P4), 28,22 (β -R3), 28,52 (δ -R5), 29,03 (β -P3), 30,48 (β -K3), 31,31 (β -V3), 34,34 (δ -K5), 35,17 (β -P3), 38,55 (β -R3), 40,14 (g), 51,11 (α -K2), 51,46 (COOMe), 58,67 (α -T2), 59,76 (α -P2), 60,18 (c), 67,04 (β -T3), 69,40 (b), 106,34 (l), 116,34 (r), 122,29 (o), 123,07 (a), 133,74 (j), 145,25 (m), 159,46 (p), 163,43 (k), 171,12 (K1), 171,30 (T1), 172,05 (n/V1), 172,44 (P1), 173,02 (R1), 174,66 (i);

MS m/z obliczone dla $C_{43}H_{66}N_{10}O_{14}$ 947,0451; znalezione 947,4882 M^+ ;

$R_f = 0,58$ (układ C);

Czystość HPLC 99,3%.

Charakterystyka związku MPA-Thr-Lys(Leu)-Pro-Arg(NO₂)-OMe **275**:

Związek **275** otrzymałam z 83% wydajnością.

MPA-T-Leu (275): ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 0,81 (m, 6H, δ -L5, ϵ -L6), 0,96 (d, J=6,3 Hz, 3H, γ -T4), 1,24 (m, 7H, γ -K4, β -L2, δ -K5, β -K3b, β -R3b), 1,53 (m, 4H, γ -R4, β -K3a, β -R3a), 1,74 (s, 3H, f), 1,77 (m, 4H, β -P3b, γ -L4, γ -P4b, γ -P4a), 2,05 (m, 4H, β -P3a, e), 2,13 (m, 4H, g,h), 3,01 (m, 4H, ϵ -K6, δ -R5), 3,28 (d, J=6,8 Hz, 2H, d), 3,44 (m, 1H, δ -P5b), 3,62 (m, 4H, COOMe, δ -P5a), 3,69 (s, 3H, c), 3,89 (m, 1H, β -T3), 4,16 (m, 2H, α -T2, α -R2), 4,33 (m, 1H, α -P2), 4,44 (m, 1H, α -K2), 5,12 (t, J=6,5 Hz, 1H, a), 5,24 (s, 2H, b), 7,73 (m, 2H, α -KNH, α -TNH), 8,13 (m, 1H, ϵ -NHK), 8,29 (d, J=8,3 Hz, 1H, α -RNH);

^{13}C NMR (CD_3OD , 400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$): 10,60 (e), 14,97 (f), 18,07 (γ -T4), 21,10 (d/ γ -K4), 21,68 (ϵ -L6) 22,26 (δ -L5), 24,34 (γ -L4), 24,82 (γ -R4/ γ -P4), 28,24 (β -R3), 28,48 (δ -R5), 29,03 (β -P3), 30,48 (β -K3), 34,35 (δ -K5), 35,17 (β -P3), 38,55 (β -R3), 40,16 (g), 42,35 (ϵ -K6), 48,47 (α -R2), 51,11 (α -K2), 51,48 (α -L2), 52,63 (COOMe), 58,69 (α -T2), 60,19 (c), 67,05 (β -T3), 69,41 (b), 106,34 (l), 116,31 (r), 122,29 (o), 123,07 (a), 133,75 (j), 145,25 (m), 159,44 (p), 163,44 (k), 171,13 (K1), 171,31 (T1), 172,05 (n/L1), 172,44 (P1), 173,03 (R1), 174,65 (i);

MS m/z obliczone dla $\text{C}_{45}\text{H}_{70}\text{N}_{10}\text{O}_{14}$ 975,1052; znalezione 975,3518 M^+ ;

$R_f = 0,548$ (układ C);

Czystość HPLC 98,7%.

Charakterystyka związku MPA-Thr-Lys(Ile)-Pro-Arg(NO_2)-OMe 276:

Związek **276** otrzymałam z 77,7% wydajnością.

MPA-T-Ile (276): ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm: 0,81 (m, 6H, δ -I5, ϵ -I6), 0,96 (d, $J=6,3$ Hz, 3H, γ -T4), 1,26 (m, 6H, γ -K4, β -I3, δ -K5, β -R3b), 1,51 (m, 5H, γ -R4, β -K3b, β -R3a, β -K3a), 1,70 (s, 4H, f, γ -I4b), 1,77 (m, 4H, β -P3b, γ -I4a, γ -P4b, γ -P4a), 2,00 (m, 1H, β -P3a), 2,08 (s, 3H, e), 2,15 (m, 4H, g, h), 2,99 (m, 4H, ϵ -K6, δ -R5), 3,22 (d, $J=3,2$ Hz, 1H, α -I2), 3,28 (d, $J=6,8$ Hz, 2H, d), 3,48 (m, 1H, δ -P5b), 3,62 (m, 3H, COOMe), 3,64 (m, 1H, δ -P5a), 3,69 (s, 3H, c), 3,90 (m, 1H, β -T3), 4,16 (m, 2H, α -T2, α -R2), 4,33 (m, 1H, α -P2), 4,44 (m, 1H, α -K2), 5,12 (t, $J=6,4$ Hz, 1H, a), 5,23 (s, 2H, b), 7,73 (m, 2H, α -KNH, α -TNH), 8,13 (m, 1H, ϵ -NHK), 8,29 (d, $J=8,3$ Hz, 1H, α -RNH);

^{13}C NMR (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$): 11,52 (e), 11,81 (δ -I5), 15,68 (ϵ -I6), 16,52 (f), 20,15 (γ -T4), 22,67 (γ -K4), 22,90 (d), 24,48 (γ -L4), 24,90 (γ -P4), 28,44 (β -R3), 29,15 (δ -P5), 29,47 (β -P3), 31,29 (β -K3), 34,56 (δ -K5), 35,52 (β -P3), 37,77 (h), 38,66 (g), 47,24 (α -P2), 49,04 (α -I2), 50,70 (α -K2), 52,61 (COOMe), 58,45 (α -P2) 59,42 (α -T2), 61,06 (c), 67,13 (β -T3), 69,02 (b), 107,35 (l), 115,86 (r), 122,96 (o), 123,05 (a), 134,40 (j), 146,20 (m), 159,88 (p), 163,03 (k), 170,31 (K1), 170,46 (T1), 170,76 (n/I1), 172,26 (P1), 172,49 (R1), 172,82 (i);

MS m/z obliczone dla $\text{C}_{45}\text{H}_{70}\text{N}_{10}\text{O}_{14}$ 975,1009 znalezione 975,5146 M^+ ;

$R_f = 0,532$ (układ C);

Czystość HPLC 98,5%.

1.5.2. Synteza peptydowych pochodnych MPA zawierających w swojej strukturze analogi retro-tuftsyny.

W celu wyselekcjonowania metody syntezy kwasu mykofenolowego z analogami retro-tuftsyny również sprawdziłam kilka metod tworzenia wiązania amidowego wykorzystując odczynniki kondensujące EDCI, EEDQ i T3P.

1.5.2.1. Procedura z wykorzystaniem EDCI×2/TEA×3

Pochodną TFA×Arg(NO₂)-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OCH₃ 0,01 g (0,011 mmola), MPA 0,00236 g (0,011 mmola) i TEA 0,0034 ml (0,033 mmola) rozpuściłam w 1 ml bezwodnego DMF. Następnie roztwór ochłodziłam do 0°C, po czym dodałam 0,0035 g (0,022 mmola) EDCI. Całość mieszałam w atmosferze gazu obojętnego (azotu) w temp. 0°C przez 2 godz. a następnie w temp. pokojowej przez 48 godz. Reakcję kontrolowałam za pomocą TLC w układzie G. DMF oddestylowałam używając pompy próżniowej a związek oczyszczałam za pomocą preparatywnej chromatografii cienkowsarstwowej (PTLC) w układzie G.

Związek **278** otrzymałam z 58% wydajnością.

1.5.2.2. Procedura z wykorzystaniem EDCI×5/TEA×2

Pochodną TFA×Arg(NO₂)-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OCH₃ 0,012 g (0,014 mmola), MPA 0,0044 g (0,014 mmola) i TEA 0,0028 ml (0,0028 mmola) rozpuściłam w 1 ml bezwodnego DMF. Następnie roztwór ochłodziłam do 0°C, po czym dodałam 0,011 g (0,069 mmola) EDCI. Całość mieszałam w atmosferze gazu obojętnego (azotu) w temp. 0°C przez 2 godz. a następnie w temp. pokojowej przez 48 godz. Reakcję kontrolowałam za pomocą TLC w układzie G. DMF oddestylowałam używając pompy próżniowej a związek oczyszczałam za pomocą preparatywnej chromatografii cienkowsarstwowej (PTLC) w układzie G.

Związek **278** otrzymałam z 34% wydajnością.

1.5.2.3. Procedura z wykorzystaniem EDCI/DMAP

Pochodną TFA×Arg(NO₂)-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OCH₃ 0,01 g (0,011 mmola), MPA 0,0026 g (0,008 mmola) i DMAP 0,015 g (0,011 mmola) rozpuściłam w 1 ml bezwodnego DMF. Następnie roztwór ochłodziłam do 0°C, po czym dodałam 0,0017 g (0,0107 mmola) EDCI. Całość mieszałam w atmosferze gazu obojętnego (azotu) w temp. 0°C przez 2 godz. a następnie w temp. pokojowej przez 48 godz. Reakcję kontrolowałam za pomocą TLC w układzie G. DMF oddestylowałam używając pompy próżniowej a związek oczyszczałam za pomocą preparatywnej chromatografii cienkowsarstwowej (PTLC) w układzie G.

Związek **278** otrzymałam z 64% wydajnością.

1.5.2.4. Procedura z wykorzystaniem EEDQ×2/Py×2

Pochodną TFA×Arg(NO₂)-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OCH₃ 0,020 g (0,022 mmola), MPA 0,0036 g (0,011 mmola) i Py 0,0018 ml (0,022 mmola) rozpuściłam w 1 ml bezwodnego DMF. Następnie roztwór ochłodziłam do 0°C, po czym dodałam 0,0055 g (0,022 mmola) EDDQ. Całość mieszałam w atmosferze gazu obojętnego (azotu) w temp. 0°C przez 2 godz. a następnie w temp. pokojowej przez 48 godz. Reakcję kontrolowałam za pomocą TLC w układzie G używając jako wywoływacza roztworu ninhydryny. DMF oddestylowałam używając pompy próżniowej a związek

oczyszczalam za pomoca preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej (PTLC) w ukkladzie G.

Nie udalo mi sie wyizolowac produktu.

1.5.2.5. Procedura z wykorzystaniem EEDQ×5/Py×5

Pochodna TFA×Arg(NO₂)-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OCH₃ 0,010 g (0,011 mmola), MPA 0,0036 g (0,011 mmola) i Py 0,0044 ml (0,056 mmola) rozpuscilam w 1 ml bezwodnego DMF. Nastepnie roztwor ochlodzilam do 0°C, po czym dodalam 0,0014 g (0,056 mmola) EDDQ. Calosc mieszalam w atmosferze gazu obojnetnego (azotu) w temp. 0°C przez 2 godz. a nastepnie w temp. pokojowej przez 48 godz. Reakcje kontrolowalam za pomoca TLC w ukkladzie G uzywajac jako wywoływacza roztworu ninhydryny. DMF oddestylowalam uzywajac pompy próżniowej a związek oczyszczalam za pomoca preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej (PTLC) w ukkladzie G.

Nie udalo mi sie wyizolowac produktu.

1.5.2.6. Procedura z wykorzystaniem T3P

Pochodna TFA×Arg(NO₂)-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OCH₃ 0,044 g (0,050 mmola), MPA 0,016 g (0,050 mmola) i TEA 0,023 ml (0,225 mmola) rozpuscilam w 2 ml bezwodnego DMF. Nastepnie roztwor ochlodzilam do 0°C, po czym dodalam 0,053 ml (0,09 mmola) T3P w 50% roztworze DMF Calosc mieszalam w atmosferze gazu obojnetnego (azotu) w temp. 0°C przez 2 godz. a nastepnie w temp. pokojowej przez 48 godz. Reakcje kontrolowalam za pomoca TLC w ukkladzie G uzywajac jako wywoływacza roztworu ninhydryny. DMF oddestylowalam uzywajac pompy próżniowej a związek oczyszczalam za pomoca preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej (PTLC) w ukkladzie G.

Związek **278** otrzymalam z 28% wydajnoscia.

1.5.2.7. Pochodne MPA i analogow retro-tuftsyny 278-284

Związki **278-284** otrzymalam wykorzystujac metode T3P/TEA zgodnie z procedura opisaną w punkcie 1.5.2.3.

Charakterystyka związku MPA-Arg(NO₂)-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OCH₃ **278**:

Związek **278** otrzymalam z 64% wydajnoscia w postaci sypkiego bialego proszku.

MS *m/z* obliczone dla C₅₄H₆₉N₉O₁₅ 1084,1181; znalezione 1084,5084 M⁺;

temp. top. 121-125°C;

R_f = 0,489 (uklad G).

Charakterystyka związku MPA-Arg(NO₂)-Pro-Lys(FmocGly)-Thr-OCH₃ **279**:

Związek **279** otrzymałam z 28% wydajnością w postaci sypkiego białego proszku.

MS *m/z* obliczone dla C₅₆H₇₂N₁₀O₁₆ 1141,2341; znalezione 1141,6529 M⁺;

temp. top. 117-120°C;

R_f = 0,474 (układ G).

Charakterystyka związku MPA-Arg(NO₂)-Pro-Lys(FmocαAla)-Thr-OCH₃ **280**:

Związek **280** otrzymałam z 28% wydajnością.

MS *m/z* obliczone dla C₅₈H₇₄N₁₀O₁₆ 1155,2602; znalezione 1155,5356 M⁺;

R_f = 0,480 (układ C).

Charakterystyka związku MPA-Arg(NO₂)-Pro-Lys(FmocβAla)-Thr-OCH₃ **281**:

Związek **281** otrzymałam z 28% wydajnością w postaci sypkiego białego proszku.

MS *m/z* obliczone dla C₅₈H₇₄N₁₀O₁₆ 1155,2527; znalezione 1155,5801 M⁺;

temp. top. 133-138°C;

R_f = 0,420 (układ C)

Charakterystyka związku MPA-Arg(NO₂)-Pro-Lys(FmocVal)-Thr-OCH₃ **282**:

Związek **282** otrzymałam z 28% wydajnością.

MS *m/z* obliczone dla C₅₉H₇₈N₁₀O₁₆ 1183,3126; znalezione 1183,5718 M⁺;

R_f = 0,465 (układ G).

Charakterystyka związku MPA-Arg(NO₂)-Pro-Lys(FmocLeu)-Thr-OCH₃ **283**:

Związek **283** otrzymałam z 28% wydajnością.

MS *m/z* obliczone dla C₆₀H₈₀N₁₀O₁₆ 1197,3315; znalezione 1197,5792 M⁺;

R_f = 0,512 (układ G).

Charakterystyka związku MPA-Arg(NO₂)-Pro-Lys(FmocIle)-Thr-OCH₃ **284**:

Związek **284** otrzymałam z 28% wydajnością.

MS *m/z* obliczone dla C₆₀H₈₀N₁₀O₁₆ 1197,3324; znalezione 1197,5822 M⁺;

$R_f = 0,585$ (układ G).

1.5.2.8. Usunięcie osłony Fmoc z peptydowych analogów MPA zawierających retinofitynę

0,05 g (0,046 mmola) MPA-Arg(NO₂)-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OMe rozpuszczałam w 1 ml chloroformu, a następnie dodawałam 0,2-0,3 ml dietyloaminy. Mieszałam i roztwór pozostawiałam na noc. Reakcję kontrolowałam za pomocą TLC w układzie G. Chloroform i dietyloaminę oddestylowałam używając wyparki obrotowej, a związek oczyszczałam za pomocą preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej (PTLC) w układzie C i H.

Związek **285** otrzymałam z 86% wydajnością.

Charakterystyka związku MPA-Arg(NO₂)-Pro-Lys-Thr-OMe **285**:

MPA-RT (285): ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 1,057 (m, 3H, γ-T4), 1,348 (m, 2H, γ-K4), 1,487 (m, 3H, δ-K5, β-R3b), 1,532 (m, 3H, β-K3b, γ-R4), 1,640 (m, 2H, β-K3a, β-R3a), 1,728 (s, 3H, f), 1,810 (m, 2H, γ-P4b, β-P3b), 1,908 (m, 1H, γ-P4a), 1,992 (m, 1H, β-P3b), 2,083 (s, 3H, e), 2,132 (m, 2H, g), 2,171 (m, 2H, h), 2,735 (m, 2H, ε-K6), 3,135 (m, 2H, δ-R5), 3,283 (d, J=6,7 Hz, 2H, d), 3,548 (m, 1H, δ-P5b), 3,621 (s, 3H, COOMe), 3,649 (m, 1H, δ-P5a), 3,696 (s, 3H, c), 4,106 (m, 1H, β-T3), 4,237 (m, 1H, α-T2), 4,338 (m, 2H, α-K2, α-P2), 4,424 (m, 1H, α-R2), 5,099 (m, 1H, a), 5,253 (s, 2H, b), 7,972 (d, J=8,2 Hz, 1H, α-TNH), 8,045 (m, 2H, ε-KNH), 8,114 (d, J=7,6 Hz, 1H, α-RNH), 8,162 (d, J=7,8 Hz, 1H, α-KNH);

¹³C NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ ppm: 11,54 (e), 16,49 (f), 19,03 (γ-T4), 20,52 (d), 22,42 (γ-K4), 22,87 (γ-P4), 24,96 (δ-K5), 26,77 (γ-R4), 28,65 (β-R3), 29,55 (β-P3), 31,57 (β-K3), 34,27 (h), 35,46 (g), 38,97 (ε-K6), 41,67 (δ-R5), 47,33 (δ-P5), 52,30 (OMe), 52,50 (α-R2), 56,47 (α-K2), 58,35 (α-T2), 59,76 (α-P2), 61,12 (c), 66,82 (β-T3), 69,10 (b), 107,44 (o), 116,45 (r,l), 122,96 (a), 134,54 (j), 146,27 (m), 153,17 (p), 163,05 (k), 170,61 (n), 170,69 (T1), 171,46 (P1), 171,88 (i), 172,23 (K1), 172,54 (R1);

MS *m/z* obliczone dla C₃₉H₅₉N₉O₁₃ 861,4232; znalezione 862,4333 M⁺;

$R_f = 0,583$ (układ C);

Czystość HPLC 100%.

Charakterystyka związku MPA-Arg(NO₂)-Pro-Lys(Gly)-Thr-OMe **286**:

Związek **286** otrzymałam z 81% wydajnością.

MPA-RT-Gly (286): ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 1,06 (d, J = 6,6 Hz, 3H, γ-T4), 1,29 (m, 2H, γ-K4), 1,38 (m, 3H, δ-K5, β-R3), 1,46 (m, 3H, β-K3, γ-R4), 1,65 (m, 2H, β-K3, β-R3), 1,73 (s, 3H), 1,81 (m, 2H, γ-P4, β-P3), 1,88 (m, 1H, γ-P4), 1,98 (m, 1H, β-P3), 2,06 (s, 3H), 2,13 (m, 2H), 2,19 (m, 2H), 3,07 (m, 2H, ε-K6), 3,11 (m, 2H, δ-R5), 3,26 (d, J = 6,7 Hz, 2H), 3,36 (m, 2H, α-G2), 3,51 (m, 1H, δ-P5), 3,60 (m, 1H, δ-P5), 3,63 (s, 3H, COOCH₃), 3,68 (s, 3H), 4,10 (m, 1H, β-T3), 4,26 (m, 1H, α-T2), 4,28

(m, 1H, α -K2), 4,34 (m, 2H, α -P2), 4,45 (m, 1H, α -R2), 5,12 (t, J = 6,5 Hz, 1H), 5,21 (s, 2H), 7,82 (d, J = 8,4 Hz, 1H, α -TNH), 7,97 (m, 3H, α -RNH, α -KNH, ϵ -KNH);

^{13}C NMR (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$) δ ppm: 10,04 (e), 14,99 (f), 18,97 (γ -T4), 22,59 (d), 24,65 (γ -K4), 28,43 (γ -P4), 29,22 (γ -R4), 31,05 (β -R3), 33,94 (δ -K5), 35,05 (β -P3), 38,65 (β -K3), 40,53 (h), 42,17 (g), 42,78 (ϵ -K6), 48,47 (δ -R5), 50,77 (δ -P5), 51,47 (α -R2), 53,28 (OMe), 56,93 (α -K2), 57,81 (α -T2), 60,11 (α -P2), 60,15 (c), 66,99 (β -T3), 69,33 (b), 106,38 (o), 122,41 (r,l), 123,16 (a), 133,57 (j), 145,29 (m), 159,56 (p), 163,41 (k), 171 (n), 171,13 (T1), 172,56 (P1), 172,97 (i,K1), 173, 25 (R1), 174,23 (G1);

MS m/z obliczone dla $\text{C}_{41}\text{H}_{62}\text{N}_{10}\text{O}_{14}$ 918,9908; znalezione 919,4530 M^+ ;

R_f = 0,454 (układ C).

Czystość HPLC 100%.

Charakterystyka związku MPA-Arg(NO_2)-Pro-Lys(α Ala)-Thr-OMe **287**:

Związek **287** otrzymałam z 80% wydajnością.

MPA-RT- α Ala (287): ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm: 1,043 (d, J=5,7 Hz, 3H, γ -T4), 1,211 (d, J=6,9 Hz, 3H, β -A3), 1,290 (m, 2H, γ -K4), 1,380 (m, 3H, δ -K5, β -R3b), 1,5483 (m, 3H, β -K3b, γ -R4), 1,653 (m, 2H, β -K3a, β -R3a), 1,727 (s, 3H, f), 1,802 (m, 2H, γ -P4b, β -P3b), 1,894 (m, 1H, γ -P4a), 1,998 (m, 1H, β -P3a), 2,064 (s, 3H, e), 2,128 (m, 2H, g), 2,183 (m, 2H, h), 3,043 (m, 2H, ϵ -K6), 3,130 (m, 2H, δ -R5), 3,266 (d, J=6,5 Hz, 2H, d), 3,488 (m, 1H, α -A2), 3,532 (m, 1H, δ -P5b), 3,617 (m, 1H, δ -P5a), 3,625 (s, 3H, COOMe), 3,682 (s, 3H, c), 4,103 (m, 1H, β -T3), 4,257 (m, 1H, α -T2), 4,278 (m, 1H, α -K2), 4,341 (m, 2H, α -P2), 4,442 (m, 1H, α -R2), 5,114 (t, J=6,6 Hz, 1H, a), 5,217 (s, 2H, b), 7,827 (d, J=8,4 Hz, 1H, α -TNH), 8,026 (m, 3H, α -RNH, α -KNH, ϵ -KNH);

^{13}C NMR (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$) δ ppm: 10,06 (e), 14,98 (f), 18,56 (β -A3), 18,98 (γ -T4), 22,30 (d), 24,65 (γ -K4), 28,43 (γ -P4), 29,22 (γ -R4), 31,05 (β -R3), 33,96 (δ -K5), 35,07 (β -P3), 38,74 (β -K3), 40,53 (h), 49,68 (δ -R5), 50,77 (δ -P5, α -A2), 51,48 (α -R2), 53,32 (OMe), 56,94 (α -K2), 57,81 (α -T2), 60,11 (α -P2), 60,18 (c), 67,01 (β -T3), 69,38 (b), 106,38 (o), 116,13 (l), 122,34 (r), 123,1 (a), 133,65 (j), 145,29 (m), 159,55 (p), 163,42 (k), 171,01 (n), 171,14 (T1), 172,48 (P1), 172,96 (i) 173,23 (K1), 173,80 (R1), 174,22 (A1);

MS m/z obliczone dla $\text{C}_{42}\text{H}_{64}\text{N}_{10}\text{O}_{14}$ 933,0272; znalezione 933,4678 M^+ ;

R_f = 0,480 (układ C);

Czystość HPLC 97%.

Charakterystyka związku MPA-Arg(NO_2)-Pro-Lys(β Ala)-Thr-OMe **288**:

Związek **288** otrzymałam z 88% wydajnością.

MPA-RT- β Ala (288): ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm: 1,043 (d, J=7 Hz, 3H, γ -T4), 1,270 (m, 2H, γ -K4), 1,385 (m, 3H, δ -K5, β -R3b), 1,5484 (m, 3H, β -K3b, γ -R4),

1,653 (m, 2H, β -K3a, β -R3a), 1,727 (s, 3H, f), 1,817 (m, 2H, γ -P4b, β -P3b), 1,886 (m, 1H, γ -P4a), 2,00 (m, 1H, β -P3a), 2,068 (s, 3H, e), 2,105 (m, 2H, g), 2,162 (m, 2H, h), 2,444 (t, J=6,8 Hz, 2H, α -A2), 2,946 (t, J=5,3 Hz, 2H, β -A3), 3,026 (m, 2H, ϵ -K6), 3,128 (m, 2H, δ -R5), 3,270 (d, J=6,8 Hz, 2H, d), 3,516 (m, 1H, δ -P5b), 3,615 (m, 1H, δ -P5a), 3,623 (s, 3H, COOMe), 3,686 (s, 3H, c), 4,102 (m, 1H, β -T3), 4,253 (m, 1H, α -T2), 4,282 (m, 1H, α -K2), 4,340 (m, 2H, α -P2), 4,436 (m, 1H, α -R2), 5,114 (t, J=6,9 Hz, 1H, a), 5,222 (s, 2H, b), 7,847 (d, J=8,4 Hz, 1H, α -TNH), 8,043 (m, 3H, α -RNH, α -KNH, ϵ -KNH);

^{13}C NMR (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$) δ ppm: 10,06 (e), 14,98 (f), 18,98 (γ -T4), 22,31 (d), 24,66 (γ -K4), 28,30 (γ -P4), 29,22 (γ -R4), 31,00 (β -R3), 31,96 (β -A3), 33,95 (δ -K5), 35,06 (β -P3), 36,06 (α -A2), 38,66 (β -K3), 40,56 (h), 42,151 (g), 46,868 (ϵ -K6), 48,332 (δ -R5) 50,85 (δ -P5), 51,48 (α -R2), 53,29 (OMe), 56,93 (α -K2), 57,81 (α -T2), 60,18 (c), 67,01 (β -T3), 69,37 (b), 106,37 (o), 116,03 (l), 122,37 (r), 123,12 (a), 133,63 (j), 145,31 (m), 159,56 (p), 163,42 (k), 170,96 (n), 170,99 (T1), 172,51 (P1), 172,98 (i) 173,26 (K1), 174,24 (R1,A1);

MS m/z obliczone dla $\text{C}_{42}\text{H}_{64}\text{N}_{10}\text{O}_{14}$ 933,0237; znalezione 933,4709 M^+ ;

R_f = 0,309 (układ C);

Czystość HPLC 100%.

Charakterystyka związku MPA-Arg(NO₂)-Pro-Lys(Val)-Thr-OMe **289**:

Związek **289** otrzymałam z 79% wydajnością.

MPA-RT-Val (289): ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 0,807 (d, J=6,9 Hz, 3H, γ -V4), 0,858 (d, J=6,8 Hz, 3H, δ -V5), 1,026 (d, J=4,2 Hz, 3H, γ -T4), 1,279 (m, 2H, γ -K4), 1,369 (m, 3H, δ -K5, β -R3b), 1,461 (m, 3H, β -K3b, γ -R4), 1,627 (m, 2H, β -K3a, β -R3a), 1,714 (s, 3H, f), 1,792 (m, 2H, γ -P4b, β -P3b), 1,861 (m, 2H, γ -P4a, β -V3), 1,977 (m, 1H, β -P3a), 2,061 (s, 3H, e), 2,114 (m, 2H, g), 2,183 (m, 2H, h), 3,005 (m, 5H, α -V2, ϵ -K6, δ -R5), 3,262 (d, J=6,7 Hz, 2H, d), 3,502 (m, 1H, δ -P5b), 3,604 (m, 1H, δ -P5a), 3,625 (s, 3H, COOMe), 3,676 (s, 3H, c), 4,096 (m, 1H, β -T3), 4,252 (m, 1H, α -T2), 4,269 (m, 1H, α -K2), 4,3 (m25, 1H, α -P2), 4,437 (m, 1H, α -R2), 5,096 (t, J=6,5 Hz, 1H, a), 5,222 (s, 2H, b), 7,803 (d, J=8,4 Hz, 1H, α -TNH), 8,022 (m, 3H, α -RNH, α -KNH, ϵ -KNH);

^{13}C NMR (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$) δ ppm: 10,05 (e), 14,96 (f), 16,99 (δ -V5), 18,22 (γ -V4), 18,97 (γ -T4), 22,28 (d), 24,65 (γ -K4), 28,49 (γ -P4), 29,22 (γ -R4), 31,05 (β -R3), 31,56 (β -V3), 33,96 (δ -K5), 35,07 (β -P3), 38,68 (β -K3), 40,53 (h), 42,16 (g), 46,648 (ϵ -K6), 47,904 (δ -R5) 50,74 (δ -P5), 51,46 (α -R2), 53,33 (OMe), 56,93 (α -T2), 57,80 (α -V2), 60,1 (α -P2), 60,18 (c), 67,01 (β -T3), 69,39 (b), 106,35 (o), 116,26 (l), 122,3 (r), 123,08 (a), 133,67 (j), 145,28 (m), 159,57 (p), 163,42 (k), 170,98 (n), 171,12 (T1), 172,43 (P1), 172,97 (i) 173,22 (K1), 173,41 (R1), 174,21 (V1);

MS *m/z* obliczone dla C₄₃H₆₆N₁₀O₁₄ 947,0452; znalezione 948,4582 [M+H]⁺;

R_f = 0,436 (układ C);

Czystość HPLC 99%.

Charakterystyka związku MPA-Arg(NO₂)-Pro-Lys(Leu)-Thr-OMe **290**:

Związek **290** otrzymałam z 91% wydajnością.

MPA-RT-Leu (290): ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 0,77 (m, 6H, δ -L5, ε-L6), 1,014 (m, 3H, γ-T4), 1,22 (m, 10H, γ-K4, β-L3b, β-L3a, δ-K5, β-R3b, β-K3b, γ-R4), 1,59 (m, 3H, β-K3a, β-R3a, γ-L4b), 1,69 (s, 3H, f), 1,79 (m, 3H, γ-P4b, β-P3b, γ-L4a), 1,98 (m, 1H, γ-P4a), 2,05 (s, 3H, e), 2,11 (m, 4H, g, h), 3,03 (m, 2H, ε-K6), 3,11 (m, 2H, δ-R5), 3,25 (d, 2H, J=6,2 Hz, d), 3,32 (m, 1H, α-L2), 3,52 (m, 2H, δ-P5b, δ-P5a), 3,60 (s, 3H, COOMe), 3,67 (s, 3H, c), 4,09 (m, 1H, β-T3), 4,24 (m, 2H, α-T2, α-K2), 4,32 (m, 1H, α-P2), 4,43 (m, 1H, α-R2), 5,10 (t, J=6,6 Hz, 1H, a), 5,21 (s, 2H, b), 7,82 (d, J=8,4 Hz, 1H, α-TNH), 8,08 (m, 2H, α-RNH, α-KNH), 8,12 (m, 1H, ε-KNH);

¹³C NMR (400 MHz, CD₃OD-d₄) δ ppm: 11,49 (e), 16,44 (f), 20,48 (γ-T4), 23,39 (d/γ-K4), 23,35 (δ-L5), 24,41 (γ-L4), 24,87 (γ-P4/γ-R4), 28,83 (β-R3), 29,17 (δ-K5), 29,52 (β-P3), 31,81 (β-K3), 34,25 (h), 35,48 (g), 38,81 (ε-K6), 40,54 (δ-R5), 43,17 (β-L3), 47,18 (δ-P5), 50,26 (α-R2), 52,28 (OMe), 52,74 (α-L2), 52,85 (α-K2), 58,13 (α-T2), 59,58 (α-P2), 60,95 (c), 66,76 (β-T3), 68,98 (b), 122,94 (o/a), 146,11 (m), 159,72 (p), 162,98 (k), 170,48 (n), 171,43 (T1), 171,82 (P1), 172,14 (i), 172,59 (K1);

MS *m/z* obliczone dla C₄₅H₇₀N₁₀O₁₄ 975,1084; znalezione 975,4931 M⁺;

R_f = 0,678 (układ C);

Czystość HPLC 99,5%.

Charakterystyka związku MPA-Arg(NO₂)-Pro-Lys(Ile)-Thr-OMe **291**:

Związek **291** otrzymałam z 84% wydajnością.

MPA-RT-Ile (291): ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 0,806 (m, 6H, δ-I5, ε-I6), 1,041 (d, J=6,3 Hz, 3H, γ-T4), 1,078 (m, 2H, γ-I4), 1,273 (m, 2H, γ-K4), 1,393 (m, 3H, δ-K5, β-R3b), 1,459 (m, 3H, β-K3b, γ-R4), 1,634 (m, 3H, β-K3a, β-R3a, β-I3), 1,727 (s, 3H, f), 1,804 (m, 2H, γ-P4b, β-P3b), 1,894 (m, 2H, γ-P4a, β-T3), 1,995 (m, 1H, β-P3a), 2,071 (s, 3H, e), 2,129 (m, 4H, g, h), 3,007 (m, 5H, α-I2, ε-K6, δ-R5), 3,272 (d, J=6,5 Hz, 2H, d), 3,515 (m, 1H, δ-P5b), 3,617 (m, 1H, δ-P5a), 3,625 (s, 3H, COOMe), 3,687 (s, 3H, c), 4,103 (m, 1H, β-T3), 4,25 (m, 2H, α-T2, α-K2), 4,339 (m, 1H, α-P2), 4,444 (m, 1H, α-R2), 5,142 (t, J=6,7 Hz, 1H, a), 5,228 (s, 2H, b), 7,817 (d, J=8,2 Hz, 1H, α-TNH), 8,018 (m, 3H, α-RNH, α-KNH, ε-KNH);

¹³C NMR (400 MHz, CD₃OD-d₄) δ ppm: 10,07 (e), 10,45 (δ-I5), 14,45 (ε-I6), 14,93 (f), 18,97 (γ-T4), 22,29 (d), 24,22 (γ-I4), 24,66 (γ-K4), 28,48 (γ-P4), 29,22 (γ-R4), 31,04 (β-R3), 33,97 (δ-K5), 35,08 (β-P3), 38,24 (β-I3), 38,69 (β-K3), 40,53 (h), 42,16 (g),

46,894 (ϵ -K6), 48,357 (δ -R5) 50,76 (δ -P5), 51,47 (α -R2), 53,35 (OMe), 56,93 (α -T2), 57,81 (α -I2), 59,08 (α -K2), 60,11 (α -P2), 60,18 (c), 67,02 (β -T3), 69,39 (b), 106,35 (o), 116,2 (l), 122,32 (r), 123,09 (a), 133,66 (j), 145,29 (m), 159,56 (p), 163,42 (k), 170,99 (n), 171,14 (T1), 172,45 (P1), 172,97 (i) 173,23 (K1), 173,42 (R1), 174,21 (I1);

MS m/z obliczone dla $C_{45}H_{70}N_{10}O_{14}$ 975,1084; znalezione 975,5131 M^+ ;

R_f = 0,635 (układ C);

Czystość HPLC 98%.

2. Część biologiczna

2.1. Materiały stosowane w badaniach biologicznych

Odczynniki stosowane w pracy

DMSO	Sigma-Aldrich
RPMI-1640	IMMUNIQ (producent: PAA)
FBS	Life Technologies
PBS pH 7,4 W/O CAMQ USA PLASTIC	Life Technologies
P/S Penicilin-Streptomycin	Sigma-Aldrich
MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)- 2,5-difenylo-tetrazoliowy)	Sigma-Aldrich
Histopaque-1077	Sigma-Aldrich
VPD 450 (RUO) (Cell Trace Violet Cell Proliferation Kit)	Life Technologies
DMEM HG	Sigma-Aldrich
Dakarbazyna	Sigma-Aldrich
Cisplatyna	Sigma-Aldrich
XTT (wodorotlenek 2,3-bis(2-metoksy-4-nitro-5-sulfofenylo)-5-fenyloamino karbonylo-2H-tetrazoliowy)	Sigma-Aldrich
Podłoże płynne MHB	Biomaxima
Podłoże płynne MHA	Biomaxima
Ampicylina	Sigma-Aldrich
Kanamycyna	Sigma-Aldrich
Resazuryna	Sigma-Aldrich
EasYFlasks™ Nunclon™ Δ	ALAB sp. z o.o. (producent: NUNC/Thermo Scientific)
Probówki wirownicze	DIAG-MED

Końcówki do pipet	MEDLAB-PRODUCTS Sp. z o.o.
Probowki typu Eppendorf	MEDLAB-PRODUCTS Sp. z o.o.
Płytki okrągłodenne 96 dołków	Falcon
Płytki płaskodenne 96 dołków	Falcon

2.2. Badania aktywności immunosupresyjnej

2.2.1. Linie komórkowe

Podczas wykonywania badań używałam linii komórkowej ostrej białaczki limfoblastycznej typu T-Jurkat, którą pozyskiwałam z banku komórek.

2.2.2. Podłoża hodowlane

Linie komórkowa T-Jurkat oraz komórki PBMC zawieszałam w płynnym podłożu zawierającym RPMI-1640, 10% FBS oraz P/S. Komórki Jurkat hodowałam w jałowych butelkach hodowlanych zabezpieczonych jałową zakrętkę z filtrem zapewniającą swobodną wymianę gazową w trakcie trwania hodowli.

2.2.3. Hodowla linii komórkowej Jurkat

2.2.3.1. Pasażowanie linii komórkowej

Linia komórkowa Jurkat należy do linii komórek zawieszonych. Komórki zawieszane w medium hodowlanym umieszczałam w cieplarni w 37°C w atmosferze zawierającej 5% CO₂. Co 2-3 dni komórki pasażowałam rozpipetowując zawartość buteleczki. Po czym zużytyą pożywkę wymieniałam na nową i umieszczałam hodowlę w cieplarni.

2.2.3.2. Rozmrażanie linii komórkowej

Komórki Jurkat przechowywane są w kriampułkach w ciekłym azocie w banku komórek. Komórki rozmrażałam i odwirowywałam zawiesinę. Następnie nadsącz zlewałam a pozostałość zawieszałam w pożywce i rozpipetowywałam do jałowych buteleczek. Buteleczki hodowlane napełniałam do 10 mL medium hodowlanym zawierającym RPMI-1640, 10% FBS oraz P/S.

2.2.3.3. Mrożenie linii komórkowej

Komórki zawieszane w medium hodowlanym odwirowywałam, a nadsącz zlewałam. Pelet zawieszałam w pożywce z dodatkiem (10% końcowej obj.) FBS i 10% (10% końcowej obj.) DMSO. Następnie taką zawiesinę komórek umieszczałam w krioampułkach i mroziłam w -80°C.

2.2.4. Izolacja komórek PBMC

Mononuklearne komórki krwi obwodowej (PBMC) otrzymywałam z kożuszka leukocyтарnego, który traktowany jest jako odpad w procesie produkcji masy erytrocytarnej. Kożuszek odbierałam z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa

i Krwiolecznictwa w Gdańsku (RCKiK). Otrzymany materiał do badań pochodził od anonimowych i zdrowych dawców. Komórki PBMC otrzymywałam poprzez wirowanie w gradencie gęstości krwi żyłnej. Krew rozcieńczałam buforem PBS w stosunku 1:1. W 15 mL probówkach wirowych umieszczałam po 4 mL mieszniny Ficollu i Uropoliny (1:1) na, którą nawarstwiałam rozcieńczoną krew. Kolejno wirowałam 18 min. z szybkością 1800 rpm. Po tym czasie można zauważyć rozdział w probówkach na poszczególne frakcje. Limfocyty z monocytami tworzą „kożuszek” leukocytarny na granicy Ficollu i osocza. Kożuszek ostrożnie zbierałam i przepłukiwałam go dwukrotnie buforem PBS, wirując z szybkością 1500 rpm przez 5 min. Po zlaniu buforu, do komórek PBMC dodawałam 2 mL buforu lizującego (pH 7,4-7,5) i pozostawiałam w temperaturze pokojowej na 5 min. Po tym czasie nastąpiła liza erytrocytów, a bufor lizujący rozcieńczyłam PBS 1:1 i zwirowałam (1500 rpm. 5 min.). W zależności od wykonywanego testu komórki PBMC zawieszałam w medium hodowlanym otrzymując 10^6 komórek w 1mL, bądź pozostawiałam w PBS.

2.2.5. Przygotowanie rozcieńczeń analogów MPA

W celu przygotowania odpowiednich stężeń w ependorfie odważałam 1 mg związku i rozpuszczałam 20 μ L DMSO, a kolejno uzupełniałam pożywką do 1 mL, uzyskując stężenie 1 mg/mL. Kolejne stężenia przygotowałam metodą seryjnych rozcieńczeń, uzyskując najniższe badane stężenie 10^{-8} mg/mL w przypadku MPA i 10^{-5} w przypadku pochodnych MPA. Przy wykonywaniu powtórzeń za każdym razem rozpuszczałam 1 mg związku, unikając przechowywania związków w postaci roztworów.

2.2.6. Stosowane w badaniach testy

2.2.6.1. Test kolorymetryczny MTT

Linia komórkowa Jurkat

Komórki Jurkat przenosiłam z buteleczki hodowlanej do probówki wirowniczej, po czym wirowałam (1500 rpm. 5 min.) i usuwałam zużyta pożywkę. Komórki zawieszałam w medium hodowlanym i umieszczałam na 96-dołkowych, płaskodennych płytkach w ilości 50×10^3 komórek zawieszonych w 50 μ L na dołek. Kolejno do każdego dołka dodawałam odpowiednie rozcieńczenia związków w trzykrotnych powtórzeniach. Płytki inkubowałam w cieplarni (37°C, 5% CO₂). Po 48h inkubacji w każdym dołku umieszczałam 20 μ L roztworu MTT (5mg/ml H₂O). Następnie płytkę inkubowałam jeszcze 3h. Po kolejnej inkubacji do każdego dołka dodawałam 100 μ L zakwaszonego 0,4N HCl izopropanolu. Płytki wytrząsałam 15 min. w celu rozpuszczenia wytrąconych kryształków formazanu. Następnie przy pomocy spektrofotometru dokonywałam pomiaru intensywności zabarwienia przy długości fali 570 nm.

PBMC

Po wyizolowaniu komórek zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 2.2.4. Zawieszałam je w odpowiedniej ilości medium hodowlanego i umieszczałam na 96-

dołkowej płaskodennej płytce w ilości 50×10^3 komórek zawieszonych w 50 μL na dołek. Dodatkowo w przypadku komórek PBMC do każdego dołka dodawałam 1 μL monoklonalnych przeciwciał anti-CD3/anti-CD28. Następnie na płytkę dodawałam 50 μL związków w odpowiednio przygotowanych rozcieńczeniach w trzykrotnych powtórzeniach. Płytki inkubowałam 72h w cieplarni (37°C , 5% CO_2). Następnie do każdego dołka dodawałam 20 μL roztworu MTT i inkubowałam 3h. Kolejno zakwaszałam (0,4N HCl) izopropanolem i dokonywałam odczytu intensywności zabarwienia przy wykorzystaniu fali długości 570 nm. Test na komórkach PBMC wykonałam dla trzech różnych pacjentów, a wynik uśredniłam.

2.2.6.2. Test proliferacyjny z wykorzystaniem VPD450

2.2.6.2.1. Przygotowanie roztworu barwnika

Do barwnika VPD450 dodałam 1 mL DMSO, następnie dokładnie mieszałam (vortex). Rozpuszczony barwnik przenosiłam do probówki wirowniczej 15 mL, i dodawałam 1,63 mL DMSO oraz dokładnie mieszałam do całkowitego rozpuszczenia otrzymując 1 mM roztwór barwnika. Następnie przygotowywałam jednorazowe porcje roztworu barwnika po 2 μL na barwienie. Porcje z barwnikiem VPD450 przechowywałam w temperaturze -80°C , bez dostępu światła.

2.2.6.2.2. Barwienie komórek

$10\text{--}30 \times 10^6$ komórek zawieszałam w 1 mL PBS. Następnie dodawałam 2 μL wcześniej sporządzonego 1 mM roztworu barwnika. Komórki inkubowałam 15 min w kąpielii wodnej w temp 37°C . Kolejno komórki przepłukiwałam dziewięciokrotną (w stosunku do ilości w której zawieszono są komórki) ilością PBS i wirowałam. Nadsącz zlewałam a pelet komórkowy przepłukiwałam 10 mL medium hodowlanego i wirowałam. Pożywkę po płukaniu zlewałam. Przed nałożeniem komórek na płytki sprawdzałam stopień zabarwienia komórek za pomocą cytometru przepływowego.

Linia komórkowa Jurkat

Komórki Jurkat przenosiłam z buteleczki hodowlanej do probówki wirowniczej, po czym wirowałam (1500 rpm. 5 min.) i usuwałam zużytą pożywkę. Komórki Jurkat dwukrotnie przepłukiwałam za pomocą PBS. Następnie barwiłam komórki zgodnie z punktem 2.2.6.2.2. Komórki zawieszałam w medium hodowlanym i umieszczałam na 96-dołkowych, okrągłodennych płytkach w ilości 50×10^3 komórek zawieszonych w 50 μL na dołek. Kolejno do każdego dołka dodawałam odpowiednie rozcieńczenia związków w trzykrotnych powtórzeniach. Płytki inkubowałam w cieplarni (37°C , 5% CO_2). Po 48h inkubacji komórki wraz ze związkami przenosiłam z dołków do 5 mL probówek, przepłukując dołki za pomocą zimnego PBS. Następnie komórki wirowałam i zlewałam nadsącz. Pelet zawieszałam w 300 μL PBS, dokładnie mieszałam i analizowałam za pomocą cytometrii przepływowej.

PBMC

Po wyizolowaniu komórek zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 2.2.4.. Komórki PBMC zawieszałam w PBS i barwiłam zgodnie z opisem w punkcie 2.2.6.2.2.. Zabarwione komórki zawieszałam w odpowiedniej ilości medium hodowlanego i umieszczałam na 96-dółkowej okrągłodennej płytce w ilości 50×10^3 komórek zawieszonych w 50 μL na dołek. Dodatkowo w przypadku komórek PBMC do każdego dołka dodawałam 1 μL monoklonalnych przeciwciał anti-CD3/anti-CD28. Następnie na płytkę dodawałam 50 μL związków w odpowiednio przygotowanych rozcieńczeniach w trzykrotnych powtórzeniach. Płytki inkubowałam 72h w cieplarni (37°C , 5% CO_2). Po tym czasie komórki PBMC wraz ze związkami przenosiłam z dołków do 5 mL probówek, przepłukując dołki za pomocą zimnego PBS. Następnie komórki wirowałam i zlewałam nadsącz. Pozostałość zawieszałam w 300 μL PBS, dokładnie mieszałam i analizowałam za pomocą cytometrii przepływowej.

2.2.6.3. PBMC w obecności GMP

Test oznaczania aktywności antyproliferacyjnej wykorzystujący cytometrię przepływową wobec linii komórkowej PBMC w obecności GMP przeprowadziłam analogicznie, tak jak opisałam w punkcie 2.2.6.2.. Dodatkowo poza komórkami, związkiem i przeciwciałami do dołków dodałam roztwór GMP, w taki sposób aby stężenie GMP w każdym dołku wynosiło 50 μM .

2.3. Badania aktywności przeciwnowotworowej

2.3.1. Linie komórkowe

2.3.1.1. Czerniak Ab chomika Bomirskiego

Do badań wykorzystano komórki linii amelanotycznej (Ab), powstałej na skutek samorzutnej przemiany z formy melanotycznej (Ma) czerniaka przeszczepialnego chomika znanego pod nazwą - model czerniaka Bomirskiego. Stosowane w badaniach komórki czerniaka uzyskiwano z nowotworu według opracowanej wcześniej metody nieenzymatycznego uzyskiwania zawiesiny pojedynczych komórek. W tym celu z rozdrobnionej mechanicznie masy nowotworu komórki izolowano na Histopague 1077. Komórki czerniaka linii amelanotycznej izolowano po 10-12 dniach wzrostu nowotworu. Żywotność izolowanych komórek w każdym doświadczeniu określona była za pomocą testu z błękitem trypanu i wynosiła 80–95%. Komórki czerniaka inkubowano w odpowiedniej pożywce hodowlanej (RPMI 1640, 10% płodowa surowica cielęca inaktywowana termicznie, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycyny, 100 jednostek/mL penicyliny) w 37°C , w atmosferze 5% CO_2 .

2.3.1.2. Czerniak A375 człowieka

Komórki ludzkiego czerniaka amelanotycznego A375 (ATCC) hodowano w pożywce (DMEM HG, 10% płodowa surowica cielęca inaktywowana termicznie, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycyny, 100 jednostek/mL penicyliny) w 37°C , w atmosferze 5% CO_2 .



2.3.1.3. Neuroblastoma SHSY5Y człowieka

W doświadczeniach wykorzystano omórki ludzkiej neuroblastomy SHSY5Y (ATCC) między 10 a 25 pasażem. Komórki hodowano w pożywce (DMEM, 10% płodowa surowica cielęca inaktywowana termicznie, 50 µg/mL streptomycyny, 50 jednostek/mL penicyliny) w 37°C, w atmosferze 5% CO₂.

2.3.2. Związki referencyjne

Dakarbazylna i cisplatyna jako chemioterapeutyki stosowane w leczeniu czerniaka i neuroblastomy zostały wykorzystane jako referencyjne związki.

2.3.3. Przygotowanie związków do testów

Związki przygotowano w stężeniach : 0,1; 1; 10; 20; 40; 50; 100; 150 µM. Wszystkie rozcieńczenia badanych związków przygotowywano w pożywce, a wyjściowe stężenie w wodzie z 5% DMSO.

2.3.4. Test cytotoksyczności XTT

Komórki wysiewano na 96-dółkowe płytki w ilości 5x10³ na dołek w pożywce odpowiedniej dla danej linii. Po 24 godzinach pożywkę wymieniano i dodawano badane związki w przygotowanych wcześniej stężeniach: 0,1; 1; 10; 20; 40; 50; 100; 150 µM. Inkubację prowadzono w cieplarni (37°C, 5% CO₂) przez 48 i 72 godziny. Żywołność komórek określano przy użyciu testu XTT. Absorbancję pomarańczowego produktu mierzono przy pomocy spektrofotometru płytkowego (Multiscan FC, ThermoScientific) przy długości fali 450 nm. Miarą aktywności cytotoksycznej testowanego związku była wartość stężenia IC₅₀ (ang. inhibitory concentration) lub gdy nie można było wyznaczyć IC₅₀ miarą wpływu związku na komórki był odsetek komórek żywych potraktowanych 150 µM stężeniem (najwyższym badanym stężeniem).

2.4. Badania aktywności przeciwmikrobiologicznej

2.4.1. Szczepy bakteryjne

Otrzymane związki oceniano pod względem ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej *in vitro* przeciw *Staphylococcus aureus* MSSA ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300, *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (ESBL), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 oraz trzech klinicznych: *Staphylococcus aureus* MSSA, *Klebsiella pneumoniae* ESBL+ i *Klebsiella pneumoniae* ESBL-. Wszystkie szczepy bakteryjne były pasażowane w podłożu płynnym MHB i stałym MHA.

2.4.2. Związki referencyjne

Za antybiotyk referencyjny przyjęto ampicylinę i kanamycynę. W przypadku ampicyliny zakres stężenia wynosił od 256,0 do 0,125 µg/mL, dla kanamycyny od 1000,0 do 2,0 µg/mL.

2.4.3. Przygotowanie związków do testów

Związki **199, 200, 202, 203, 205, 273, 286 i 288** przygotowano w stężeniach od 256,0 µg/mL do 0,125 µg/mL, a **9, 201, 204, 206-211, 270-272, 274-276, 285, 287 i**

289-291 w stężeniach 3000,0 µg/mL do 5,9 µg/mL. Stężenia przygotowane były w wodzie z 6% DMSO. Serie rozcieńczonych związków były zamrożone i użyte tylko raz.

2.4.4. Oznaczanie minimalnego stężenia hamującego (MIC)

Wartości MIC zostały określone wykorzystując metodę mikrorozcieńczeń w MHB II i stosując 96-dołkowe mikro płytki z polistyrenu.

Hodowle bakteryjne z logarytmicznej fazy wzrostu rozcieńczono w pożywce w stosunku 1:1000, zawieszono i rozcieńczono 50-krotnie w soli fizjologicznej uzyskując 0,5 w skali Mc Farlanda. Na 96-dołkowych płytkach umieszczono 100 µL medium MHB Iii dodano po 100 µL odpowiednich rozcieńczeń związków i po 100 µL odpowiedniej zawiesiny bakteryjnej w ilości 10^4 komórek/1 mL. Inokulowane płytki inkubowano $35\pm 1^\circ\text{C}$ przez 18-20 godzin. Po tym czasie określono wartość MIC za pomocą spektrofotometru (PlateReader AF2200 UV/VIS i Fluorescence Microplate Reader from Eppendorf) OD600 oraz dokonano oceny wizualnej.

MIC mierzone technikami spektrofotometrycznymi określono jako najmniejsze stężenie związku, powyżej którego hamowanie wzrostu komórek bakteryjnych wyrażano jako MIC50 i MIC90 (odpowiednio 50% i 90% zatrzymania wzrostu bakteryjnego).

W celu potwierdzenia wyników wykorzystano również test z resazuryną. Resazurynę (10 µL 0,015% roztworu wodnego) dodano do każdego dołka. Próbki inkubowano w 37°C przez 2 h (bez dostępu światła) oraz zmierzono absorbancję i dokonano wizualnej oceny zmiany barwy w stosunku do kontroli. Najniższe stężenie, w którym nastąpiła zmiana barwy, określane jest jako wartość MIC.

PODSUMOWANIE

W ramach realizacji pracy doktorskiej przeprowadziłam syntezę 13 aminokwasowych i 14 peptydowych analogów kwasu mykofenolowego oraz oceniłam otrzymane związki pod względem aktywności immunosupresyjnej, przeciwnowotworowej i mikrobiologicznej. Zaprojektowane przeze mnie połączenie MPA z aminokwasami i peptydami zakładało zmniejszenie toksyczności kwasu mykofenolowego. Ponadto, sprawdziłam czy otrzymane związki mogą zwiększyć aktywność biologiczną MPA.

Zaprojektowałam i przeprowadziłam syntezę aminokwasowych analogów kwasu mykofenolowego zarówno w postaci estrów metylowych **199-205**, jak i z wolną grupą karboksylową **206-211** oraz syntezę tetra- **220, 229** i pentapeptydów **237-242, 250-255** a ponadto opracowałam syntezę koniugatów tych peptydów z cząsteczką MPA **270-276** i **285-291**.

Biorąc pod uwagę dane literaturowe [92], oraz wyniki przeprowadzonych eksperymentów, do syntezy koniugatów MPA z chlorowodorkami estrów aminokwasów tj.: HCl_xL-Asp(OCH₃)-OCH₃ **192**, HCl_xL-Thr-OCH₃ **193**, HCl_xD-Thr-OCH₃ **194**, HCl_xL-Ile-OCH₃ **195**, HCl_xL-Arg-OCH₃ **196**, HCl_xD-Arg-OCH₃ **197** i HCl_xMal-(OCH₃)₂ **198** wykorzystałam metodę EDCI/DMAP. W przypadku syntezy estru metylowego *N*-mykofenoilo-L-izoleucyny **202** wykorzystując procedurę EDCI/DMAP otrzymałam związek **202** z niską 15% wydajnością. Zastosowana metoda nie pozwoliła również na uzyskanie aminomalonowej pochodnej MPA **205**. Zmiana odczynnika kondensującego na T3P w tych dwóch przypadkach prowadziła do otrzymania produktów **202** i **205** z dobrą wydajnością. Następnie estry metylowe aminokwasowych analogów MPA **199-204** poddałam hydrolizie z wykorzystaniem wodorotlenku litu otrzymując związki **206-211**.

Syntezę tetrapeptydów: tuftsyny i retro-tuftsyny przeprowadziłam w oparciu o metodę mieszanych bezwodników opisaną w literaturze [185] [186] [187]. Metoda ta umożliwia uzyskanie peptydów z dobrą wydajnością przy jednoczesnym niskim stopniu racemizacji. Następnym etapem mojej pracy była synteza pentapeptydów, pochodnych tuftsyny **237-242** i retro-tuftsyny **250-255**, poprzez acylowanie grupy ε-aminowej lizyny, aminokwasami takimi jak: glicyna, α-alanina, β-alanina, walina, leucyna i izoleucyna. W celu acylowania grupy aminowej związku **230** i **249** odpowiednimi aminokwasami przetestowałam trzy metody: (a) metodę mieszanych bezwodników (chloromrówczan izobutyli); (b) środek kondensujący EDCI oraz (c) środek kondensujący EEDQ. Najlepsze rezultaty otrzymałam stosując procedurę mieszanych bezwodników z chloromrówczanem izobutyli i NMM. W celu utworzenia wiązania amidowego pomiędzy wszystkimi otrzymanymi przeze mnie tetra- i pentapeptydami, a cząsteczką MPA przetestowałam trzy odczynniki kondensujące takie jak: EEDQ, EDCI i T3P na modelach pochodnych tuftsyny **262** i retro-tuftsyny **277**, modyfikując ilość użytej zasady. Do syntezy koniugatów kwasu mykofenolowego z tuftsyną **262** i jej analogami **243-248** wybrałam metodę T3P/TEA. Natomiast do syntezy pochodnych MPA z retro-tuftsyną **277** i jej analogami **255-260** wybrałam

procedurę EDCI/DMAP. Procedury te pozwoliły mi na otrzymanie peptydowych koniugatów MPA **263-269** i **278-284** z bardzo dobrymi wydajnościami. Struktury i czystość wszystkich otrzymanych przeze mnie związków potwierdziłam metodami: ^1H NMR ^{13}C NMR, MS i MS-HPLC. Dodatkowo wybrane związki scharakteryzowałam za pomocą technik: COESY, HMBC, HSQC, ROESY i TOCSY.

Przeprowadziłam testy cytotoksyczności (MTT) i antyproliferacyjne (VPD450, cytometria przepływową) w celu wyselekcjonowania związków o korzystniejszych parametrach niż MPA. Badania wykonałam na limfoidalnej linii komórkowej T-Jurkat oraz mononuklearnych komórkach krwi obwodowej (PBMC). Otrzymane przeze mnie związki spełniły założenie i okazały się mniej toksyczne niż kwas mykofenolowy (PBMC). Jedynie cztery aminokwasowe pochodne **199**, **200**, **202** i **207** na linii komórkowej T-Jurkat wykazały większą toksyczność. Najmniejszą toksycznością zarówno w stosunku do linii komórkowej Jurkat, jak i komórek PBMC charakteryzowały się pochodne zawierające w swojej strukturze argininę (L i D) z wolną grupą karboksylową **210** i **211**. W przypadku testów na linii komórkowej T-Jurkat nie udało się wyznaczyć nawet wartości IC_{50} dla tych dwóch pochodnych. Największą cytotoksycznością w stosunku do obu typów badanych komórek odznaczył się związek MPA-L-Ile-OMe **202**. Analizując cytotoksyczność drugiej grupy otrzymanych związków wyraźnie widać, że wszystkie peptydowe analogi MPA są znacznie mniej toksyczne od kwasu mykofenolowego. W wielu przypadkach nie jest możliwe wyznaczenie wartości IC_{50} , w związku z czym obliczyłam żywotność komórek w obecności tych związków w najwyższym badanym stężeniu 1 mg/mL. Najmniejszą cytotoksycznością odznacza się pochodna MPA z tuftsyną **270**, której żywotność wynosi 85,82% w przypadku komórek T-Jurkat i 99,09% w przypadku komórek PBMC.

Po przeprowadzeniu testów aktywności antyproliferacyjnej stwierdziłam, że żaden z otrzymanych przeze mnie związków nie wykazał tak dobrego działania antyproliferacyjnego jak kwas mykofenolowy. Najbardziej aktywnymi związkami okazały się pochodne: **199**, **200**, **201**, **202** oraz **209** (T-Jurkat i PBMC). Pochodna MPA z izoleucyną zarówno w postaci estru metylowego **202** ($\text{EC}_{50} = 5,1207 \mu\text{M}$ dla PBMC) jak i po zasadowej hydrolizie **209** ($\text{EC}_{50} = 9,0962 \mu\text{M}$ dla PBMC) charakteryzuje się najniższą wartością EC_{50} co czyni ją najbardziej aktywną z pośród badanych analogów. Najmniejszą aktywność w stosunku do obu typów komórek wykazały związki: **206**, **210** i **211**. W przypadku peptydowych pochodnych MPA, najwyższą aktywnością charakteryzuje się związek **285**, którego wartość EC_{50} wynosi 663,9288 μM dla linii komórkowej T-Jurkat i 35,4258 μM dla komórek PBMC.

Cytotoksyczność oraz aktywność antyproliferacyjna aminokwasowych pochodnych zależy od struktury związków (ester metylowy / kwas) oraz od konfiguracji absolutnej aminokwasu. Analogi MPA zabezpieczone estrem metylowym są zdecydowanie bardziej aktywne od ich odpowiedników z wolną grupą karboksylową. Ponadto zauważyłam, że L-enancjomery wykazują większą aktywność niż enancjomery o konfiguracji D aminokwasu. Większość peptydowych pochodnych w całkowitym lub w wysokim stopniu niweluje działanie MPA. Uogólniając można również pokusić się

o stwierdzenie, że koniugaty MPA z retro-tuftsyną wykazują nieznacznie większą aktywność od tych z tuftsyną.

Wyznaczając współczynnik selektywności SI udało się wybrać trzy analogi o wyższej wartości SI niż MPA (SI = 4,63). Do związków tych należą pochodne MPA z treoniną o konfiguracji L i D w postaci estrów metylowych **200** i **201** (SI = 5,68 dla **200** i 7,33 dla **201**) oraz koniugat MPA z retro-tuftsyną **285** (SI = 17,89). Dwie peptydowe pochodne charakteryzują się współczynnikiem selektywności podobnym do kwasu mykofenolowego, są to koniugaty MPA z retro-tuftsyną modyfikowaną α -alaniną **287** i waliną **289**. Pomimo mniejszej aktywności antyproliferacyjnej wybranych związków, pochodne te odznaczyły się zdecydowanie niższą toksycznością. W związku z tym należało by użyć większej dawki leku aby osiągnąć ten samach efekt antyproliferujący co MPA.

Badania proliferacyjne z dodatkiem GMP, przeprowadzone na otrzymanych koniugatach MPA umożliwiły stwierdzenie, że otrzymane przeze mnie związki wykazują taki sam mechanizm działania jak kwas mykofenolowy co potwierdza ich aktywność inhibującą wobec IMPDH.

Aktywność biologiczną MPA **9**, a także otrzymanych wybranych aminokwasowych: **200**, **201**, **203**, **204**, **207**, **208**, **210** i **211** oraz peptydowych pochodnych **270** i **285** oceniano wobec komórek dwóch linii czerniaka amelanotycznego o różnym pochodzeniu: linia Ab czerniaka chomika Bomirskiego, linia A375 ludzkiego czerniaka oraz wobec komórek neuroblastomy SHSY5Y. Jako wzorce do badań zostały użyte dwa stosowane chemoterapeutyki: dakarbazyna oraz cisplatina.

Po przeprowadzeniu badań, można stwierdzić, że kwas mykofenolowy wykazuje znacznie wyższą aktywność w stosunku do komórek czerniaka i prawie taką samą aktywność w stosunku do komórek neuroblastomy jak powszechnie stosowane leki przeciwnowotworowe. Ponadto zauważyliśmy szybsze działanie MPA niż dakarbazyny na obu testowanych liniach komórkowych czerniaka. Analogi MPA **200** i **201** charakteryzowały się lepszą aktywnością w stosunku do linii komórkowej czerniaka chomika Bomirskiego, niż powszechnie stosowany chemoterapeutyk- dakarbazyna, Niestety linia komórkowa czerniaka ludzkiego A375 pozostaje oporna na działanie związków **200** i **201**, a dakarbazyna charakteryzuje się zdecydowanie większą cytotoxycznością. Związek MPA-L-Arg-(NO₂)-OH **210** powoduje zahamowanie aktywności mitochondriów w 50% na podobnym poziomie co stosowany chemoterapeutyk – dakarbazyna.

Podobnie jak w przypadku badań określających aktywność immunosupresyjną zauważyłam, że pochodne o konfiguracji L charakteryzują się wyższą aktywnością niż ich D odpowiedniki. W przypadku pochodnych zawierających w swojej strukturze treoninę, widoczna jest zdecydowana przewaga związków posiadających terminalną funkcję estru metylowego **200** i **201** w porównaniu do tych z wolną grupą karboksylową **207** i **208**, które to nie wykazały żadnej aktywności. Połączenie MPA z peptydami takimi jak tuftsyna **270** i retro-tuftsyna **285** pozwoliło na inhibicję aktywności komórek czerniaka Ab i neuroblastomy SHSYBY w około 30%.

W celu sprawdzenia aktywności mikrobiologicznej przeprowadzono testy antybakteryjne na sześciu szczepach referencyjnych: *Staphylococcus aureus* MSSA ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300, *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (ESBL), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 oraz trzech klinicznych: *Staphylococcus aureus* MSSA, *Klebsiella pneumoniae* ESBL+ i *Klebsiella pneumoniae* ESBL-. Jako kontrolę stosowano dwa konwencjonalne antybiotyki: ampicylinę lub kanamycynę.

Otrzymane przez mnie pochodne **199**, **200**, **202**, **203**, **205**, **273**, **286** i **288** odznaczały się największą aktywnością przeciw *S. aureus*, z wyróżnieniem większej wrażliwości szczepu MSSA niż MRSA. Analizując wyniki, można zauważyć, że analog **200** dla szczepu *S. aureus* MSSA, wykazuje zdecydowanie intensywniejszą inhibicję wzrostu w porównaniu ze związkami macierzystym MPA **9** oraz porównywalną do kanamycyny. W przypadku *K. pneumoniae* związki **203**, **273**, **286** i **288** charakteryzowały się zwiększonym działaniem przeciwbakteryjnym w porównaniu z macierzystym MPA oraz stosowanymi antybiotykami: kanamycyną i ampicyliną. Związek **205** porównywalnie hamował wzrost *K. pneumoniae* do ampicyliny.

Podobnie jak powyżej zauważam zależność aktywności aminokwasowych analogów MPA od konfiguracji stosowanego aminokwasu oraz funkcji karboksylowej (ester / wolna grupa karboksylowa). Pochodne o konfiguracji L wykazują zdecydowanie większą aktywność w stosunku do wszystkich badanych szczepów niż ich enancjomery o konfiguracji D. Ponadto hydroliza estrów metylowych znacznie zmieniła aktywność badanych związków. Zauważyłam ogromną przewagę pochodnych estrowych nad tymi, z wolną grupą karboksylową. Spowodowane może to być lepszą penetracją związku przez błony komórkowe z powodu niższej polarności [71]. W przypadku peptydowych analogów MPA, najkorzystniejsze wyniki otrzymano dla trzech pochodnych MPA połączonych z: tuftsyną modyfikowaną na grupie ε-aminowej β-alaniną **273** oraz retro-tuftsyną modyfikowaną na grupie ε-aminowej glicyną **286** i β-alaniną **288**.

Podsumowując badania biologiczne i mikrobiologiczne można stwierdzić, że na uwagę na pewno zasługuje ester metylowy *N*-mykofenoilo-L-treoniny **210**. Związek ten, w każdym przeprowadzonych badaniach wykazywał znaczącą aktywność biologiczną. Po przeanalizowaniu uzyskanych wyników można zauważyć, że wpływ na aktywność badanych związków ma konfiguracja aminokwasu jak również struktura funkcji karboksylowej (ester / kwas). Estery metylowe, jak i pochodne zawierające w swojej budowie aminokwasy o konfiguracji L charakteryzują się wyższą aktywnością biologiczną.

Jedynie cztery z pośród wszystkich badanych peptydowych analogów wykazały interesujące właściwości biologiczne tj.: pochodna MPA z retro-tuftsyną **285** (wyniki badań immunosupresyjnych) oraz analogi MPA z tuftsyną modyfikowaną na grupie ε-aminowej β-alaniną **273**, jak również retro-tuftsyną modyfikowaną na grupie ε-aminowej glicyną **286** i β-alaniną **288** (wyniki badań mikrobiologicznych). W większości przypadków peptydowe pochodne MPA z retro-tuftsyną wykazywały lepszą aktywność od analogów MPA zawierających w swojej strukturze cząsteczkę tuftsyny.

SUMMARY

Mycophenolic acid (MPA) and its two clinically used derivatives: mycophenolate sodium (MPS, CellCept) and mycophenolate mofetil (MMF, Myfortic) are one of the most commonly used drugs which inhibit lymphocyte proliferation. These immunosuppressants are used especially in case of transplantation of vascular organs such as the liver, heart and kidneys [25] [19] [26]. Mycophenolic acid has also been used in autoimmune diseases the treatment. MPA is a non-competitive and reversible inhibitor of inosine-5'-monophosphate dehydrogenase, mainly of isoform II, which is present in activated lymphocytes and tumor cells [33]. In addition to immunosuppressive activity, the pharmaceutical has antibacterial, antifungal, antiviral and anticancer properties. Unfortunately, the usage of these immunosuppressive agents is associated with risk of weakening the immune system, which can be manifested by many side effects (ie: bacterial, fungal, viral infections and digestive, genitourinary, circulatory and nervous disorders) [23]. The glucuronidation process is responsible for a number of side effects. As a result of this process two major metabolites are formed: pharmacologically inactive 7-*O*-glucuronide MPA (MPAG) and pharmacologically active acylated glucuronide (AcMPAG) [104] [105]. In order to increase the selectivity and reduce side effects of mycophenolic acid, scientists are trying to modify the structure of the MPA, which would allow to obtain a drug better tolerated by the organism. This situation is associated with lengthening and improving the quality of life of patients.

In my PhD thesis I designed and synthesized new, original chemical structures of amino acid and oligopeptide analogs of MPA. In order to obtain amino acid derivatives of mycophenolic acid, I formed an amide bond between the MPA molecule and amino acid ester such as: L-aspartic acid, L-threonine, D-threonine, L-isoleucine, L-arginine, D-arginine and aminomalonic acid. For the synthesis of this type of compounds I used condensing reagents, such as EDCI/DMAP and T3P/TEA. Then I carried out the hydrolysis of amino acid methyl esters of MPA derivatives using lithium hydroxide. Another group of compounds, which I synthesised were conjugates of oligopeptides and MPA. These analogs contained in their structure tetrapeptides such as tuftsin, retro-tuftsin and their modifications with an isopeptide bond on the ϵ -amino group of lysine with: glycine, α -alanine, β -alanine, valine, leucine and isoleucine. The synthesis of peptides: tuftsin and retro-tuftsin was based on the mixed anhydrides method described by Dzierzbicka and coworkers [185] [186] [187] using isobutyl chloroformate and NMM. For the conjugation of tetra- and pentapeptides with the MPA molecule I used coupling reagents such as: T3P/TEA (derivatives of tuftsin) and EDCI/DMAP (retro-tuftsin derivatives). I confirmed the structure and purity of all the compounds by ^1H NMR ^{13}C NMR, MS and MS-HPLC techniques. In addition, I characterized the selected compounds using the following techniques: COESY, HMBC, HSQC, ROESY and TOCSY.

I examined all obtained compounds in biological tests in vitro, including viability assay (MTT) and antiproliferative activity assay (VPD450, flow cytometry).

The biological test I conducted on the T-Jurkat lymphoidal cell line and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors. These tests allowed me to determine the IC₅₀ and EC₅₀ values and the selectivity index (SI), which served to compare the derivatives to MPA and to selection of compounds (**200**, **201** and **285**) which have the lowest toxicity and highest antiproliferative activity in the same time. I also did some tests confirming the selectivity of action of the compounds I obtained against IMPDH by antiproliferative activity assay (VPD450, flow cytometry) against PBMCs with the addition of guanosine-5'-monophosphate.

Anticancer activity of mycophenolic acid and several selected amino acids **200**, **201**, **203**, **204**, **207**, **208**, **210** and **211** and peptide analogs **270** and **285** of MPA were evaluated against two cancer cell lines of amelanotic melanoma: Ab Bomirski hamster melanoma, A375 human melanoma and SHSY5Y neuroblastoma. As reference compounds we used two chemotherapeutics: decarbaazine and cisplatin. We found that the parent compound MPA **9** shows better activity against cells of both amelanotic melanoma lines and particularly the same effect on neuroblastoma cell line compared to dacarbazine and cisplatin respectively, which are standard chemotherapeutics used in treatment of these malignancies. Among the tested novel amino acid analogs of MPA, considerable activities showed MPA-Thr-OMe **200**, MPA-D-Thr-OMe **201** and MPA-Arg(NO₂)-OH **210**.

We have also checked the antibacterial activity of the all synthesised compounds against six reference strains: *Staphylococcus aureus* MSSA ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300, *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (ESBL), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and three clinical strains: *Staphylococcus aureus* MSSA, *Klebsiella pneumoniae* ESBL + and *Klebsiella pneumoniae* ESBL-. Derivatives **199**, **200**, **202**, **203**, **205**, **273**, **286** and **288** were characterized by the highest activity against *S. aureus*, distinguishing the greater sensitivity of the MSSA strain than MRSA. In the case of *K. pneumoniae*, the compounds **203**, **273**, **286** and **288** were characterized by increased antibacterial activity compared to parental MPA and antibiotics: kanamycin and ampicillin.

Wyniki badań otrzymanych w ramach realizacji niniejszej pracy doktorskiej zostały opublikowane i były prezentowane na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych

A. Publikacje naukowe

1. Cholewiński G., Iwaszkiewicz-Grzes D., Prejs M., **Głowacka A.**, Dzierzbicka K., Synthesis of the inosine 5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) inhibitors. *J. Enz. Inhib. Med. Chem.*, **2015**, *30*, 550-563.
2. Gensicka M., **Głowacka A.**, Dzierzbicka K., Cholewiński G., Inhibitors of angiogenesis in cancer therapy – synthesis and biological activity. *Curr. Med. Chem.*, **2015**, *22*, 3830-3847.
3. **Siebert A.**, Gensicka M., Cholewinski G., Dzierzbicka K., Synthesis of Combretastatin A-4 analogs and its biological activity. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, **2016**, *16*(8), 942-960.
4. **Siebert A.**, Prejs M., Cholewinski G., Dzierzbicka K., New analogues of mycophenolic acid. *Mini-Reviews in Med. Chem.*, **2017**, *17*, 734-745.
5. **Siebert A.**, Gensicka M., Cholewinski G., Dzierzbicka K., Tuftsin-properties and analogs. *Curr. Med. Chem.*, **2017**, *24*, 3711-3727.

B. Publikacje oryginalne:

1. Prejs M., Cholewiński G., **Siebert A.**, Dzierzbicka K., Trzonkowski P., Synthesis and antiproliferative activity of novel conjugates of mycophenolic acid with adenosine. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **2016**, *18*, 1057-1062.
2. **Siebert A.**, Cholewiński G., Garwolińska D., Olejnik A., Rachoń J., Chojnacki J., Synthesis and structure investigation of a potential immunosuppressant N-mycophenoyl malonic acid dimethyl ester. *J. Mol. Struct.*, **2018**, *1151*, 218-222.
3. **Siebert A.**, Wysocka M., Krawczyk B., Cholewiński G., Rachoń J., Synthesis and antimicrobial activity of amino acid and peptide derivatives of mycophenolic acid. *Eur. J. Med. Chem.*, **2018**, *143*, 646-655.
4. Cholewiński G., Małachowska-Ugarte M., **Siebert A.**, Prejs M., Dzierzbicka K., Modifications of total synthesis of mycophenolic acid. *Curr. Chem. Lett.*, **2018**, *7*, 9-16.
5. **Siebert A.**, Deptuła M., Cichorek M., Ronowska A., Cholewiński G., Rachoń J., Synthesis of amino acid and peptide analogs of MPA and biological evaluation of their potential anticancer activity. *J. Asian Nat. Prod. Res.* – wysłana do recenzji.
6. **Siebert A.**, Wardowska A., Cholewiński G., Trzonkowski P., Rachoń J., Synthesis and immunosuppressive activity of novel conjugates of mycophenolic acid with amino acids and peptides – w przygotowaniu.

C. Udział w sympozjach i konferencjach naukowych:

1. **Głowacka A.**, Gensicka M., Cholewiński G., Dzierzbicka K., *Synteza oligopeptydów jako nośników związków biologicznie czynnych*, 58 Zjazd PTChem, Gdańsk, 21-25 Wrzesień 2015
2. Gensicka M., **Głowacka A.**, Dzierzbicka K., Cholewiński G., *Synteza fragmentów peptydowych nowych analogów heterocyklicznych*, 58 Zjazd PTChem, Gdańsk, 21-25 Wrzesień 2015
3. **Siebert A.**, *Oligopeptydowe pochodne retro-tuftsyny*, I Wielkopolskie Seminarium Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów, Poznań 5 Grudnia 2015, Str. 250.
4. **Siebert A.**, Garwolińska D., Cholewiński G., *Synteza i aktywność cytotoksyczna aminokwasowych analogów kwasu mykofenolowego*, Postępy Syntezy Organicznej, Gdańsk 23-25 Czerwca 2016, Str. 80
5. **Siebert A.**, Cholewiński G., Trzonkowski P., Dzierzbicka K., *Synthesis and cytotoxic activity of new conjugates of mycophenolic acid and peptides*, 17th Tetrahedron Symposium, Sitges, Hiszpania, 28 Czerwiec – 1 Lipiec 2016, P1.042.
6. **Siebert A.**, Cholewiński G., Trzonkowski P., Rachoń J., *Synthesis and biological research of amino acid analogues of mycophenolic acid*, 18th Tetrahedron Symposium, Budapeszt, Węgry 27 – 30 Czerwiec 2017, P3.33.
7. Prejs M., Dzierzbicka K., Cholewiński G., **Siebert A.**, Trzonkowski P., *New conjugates of mycophenolic acid and amino acids derivatives of adenosine as prospective immunosuppressive drugs*, 18th Tetrahedron Symposium, Budapeszt, Węgry 27 – 30 Czerwiec 2017, P3.31.
8. **Siebert A.**, Wysocka M., Cholewiński G., Krawczyk B., Rachoń J., *Synthesis and microbiological research of peptide analogues of mycophenolic acid*, 24th Polish Peptide Symposium, 3-7 Wrzesień 2017, P.72.
9. **Siebert A.**, Wysocka M., Cholewiński G., Krawczyk B., Rachoń J., *Aktywność mikrobiologiczna aminokwasowych analogów kwasu mykofenolowego*, BioMillenium, Gdańsk, Polska 6-8 Wrzesień 2017.

Bibliografia

- [1] E. Ograczyk, M. Kowalewicz-Kulbat, S. Wawrocki i M. Fol, „Immunosupresja - wymagający sprzymierzeniec na trudne czasy,” *Postępy Higieny Medycyny Doświadczalnej*, nr 69, pp. 1299-1312, **2015**.
- [2] K. Dzierzbicka, G. Cholewiński, D. Iwaszkiewicz-Grześ i P. Trzonkowski, „Poszukiwanie nowych leków immunosupresyjnych,” *Wiadomości chemiczne*, nr 65, pp. 59-92, **2011**.
- [3] M. Jarecka i P. Borowicz, „Terapeutyczne i rynkowe perspektywy rekombinowanych leków,” *Biotechnologia*, nr 4, pp. 7-27, **2005**.
- [4] A. Siebert, M. Prejs, G. Cholewiński i K. Dzierzbicka, „New Analogues of Mycophenolic Acid,” *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, nr 17, pp. 734-745, **2017**.
- [5] Z. S. Herman, Hormony, witaminy, leki: przeciwnowotworowe, immunosupresyjne, autakoidy, Warszawa: Wydawnictwo lekarskie PZWL, **2010**, pp. 181-187.
- [6] H. Feichttger, E. Wieland, V. W. Armstrong i M. Shipkova, „The acyl glucuronide metabolite of mycophenolic acid induces tubulin polymerization in vitro,” *Clinical Biochemistry*, nr 43, pp. 208-213, **2010**.
- [7] M. Shipkova, V. W. Armstrong, E. Wieland, P. D. Niedmann, E. Schultz, G. Brenner-Weiss, M. Voihsel, F. Braun i M. Oellerich, „Identification of glucoside and carboxy-linked glucuronide conjugates of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil,” *British Journal of Pharmacology*, nr 126, pp. 1075-1082, **1999**.
- [8] K. Dzierzbicka, „Synthesis of conjugates of muramyl dipeptide and nor-muramyl dipeptide with retro-tuftsins (Arg-Pro-Lys-ThrOMe) as potential immunostimulants,” *Polish Journal of Chemistry*, nr 78, pp. 409-416, **2004**.
- [9] K. Dzierzbicka, P. Sowiński i A. M. Kołodziejczyk, „Synthesis of analogues of anthraquinones linked to tuftsins or retro-tuftsins residues as potential topoisomerase inhibitors,” *Journal Peptide Science*, nr 12, pp. 670-678, **2006**.
- [10] K. Dzierzbicka, A. Wardowska, M. Rogalska i P. Trzonkowski, „New conjugates of muramyl dipeptide and nor-muramyl dipeptide linked to tuftsins and retro-tuftsins derivatives significantly influence their biological activity,” *Pharmacological Reports*, nr 64, pp. 217-223, **2012**.

- [11] M. W. Taylor, *Viruses and Man: A History of Interactions*, Springer International Publishing, **2014**, pp. 77-99.
- [12] K. Phelps i C. Hased, *Immune System: General Practice: The Integrative Approach*, Chatswood: Elsevier Health Science, **2012**, pp. 6-8.
- [13] G. J. Prendergest i E. M. Jaffee, *Cancer Immunotherapy Immune Suppression and Tumor Growth*, 2 red., San Diego: Academic Press, **2013**, pp. 14-24, 241-247.
- [14] J. R. Mackay i N. R. Rose, *The Autoimmune Diseases*, 5 red., San Diego: Academic Press, **2013**, pp. 3-9.
- [15] K. N. Mashini, „Fighting infection using immunomodulatory agents,” *Expert Opinion on Biological Therapy*, tom 1, pp. 641-653, **2005**.
- [16] B. Kaplan, G. J. Burkhart i F. G. Lakkis, *Immunotherapy in Trasplantation: Principles and Practice*, Chichester: John & Sons, **2012**, pp. 3-8.
- [17] J. P. Merrill, J. E. Murray, J. H. Harrison i W. R. Guild, „Successful homotransplantations of the human kidney between identical twins,” *Journal of the American Medical Association*, nr 160, pp. 277-282, **1956**.
- [18] J. Nielubowicz, Krótka historia pierwszych przeszczepów nerek. W: *Przeszczepianie nerek*, T. Orłowski, Red., Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, **1995**, pp. 9-14.
- [19] D. Górecki i A. Romaniuk, Immunologia transplantacyjna, w: Jakóbsiak M. (red.), *Immunologia*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, **1996**, pp. 619-631.
- [20] E. Murawska, M. Wilczyńska-Borawska i J. Zajkowska, „Transplantation-the ultimate method of treating and-stage organ failure,” *Journal of Public Health, Nursing and Medical Rescue*, nr 1, pp. 1-7, **2017**.
- [21] J. M. Grinyó, „Why Is Organ Transplantation Clinically Important?,” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, nr 3, pp. 1-10, **2013**.
- [22] R. Popat, „Organ transplantation - donation and surgery,” *Clinical Pharmacist*, nr 2, pp. 41-46, **2010**.
- [23] R. Moscalu, A. M. Smith i H. L. Sharma, „Diseases that can be cured only by organ donations,” *Archive of Clinical Cases*, nr 2, pp. 182-197, **2015**.
- [24] L. M. Villela i J. Bolanos-Meade, „Blood and Bone Marrow transplantation for Acute Myeloid Leukemia,” *Clinical Leukemia*, nr 3, pp. 11-21, **2009**.

- [25] C. Nabhan, J. Mehta i M. S. Tallman, „The role of bone marrow transplantation in acute promyelocytic leukemia,” *Bone Marrow Transplantation*, nr 28, pp. 219-226, **2001**.
- [26] B. Devauchelle, L. Badet , B. Lengele, E. Morelon, S. Testelin, M. Michallet, C. D'Hauthuille i J. M. Dubernard, „First human face allograft:early report,” *The Lancet*, nr 368, pp. 203-209, **2006**.
- [27] S. Schneeberger, M. Ninkovic, M. Gabi, M. Ninkovic , H. Hussl, M. Rieger, W. Loescher, B. Zelger, G. Brandache, H. Bonatti, T. Hauts, C. Boesmueller, H. Piza-Katzer i R. Margreiter, „First forearm transplantation: outcome at 3 years,” *American Journal of Transplantation*, nr 7, pp. 1753-1762, **2007**.
- [28] B. Dominguez-Gil, B. Mahillo, M. Alvarez i M. Carmona, „Newsletter transplant. International figures on donation and transplantation,” *European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare of the Council of Europe*, nr 22, p. 16, **2017**.
- [29] J. Bal, *Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, **2001**, pp. 181-212.
- [30] N. J. Sarma, V. Tiriveedhi, N. Angaswamy i T. Mohanakumar, „Role of antibodies to self-antigens in chronic allograft rejection: Potential mechanism and therapeutic implications,” *Human Immunology*, nr 73, pp. 1275-1281, **2012**.
- [31] M. Nowaczyk, *Podstawy Immunologii transplantacyjnej. Immunologiczny dobór dawców i biorców narządów unaczynionych. Transplantologia kliniczna. Skrypt dla studentów i lekarzy*, M. Durlik, A. Chmura, T. Bączkowska i A. Kwiatkowski , Redaktorzy, Warszawski Uniwersytet Medyczny, **2011**, pp. 63-69.
- [32] J. Sereno, B. Parada, P. Rodrigues-Santos, P. C. Lopes, E. Carvalho, H. Vala, E. Teixeira-Lemos, R. Alves, A. Figueiredo, A. Mota, F. Teixeira i F. Reis, „Serum and renal tissue markers of nephropathy in rats under immunosuppressive therapy cyclosporine versus sirolimus,” *Transplantation Proceedings*, nr 45, pp. 1149-1156, **2013**.
- [33] A. Siebert, M. Gensicka-Kowalewska, G. Cholewiński i K. Dzierzbicka, „Tuftsin - Properties and Analogs,” *Current Medicinal Chemistry*, nr 24, pp. 1-18, **2017**.
- [34] F. Ardesteni , S. S. Fatemi, B. Yakchali, S. M. Hosseini i G. Najafpour, „Evaluation of Mycophenolic Acid Production by *Penicillium bervillei* MUCL 19011 in Batch of Continuous Submerged Cultures,” *Biochemical Engineering Journal*, nr 50, pp. 99-103, **2010**.
- [35] G. Patel, M. D. Patil, S. Soni, T. P. Khobragade, Y. Chisti i U. C. Banerjee,

„Production of mycophenolic acid by *Penicillium brevicompactum*—A comparison of two methods of optimization,” *Biotechnology Reports*, nr 11, pp. 77-85, **2016**.

- [36] G. Gillot, J.-L. Jany, R. Dominguez-Santos, E. Poirier, S. Debaets, P. L. Hidalgo, R. V. Ullan, E. Coton i M. Coton, „Genetic basis for mycophenolic acid production and strain-dependent production variability in *Penicillium roqueforti*,” *Food Microbiology*, nr 62, pp. 239-250, **2017**.
- [37] R. Bentley, „Mycophenolic Acid: A One Hundred Year Odyssey from Antibiotic to Immunosuppressant,” *Chemical Reviews*, nr 100, pp. 3801-3825, **2000**.
- [38] J. H. Birkinshaw, H. Raistrick i D. J. Ross, „Studies in the Biochemistry of Microorganisms. The molecular constitution of the metabolic products of *Penicillium brevi-copactum* Dierckx and related species. Further observations on the structural formula for mycophenolic acid,” *Biochemical Journal*, nr 50, pp. 630-634, **1952**.
- [39] B. Kaplan, „Mycophenolic acid trough level monitoring in solid organ transplant recipients treated with mycophenolate mofetil: Association with clinical outcomes,” *Current Medical Research and Opinion*, nr 22, pp. 2355-2364, **2006**.
- [40] L. Ghio, M. Ferrareso, G. Zschelloc, L. Murere, F. Ginevrid, M. Belingheria, L. Peruzzie, F. Zanonf, F. Perfumod, L. Berardinellib, S. Tirelling, L. D. Strologoh, I. Fontanai, U. Valentei, M. Carilloj i A. Edefontia, „Longitudinal evaluation of mycophenolic acid pharmacokinetics in pediatric kidney transplant recipients. The role of post transplant clinical and therapeutic variables,” *Clinical Transplantation*, nr 23, pp. 264-270, **2009**.
- [41] J. Jablecki, L. Kaczmarzyk, D. Patrzalek, A. Domanasiewicz i Z. Boratyńska, „First Polish forearm transplantation report after 17 months,” *Transplantation Proceedings*, nr 41, pp. 549-553, **2009**.
- [42] M. Durlik i K. Zieniewicz, Zalecenia dotyczące leczenia immunosupresyjnego po przeszczepianiu narządów unaczynionocy, Warszawa: Fundacja Zjednoczeni dla Transplantacji, **2016**, pp. 20-22.
- [43] M. D. Sintchak i E. Nimmesgern, „The structure of inosine-5'-monophosphate dehydrogenase and the design of novel inhibitors,” *Immunopharmacology*, nr 47, pp. 163-184, **2000**.
- [44] J. J. Gu, A. K. tolin, J. Jain, H. Huang, L. Santiago i B. S. Mitchell, „Targeted disruption of the inosine 5'-monophosphate dehydrogenase type I gene in mice,” *Molecular and Cellular Biology*, nr 12, pp. 6702-6712, **2003**.

- [45] M. Dostalek, R. Y. Gohh i F. Akhlaghi, „Inosine Monophosphate Dehydrogenase Expression and Activity are Markedly Lower in Kidney Transplant Recipients with Diabetes Mellitus,” *Therapeutic Drug Monitoring*, nr 35, pp. 374-383, **2013**.
- [46] E. C. Thomas, J. H. Gunter, J. A. Webster, N. L. Schieber, V. Oorschot, R. G. Parton i J. P. Whitehead, „Different Characteristics and Nucleotide Binding Properties of Inosine Monophosphate Dehydrogenase (IMPDH) Isoforms,” *Plos*, nr 12, pp. 1-14, **2012**.
- [47] S. Bremer, R. Mandla, N. T. Vethe, I. Rasmussen, H. Rootwelt, P. D. Line, K. Midtvedt i S. Bergan, „Expression of IMPDH1 and IMPDH2 after transplantation and initiation of immunosuppression,” *Transplantation*, nr 85, pp. 55-61, **2008**.
- [48] C. R. Chong, D. Z. Qian, F. Pan, Y. Wei, R. Pili, D. J. Sullivan i J. O. Liu, „Identification of Type 1 Inosine Monophosphate Dehydrogenase as an Antiangiogenic Drug Target,” *Journal of Medicinal Chemistry*, nr 4, pp. 2677-2680, **2006**.
- [49] A. J. Ratcliffe, „Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase inhibitors for the treatment of autoimmune diseases,” *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, nr 9, pp. 595-605, **2006**.
- [50] L. Chen i K. W. Pankiewicz, „Recent development of IMP dehydrogenase inhibitors for the treatment of cancer,” *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, nr 10, pp. 403-412, **2007**.
- [51] V. Nair i Q. Shu, „Inosine Monophosphate Dehydrogenase (IMPDH) as a Probe in Antiviral Drug Discovery,” *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, nr 18, pp. 245-258, **2007**.
- [52] L. Hedstrom, „IMP dehydrogenase: structure, mechanism and inhibition,” *Chemical Reviews*, nr 109, pp. 2903-2928, **2009**.
- [53] J. A. Digitis i L. Hedstrom, „Species-Specific Inhibition of Inosine 5'-monophosphate Dehydrogenase by Mycophenolic Acid,” *Biochemistry*, nr 38, pp. 15388-15397, **1999**.
- [54] D. Iwaszkiewicz-Grzes, G. Cholewinski, A. Kot-Wasik, P. Trzonkowski i K. Dzierzbicka, „Investigations on the Immunosuppressive Activity of Derivatives of Mycophenolic Acid in Immature Dendritic Cells,” *International Immunopharmacology*, nr 44, pp. 137-142, **2017**.
- [55] A. Siebert, G. Cholewiński, D. Garwolińska, A. Olejnik, J. Rachoń i J. Chojnacki, „The synthesis and structure of a potential immunosuppressant: N-mycophenoyl malonic acid dimethyl ester,” *Journal of Molecular Structure*, nr 1151, pp. 218-

222, **2018**.

- [56] G. Cholewinski, D. Iwaszkiewicz-Grzes, M. Prejs, A. Glowacka i K. Dzierzbicka, „Synthesis of the inosine 5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) inhibitors,” *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, nr 30, pp. 550-563, **2015**.
- [57] A. Premaud, A. Rousseau, G. Johnson, C. Canivet, P. Gandia, F. Muscari, J. M. Peron, L. Rostain, P. Marquet i N. Kamar, „Inhibition of T-cell activation and proliferation by mycophenolic acid in patients awaiting liver transplantation: PK/PD relationships,” *Pharmacological Research*, nr 63, pp. 432-438, **2011**.
- [58] X. Hea, R. L. Smeets, H. Koenen, P. M. Vink, J. Wagennars, A. Boots i I. Joosten, „Mycophenolic Acid-Mediated Suppression of Human CD4+ T Cells: More Than Mere Guanine Nucleotide Deprivation,” *American Journal of Transplantation*, nr 11, pp. 439-449, **2011**.
- [59] Z. Chen, C. Zhang, H. Huang, Y. Song, X. Zhang, J. Ma, B. Wang, C. Zhang i J. Ju, „Penicacids A-C, three new mycophenolic acid derivatives and immunosuppressive activities from the marine-derived fungus *Penicillium* sp. SOF07,” *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, nr 22, pp. 3332-3335, **2012**.
- [60] F. Qiong-Ying, Y. Xia, L. Zheng-Hui, L. Yan, L. Ji-Kai, F. Tao i Z. Bao-Hua, „Mycophenolic acid derivatives from cultures of mushroom *Laetiporus sulphureus*,” *Chinese Journal of Natural Medicines*, nr 12, pp. 685-688, **2014**.
- [61] T. B. Requeira, K. R. Kildegaard, B. G. Hansen, U. H. Mortensen, C. Hertweck i J. Nielsen, „Molecular basis for mycophenolic acid biosynthesis in *Penicillium brevicompactum*,” *Applied and Environmental Microbiology*, nr 77, pp. 3035-1043, **2011**.
- [62] G. Cholewinski, M. Małachowska-Ugate i K. Dzierzbicka, „The Chemistry of Mycophenolic Acid - Synthesis and Modifications Towards Desired Biological Activity,” *Current Medicinal Chemistry*, nr 17, pp. 1926-1941, **2010**.
- [63] A. J. Birch i J. J. Wright, „A total synthesis of mycophenolic acid,” *Australian Journal of Chemistry*, nr 22, p. 2635, **1969**.
- [64] L. Canonica, B. Rindone, E. Santaniello i C. Scolastico, „A total synthesis of mycophenolic acid, some analogues and some biogenetic intermediates,” *Tetrahedron*, nr 28, pp. 4395-4404, **1972**.
- [65] R. L. Danheiser, S. K. Gee i J. J. Perez, „Total synthesis of mycophenolic acid,” *Journal of the American Chemical Society*, nr 108, pp. 806-810, **1986**.
- [66] J. W. Patterson, „The Synthesis of Mycophenolic Acid from 2,4-

- Dihydroxybenzoic Acid,” *The Journal of Organic Chemistry*, nr 60, pp. 4542-4548, **1995**.
- [67] R. A. de la Cruz, F. X. Talamas, A. Vazquez i J. M. Muchowski, „Total synthesis of mycophenolic acid,” *Canadian Journal of Chemistry*, nr 75, pp. 641-645, **1997**.
- [68] P. A. Ple, A. Hamon i G. Jones, „A convergent synthesis of Mycophenolic Acid,” *Tetrahedron*, nr 53, pp. 3395-3400, **1997**.
- [69] A. Covarrubias-Zuniga, A. Gonzales-Lucas i M. M. Dominguez, „Total synthesis of mycophenolic acid,” *Tetrahedron*, nr 39, p. 2881, **1998**.
- [70] A. Covarrubias-Zuniga, A. Gonzalez-Lucas i M. M. Dominguez, „Total synthesis of mycophenolic acid,” *tetrahedron*, nr 59, pp. 1989-1994, **2003**.
- [71] G. Cholewiński, M. Małachowska-Ugarte, A. Siebert, M. Prejs i K. Dzierzbicka, „Modification of total synthesis of mycophenolic acid,” *Current Chemistry Letters*, nr 7, **2018**.
- [72] P. A. Brookes, J. Cordes, A. J. White i A. G. Barrett, „Total Synthesis of Mycophenolic Acid by a Palladium-Catalyzed Decarboxylative Allylation and Biomimetic Aromatization Sequence,” *European Journal of Organic Chemistry*, nr 2013, pp. 7313-7319, **2013**.
- [73] K. Anderson, F. Calo, T. Pfaffender, A. White i A. Barrett, „Biomimetic Total Synthesis of Angelicoin A and B via a Palladium-Catalyzed Decarboxylative Prenylation-Aromatization Sequence,” *Organic Letters*, nr 13, pp. 5748-5750, **2011**.
- [74] E. P. Abraham, „The effect of mycophenolic acid on the growth of *Staphylococcus aureus* in the heart broth,” *Biochemical Journal*, nr 39, pp. 398-408, **1945**.
- [75] T. Huff i H. G. Kuball, „7-chloro-4,6-dimethoxy-1(3H)-isobenzofurane and Basidalin Antibiotic Secondary Metabolites from *Leucoagaricus carneifolia* Gillet (Basidiomycetes),” *Zeitschrift fur Naturforschung Online*, nr 49c, pp. 407-410, **1994**.
- [76] K. Felczak, R. Vince i K. W. Pankiewicz, „NAD-based inhibitors with anticancer potential,” *Bioorganic & Medicine Chemistry Letters*, nr 24, pp. 332-336, **2014**.
- [77] C. M. Robertson, L. L. Hermann i K. M. Coombs, „Mycophenolic acid inhibits avian reovirus replication,” *antiviral Research*, nr 64, pp. 55-61, **2004**.
- [78] C. Ying, E. D. Clercq i J. Neyts, „Ribavirin and mycophenolic acid potentiate the activity of guanine- and diaminopurine-based nucleoside analogues against

- hepatitis B virus,” *Antiviral Research*, nr 48, pp. 117-124, **2000**.
- [79] K.-W. Cheng, S.-C. Cheng, W.-Y. Chen, M.-H. Lin, S.-J. Chuang, I.-H. Cheng, C.-Y. Sun i C.-Y. Chou, „Thiopurine analogs and mycophenolic acid synergistically inhibit the papain-like protease of Middle East respiratory syndrome coronavirus,” *Antiviral Research*, nr 115, pp. 9-16. , **2015**.
- [80] M. S. Diamond, M. Zachariah i E. Harris, „Mycophenolic Acid Inhibits Dengue Infection by Preventing Replication of Viral RNA,” *Virology*, nr 304, pp. 211-221, **2002**.
- [81] Y. Yin, Y. Wang, W. Dand, L. Xu, J. Su, X. Zhou, W. Wang, K. Felczak, L. van der Laan, K. W. Pankiewicz, A. A. van der Eijk, M. Bijvelds, D. Sprengers, H. de Jonge, M. Koopmans, H. J. Metselaar, M. P. Peppelenbosch i P. Qiuwei, „Mycophenolic acid potently inhibits rotavirus infection with high barrier to resistance development,” *Antiviral Research*, nr 133, pp. 41-49, **2016**.
- [82] A. A. Rashad, J. Neyts, P. Leysen i P. A. Keller, „A reassessment of mycophenolic acid as a lead compound for the development of inhibitors of chikungunya virus replication,” *Tetrahedron*, nr XXX, pp. 1-13, **2017**.
- [83] J. Cho, H. Yi, E. Y. Jang, M.-S. Lee, J.-Y. Lee, C. Kang, C.-H. Lee i K. Kim, „Mycophenolic mofetil, an alternative antiviral and immunomodulator for the highly pathogenic avian influenza H5N1 virus infection,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, nr 494, pp. 298-304, **2017**.
- [84] D. N. Planterose, „Antiviral and Cytotoxic Effects of Mycophenolic Acid,” *Journal of General Virology*, nr 4, pp. 629-630, **1969**.
- [85] A. Mitsui i S. Suzuki, „Immunosuppressive Effect of Mycophenolic Acid,” *The Journal of Antibiotics*, nr 8, pp. 358-163, **1969**.
- [86] E. E. Hodge, „The role of mycophenolate mofetil in clinical renal transplantation,” *World journal of Urology*, nr 14, pp. 249-255, **1996**.
- [87] J. A. Yalowitz, K. Pankiewicz, S. E. Patterson i H. N. Jayaram, „Cytotoxicity and cellular differentiation activity of methylenebis(phosphonate) analogs of tiazofurin and mycophenolic acid adenine dinucleotide in human cancer cell lines,” *Cancer Letters*, nr 181, pp. 31-38, **2002**.
- [88] P. H. Nelson, S. F. Carr, B. H. Devens, E. M. Eugui, F. Franco, C. Gonzalez, R. C. Hawley, 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. M. Waltos, R. J. Weikert i J. C. Wu, „Structure-activity relationships for inhibition of inosine monophosphate dehydrogenase by nuclear variants of mycophenolic acid,”

Journal of Medicinal Chemistry, nr 11, pp. 4181-4196, **1996**.

- [89] S. Mitsuhashi, J. Takenaka, K. Iwamori, N. Nakajima i M. Ubakata, „Structure-activity relationships for inhibition of inosine monophosphate dehydrogenase and differentiation induction of K562 cells among the mycophenolic acid derivatives,” *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, nr 18, pp. 8106-8111, **2010**.
- [90] K. W. Pankiewicz, K. B. Lesiak-Watanabe, K. A. Watanabe, S. Patterson, H. N. Jayaram, J. A. Yalowitz, M. D. Miller, M. Seidman, A. Majumdar, G. Prehna i B. M. Goldstein, „Novel mycophenolic adenine bis(phosphonate) analogues as potential differentiation agents against human leukemia,” *Journal of Medicinal Chemistry*, nr 45, pp. 703-712, **2002**.
- [91] K. Felczak i K. W. Pankiewicz, „Rehab of NAD(P)-Dependent Enzymes with NAD(P)-Based Inhibitors,” *Current Medicinal Chemistry*, nr 18, pp. 1891-1908, **2011**.
- [92] N. Yang, Q. Wang, W. Wang, J. Wang, F. Li, S. Tan i M. Cheng, „The synthesis and in vitro immunosuppressive evaluation of novel isobenzofuran derivatives,” *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, nr 22, pp. 53-56, **2012**.
- [93] L. Chen, D. Wilson, H. N. Jayaram i K. W. Pankiewicz, „Dual inhibitors of IMP-dehydrogenase and histone deacetylases from cancer treatment,” *Journal of Medicinal Chemistry*, nr 50, pp. 6685-6691, **2007**.
- [94] K. Sunohara, S. Mitsuhashi, K. Shigetomi i M. Nakata, „Discovery of N-(2,3,5-triazoyl)mycophenolic amide and mycophenolic apoxyketone as novel inhibitors of human IMPDH,” *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, nr 23, pp. 5140-5144, **2013**.
- [95] M. Małachowska-Ugarte, G. Cholewiński, K. Dzierzbicka i P. Trzonkowski, „Synthesis and biological activity of novel mycophenolic acid conjugates containing nitro-acridine/acridone derivatives,” *European Journal of Medicinal Chemistry*, nr 54, pp. 197-201, **2012**.
- [96] G. Cholewiński, D. Iwaszkiewicz-Grześ, P. Trzonkowski i K. Dzierzbicka, „Synthesis and biological activity of ester derivatives of mycophenolic acid and acridines/acridones as potential immunosuppressive agents,” *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, nr 31, pp. 974-982, **2016**.
- [97] D. Iwaszkiewicz-Grześ, G. Cholewiński, A. Kot-Wasik, P. Trzonkowski i K. Dzierzbicka, „Synthesis and biological activity of mycophenolic acid-amino acid derivatives,” *European Journal of Medicinal Chemistry*, nr 69, pp. 863-871, **2013**.
- [98] H. Wu, J. Pagadala, C. R. Yates, D. Miller i R. I. Mahato, „Synthesis and

characterization of an anti-apoptotic immunosuppressive compound for improving the outcome of islet transplantation,” *Bioconjugate Chemistry*, nr 24, pp. 2036-2044, **2013**.

- [99] Y. Peng, Y. Dong i R. I. Mahato, „Synthesis and characterization of a novel mycophenolic acid-quinic acid conjugate serving as immunosuppressant with decreased toxicity,” *Molecular Pharmaceutics*, nr 12, pp. 4445-4453, **2015**.
- [100] X. Wang, Y. Lin, Y. Zeng, X. Sun, T. Gong i Z. Zhang, „Effects of mycophenolic acid-glucosamine conjugates on the base of kidney targeted drug delivery,” *International Journal of Pharmaceutics*, nr 456, pp. 223-234, **2013**.
- [101] A. C. Allison, „Mechanisms of action of mycophenolate mofetil in preventing chronic rejection,” *Transplantation Proceedings*, nr 34, pp. 2863-2866, **2002**.
- [102] L. Chen, „Mycophenolic acid analogs with modified metabolic profile,” *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, nr 16, pp. 9340-9345, **2008**.
- [103] K. G. Moder, „Mycophenolate mofetil: new applications for this immunosuppressant,” *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, nr 30, pp. 15-20, **2003**.
- [104] C. E. Staatz i S. E. Tett, „Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate on solid organ transplant recipients,” *Clinical Pharmacokinetics*, nr 46, pp. 13-58, **2007**.
- [105] P. H. Nelson, C. L. Gu, A. C. Allison, E. M. Eugui i W. A. Lee, „Morpholinoethylesters of mycophenolic acid and pharmaceutical compositions,” *Syntex, Patent US 4753935*, **1988**.
- [106] F. Schmidt, K. Eckardt, M. Shakibaei, P. Glander i R. Stahlmann, „Effects of mycophenolic acid alone and in combination with its metabolite mycophenolic acid glucuronide on rat embryos in vitro,” *Archives of Toxicology*, nr 87, pp. 361-370, **2012**.
- [107] M. R. Laftavi, F. Hai, H. Laftavi, L. Feng, M. Said, S. Patel, R. Kohli, M. Alnimri, M. Dayton i O. Pankiewicz, „Mycophenolic acid dose reductions result in poor long-term renal allograft survival comparison between mycophenolate sodium and mycophenolate mofetil,” *Transplantation Proceedings*, nr 43, pp. 478-481, **2011**.
- [108] S. E. Tett, F. Saint-Marcoux, C. E. Staatz, M. Brunet, A. A. Vinks, M. Miura, P. Marquet, D. R. Kuypers, T. Gelder i D. Cattaneo, „Mycophenolate, clinical pharmacokinetics, formulations, and methods for assessing drug exposure,” *Transplantation Reviews*, nr 25, pp. 47-57, **2011**.

- [109] A. El-Sheikh, J. Koenderink, A. Wouterrse, P. Van Den Broek, V. Verweij, R. Masereeuw i F. Russel, „Renal glucuronidation and multidrug resistance protein 2-/ multidrug resistance protein 4-mediated efflux of mycophenolic acid: interaction with cyclosporine and tacrolimus,” *Transplational Research*, nr 164, pp. 46-55, **2014**.
- [110] V. C. Cox i M. H. Ensom, „Mycophenolate mofetil for solid organ transplantation: does the evidence support the need for clinical pharmacokinetic monitoring?,” *Therapeutic Drug Monitoring*, nr 25, pp. 137-157, **2003**.
- [111] F. Schmid, K. Eckard, M. Shakibaei, P. Glander i R. Stahlmann, „Effects of mycophenolic acid alone and in combination with metabolite mycophenolic acid glucuronide on rat embryos in vitro,” *Archives of Toxicology*, nr 87, pp. 361-370, **2012**.
- [112] J. Kuhn, C. Prante, K. Kleesiek i C. Gotting, „Measurement of mycophenolic acid and its glucuronide using a novel rapid liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry assay,” *Clinical Biochemistry*, nr 42, pp. 83-90, **2009**.
- [113] N. Picard, D. Ratanasavanh, A. Premaud, Y. Le Meur i P. Marguet, „Identification of the UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in mycophenolic acid phase II metabolism,” *Drug Metabolism & Disposition*, nr 33, pp. 139-146, **2005**.
- [114] M. Dong, T. Fukuda i A. Vinks, „Optimization of Mycophenolic Acid Therapy Using Clinical Pharmacometrics,” *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, nr 29, pp. 4-11, **2014**.
- [115] F. M. Gonzalez-Roncero, M. A. Gentil, M. Brunet, G. Algarra, P. Pereira i M. Peralvo, „Pharmacokinetics of mycophenolic mofetil in kidney transplant patients with renal insufficiency,” *Transplantation Proceedings*, nr 37, pp. 3749-3751, **2005**.
- [116] S. D. Merrigan, E. Kish-Trier, J. C. Seegmiller i K. L. Johnson-Davis, „LC-MS/MS method for quantitation of mycophenolic acid, mycophenolic acid acyl-glucuronide, and 7-O-mycophenolic acid glucuronide in serum,” *Clinical Mass Spectrometry*, nr 3, pp. 41-48, **2017**.
- [117] G. N. Betonico, M. Abudd-Filbo, E. M. Goloni-Bertollo i E. Pavarino-Bertelli, „Pharmacogenetics of mycophenolate mofetil: a promising different approach to tailoring immunosuppression?,” *Journal of Nephrology*, nr 21, pp. 503-509, **2008**.
- [118] F. A. Elbarbry i A. S. Shoker, „Therapeutic drug measurement of mycophenolic acid derivatives in transplant patients,” *Clinical Biochemistry*, nr 40, pp. 752-764,

2007.

- [119] V. A. Najjar i K. Nishioka, „Tuftsin: a Natural Phagocytosis Stimulating Peptide,” *Nature*, tom 228, pp. 672-673, **1970**.
- [120] A. Wardowska, K. Dzierzbicka, P. Trzonkowski i A. Myśliwski, „Immunomodulatory properties of new conjugates of muramyl dipeptide and nor-muramyl dipeptide with retro-tuftsin (Arg-Pro-Lys-Thr-OMe),” *International Immunopharmacology*, nr 6, pp. 1560-1568, **2006**.
- [121] K. Dzierzbicka, P. Trzonkowski, P. Sewerynek, A. M. Kołodziejczyk i A. Myśliwski, „Synthesis and biological activity of tuftsin, its analogue and conjugates containing muramyl dipeptides or nor-muramyl dipeptides,” *Journal of Peptide Science*, nr 11, pp. 123-135, **2005**.
- [122] I. Z. Siemon i A. Kluczyk, „Tuftsin: on the 30-year anniversary of Victor Najjar's discovery,” *Peptides*, nr 20, pp. 645-674, **1999**.
- [123] F. Trevisani, E. Castelli, F. G. Foschi, M. Parazza, E. Loggi, M. Bertelli, C. Melotti, M. Domenicali, G. Zoli i M. Bernardi, „Impaired tuftsin activity in cirrhosis: relationship with splenic function and clinical outcome,” *Gut*, nr 50, pp. 707-712, **2002**.
- [124] Z. S. Herman, Z. Stachura, Ł. Opielka, I. Z. Siemon i E. Nawrocka, „Tuftsin and D-Arg3-tuftsin possess analgesic action,” *Experientia*, tom 37, pp. 76-77, 1981.
- [125] Z. Siemion, A. Kluczyk i M. Cebrat, „The peptide molecular links between the central nervous and the immune systems,” *Amino-Acids*, nr 29, pp. 161-176, **2005**.
- [126] M. Wu, J. C. Nissen, E. I. Chen i S. E. Tsirka, „Tuftsin Promotes an Anti-Inflammatory Switch and Attenuates Symptoms in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis,” *Plos one*, tom 7, pp. 1-13, **2012**.
- [127] J. Wang, A. D. Rogove i A. E. Tsirka, „Protective Role of tuftsin fragment 1-3 in an animal model of intracerebral hemorrhage,” *Annals of Neurology*, tom 54, pp. 655-664, **2003**.
- [128] E. Raibon, Y. Sauve, D. A. Carter i F. Gaillard, „Microglial changes accompanying the promotion of retinal ganglion cell axonal regeneration into peripheral nerve grafts,” *Journal of Neurocytology*, nr 31, pp. 57-71, **2002**.
- [129] N. Haspel, D. Zanury, R. Nussinov, T. Teesalu, E. Ruoslahti i C. Aleman, „Binding of a C-end rule peptide to the neuropilin-1 receptor: a molecular modeling approach,” *Biochemical Journal*, tom 50, pp. 1755-1762, **2011**.

- [130] J. C. Nissen, D. L. Selwood i S. E. Tsirka, „Tuftsin signal through its receptor neuropilin-1 via the transforming growth factor beta pathway,” *Journal of Neurochemistry*, tom 50, pp. 1755-1762, **2011**.
- [131] G. Mezo, A. Kalaszi, J. Remenyi, Z. Majer, A. Hilbert, O. Lang, L. Kohidal, K. Barna i F. Hudecz, „Synthesis conformation, and immunoreactivity of new carrier molecules based on repeated tuftsin-like sequence,” *Biopolymers*, tom 73, pp. 646-656, **2004**.
- [132] T. S. Pavlov i G. E. Samonina, „A new property of endogenous immunostimulator tuftsin,” *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, tom 138, pp. 163-164, **2004**.
- [133] K. Saravanabava, K. Nachimuthu i V. D. Padmanaban, „Effect of tuftsin on embryo vaccination with Newcastle disease virus vaccine,” *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, tom 28, pp. 269-276, **2005**.
- [134] M. Z. Siddiqui, A. K. Sharma i S. Kumar, „Solution conformation of tuftsin,” *International Journal of Biological Macromolecules*, nr 19, pp. 99-102, **1996**.
- [135] A. Kołodziejczyk, *Naturalne związki organiczne*, PWN: Warszawa, **2013**.
- [136] K. Gokulan, S. Khare i D. N. Rao, „Increase in the immunogenicity of HIV peptode antigens by chemical linkage to polytuftsin (TKPR40),” *DNA and Cell Biology*, tom 18, pp. 623-630, **1999**.
- [137] M. Fridkin, H. Tsubery, E. Tzeheval, A. Vonsover, L. Biondi, F. Filira i R. Rocchi, „Tuftsin-AZT conjugate: potential macrophage targeting for AIDS therapy,” *Journal of Peptide Science*, nr 11, pp. 37-44, **2005**.
- [138] X. Liu, J. Guo, S. Han, L. Yao, A. Chen, Q. Yang, H. Bo, P. Xu, J. Yin i Z. Zhang, „Enhanced immune response induced by a potential influenza A vaccine based on branched M2e polypeptides linked to tuftsin,” *Vaccine*, tom 30, pp. 6527-6533, **2012**.
- [139] Y. Tabata i Y. Ikada, „Biological functions of fullerene,” *Pure and Applied Chemistry*, tom 71, pp. 2047-2053, **1999**.
- [140] J. D. Zhu, Z. Q. Ji, J. Wang, R. H. Sun, X. Zhang i Y. Gao, „Tumor-inhibitory effect and immunomodulatory activity of fullerol C60(OH)_x,” *Small*, tom 4, pp. 1168-1175, **2008**.
- [141] Y. Xu, J. Zhu, K. Xiang, Y. Li, R. Sun, J. Ma, H. Sun i Y. Liu, „Synthesis and immunomodulatory activity of [60]fullerene-tuftsin conjugates,” *Biomaterials*, tom 32, pp. 9940-9949, **2011**.

- [142] M. Kukowska-Kaszuba, K. Dzierzbicka, M. Serocki i A. Składanowski, „Solid Phase Synthesis and Biological Activity of Tuftsin Conjugates,” *Journal of Medicinal Chemistry*, tom 54, pp. 2447-2454, **2011**.
- [143] W. Januchta, M. Serocki, K. Dzierzbicka, G. Cholewiński i A. Składanowski, „Synthesis of functionalized new conjugates of batracylin with tuftsin/retro-tuftsin derivatives and their biological evaluation,” *European Journal of Medicinal Chemistry*, nr 106, pp. 85-94, **2015**.
- [144] K. Bai, O. Lang, E. Orban, R. Szabo, L. Kohidal, F. Hudecz i G. Mezo, „Design, synthesis and in vitro activity of novel drug delivery systems containing tuftsin derivatives and methotrexate,” *Bioconjugate Chemistry*, nr 19, pp. 2260-2269, **2008**.
- [145] W. J. Liu, X. J. Liu, L. Li, Y. Li, S. H. Zhang i Y. S. Zhen, „Tuftsin based, EGFR-targeting fusion protein and its enediyne-energized analog show high antitumor efficacy associated with CD47 down-regulation,” *Cancer in Immunology and Immunotherapy*, tom 63, pp. 1261-1271, **2014**.
- [146] W. Yuan, G. Xia, C. Zhao, C. Sui i J. Ma, „Antiidiotypic single chain mimicking CA125 linked with tuftsin provides protective immunity against ovarian cancer in mice,” *Molecular Medicine Reports*, tom 5, pp. 388-394, **2012**.
- [147] D. Luo i J. Ma, „Enhancement of anti-idiotypic immune response by tuftsin in single chain Fv-tuftsin fusion protein,” *Biotechnology Letters*, tom 22, pp. 1925-1927, **2000**.
- [148] J. Feng, M. M. Meloni, S. M. Allan, S. Faulkner, J. Narvainen, R. Vidyasagar i R. Kauppinen, „Tuftsin derivatives of FITC, TbDOTA of Gd-DOTA as potential macrophage-specific imaging biomarkers,” *Contrast Media & Molecular Imaging*, tom 5, pp. 223-230, **2010**.
- [149] T. Kolomin, M. Shadrina, L. Andreeva, P. Slominsky, S. Limborska i N. Myasoedov, „Expression of inflammation-related genes in mouse spleen under tuftsin analog Selank,” *Regulatory Peptides*, tom 170, pp. 18-23, **2011**.
- [150] T. Bashi, M. Blank, D. B.-A. Shor, M. Fridkin, M. Versini, O. Gendelman, A. Volkov, I. Barshak i Y. Shoenfeld, „Successful modulation of murine lupus nephritis with tuftsin-phosphorylcholine,” *Journal of Autoimmunity*, tom 59, pp. 1-7, **2015**.
- [151] T. Bashi, O. Shovman, M. Fridkin, A. Volkov, I. Barshack, M. Blank i Y. Shoenfeld, „Novel therapeutic compound tuftsin-phosphorylcholine attenuates collagen-induced arthritis,” *Clinical & Experimental Immunology*, nr 184, pp. 19-

28, **2016**.

- [152] D. B. Shor, T. Bashi, J. Lachnisch, M. Fridkin, G. Bizzaro, I. Barshak, M. Blank i Y. Shoenfeld, „Phosphorylcholine-tuftsins compound prevents development of dextran sulfate-sodium-salt induced murine colitis: Implications for the treatment of human inflammatory bowel disease,” *Journal of Autoimmunity*, tom 56, pp. 111-117, **2015**.
- [153] H. Ben-Amram, T. Bashi, N. Werbner, H. Neuman, M. Fridkin, M. Blank, Y. Shoenfeld i O. Koren, „Tuftsins-Phosphorylcholine Maintains Normal Gut Microbiota in Collagen Induced Arthritic Mice,” *Frontiers in Microbiology*, tom 10, nr 8, p. 1222, **2017**.
- [154] M. Maślińska, F. de Luca i K. Sharif, „Tuftsins-phosphorylcholine treatment of autoimmune diseases – a benefit and a message from helminths?,” *Reumatologia*, tom 55, nr 6, pp. 267-268, **2017**.
- [155] Y. An, L. Li, D. Yang, N. Jia, C. Xu, Q. Wang, S. Wang i S. Yuan, „Anticancer activity of tuftsins-derived T peptide in postoperative residual tumors,” *Anticancer Drugs*, nr 25, pp. 857-867, **2014**.
- [156] Y.-L. Gao, Y.-F. Chai, N. Dong, S. Han, X.-M. Zhu, Q.-H. Zhang i Y.-M. Yao, „Tuftsins-derived T-peptide prevents cellular immunosuppression and improves survival rate in septic mice,” *Scientific Reports*, tom 5, p. 16725, **2015**.
- [157] A. Wardowska, K. Dzierzbicka, M. Szaryńska, M. Dąbrowska-Szponar, K. Wiśniewska, A. Myśliwski i P. Trzonkowski, „Analogues of muramyl dipeptide (MDP) and tuftsins limit infection and inflammation in murine model of sepsis,” *Vaccine*, tom 27, pp. 369-374, **2009**.
- [158] A. Wardowska, K. Dzierzbicka, A. Menderska i P. Trzonkowski, „New Conjugates of Tuftsins and Muramyl Dipeptide as Stimulators of Human Monocyte-derived Dendritic Cells,” *Protein & Peptide Letters*, tom 20, pp. 200-204, **2013**.
- [159] M. A. Khan, A. Aljarbou, A. Khan i M. Owais, „Immune stimulating and therapeutic potential of tuftsins-incorporated nystatin liposomes against *Cryptococcus neoformans* in leukopenic BALB/C mice,” *Medicinal Microbiology and Immunology*, tom 66, pp. 88-87, **2012**.
- [160] C. M. Gupta i W. Haq, „Tuftsins-Bearing Liposomes as Antibiotic Carriers in Treatment of Macrophage Infections,” *Methods in Enzymology*, nr 391, pp. 291-301, **2005**.
- [161] A. K. Agrawal, A. Agrawal, A. Pal, P. Y. Guru i C. M. Gupta, „Superior

chemotherapeutic efficacy of amphotericin B in tuftsin-bearing liposomes against *Leishmania donovani* infections in hamsters,” *Journal of Drug Targeting*, tom 10, pp. 41-45, **2002**.

- [162] E. Valeur i M. Bradley, „Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents,” *Chemical Society Reviews*, tom 38, pp. 606-631, **2009**.
- [163] J. C. Sheehan i G. P. Hess, „A New Method of Forming Peptide Bonds,” *Journal of the American Chemical Society*, tom 77, pp. 1067-1068, **1955**.
- [164] G. W. Anderson, J. E. Zimmerman i F. M. Callahan, „The Use of Esters of N-Hydroxysuccinimide in Peptide Synthesis,” *Journal of the American Chemical Society*, tom 86, pp. 1839-1842, **1964**.
- [165] I. Schon i L. Kisfaludy, „9-Fluorenylmethyl Pentafluorophenyl Carbonate as a Useful Reagent for the Preparation of N-9-Fluorenylmethyloxycarbonylamino Acids and their Pentafluorophenyl Esters,” *Synthesis*, tom 4, pp. 303-305, **1986**.
- [166] C. A. G. N. Montalbetti i V. Falque, „Amide bond formation and peptide coupling,” *Tetrahedron*, tom 61, pp. 10827-10852, **2005**.
- [167] A. Williams i I. T. Ibrahim, „Carbodiimide chemistry: recent advances,” *Chemical Reviews*, tom 81, pp. 589-636, **1981**.
- [168] L. A. Carpino i A. El-Faham, „The diisopropylcarbodiimide/1-hydroxy-7-azabenzotriazole system: Segment coupling and stepwise peptide assembly,” *Tetrahedron*, tom 55, pp. 6813-6830, **1999**.
- [169] T. I. Al-Warhi, H. M. Al-Hazimi i A. El-Faham, „Recent development in peptide coupling reagents,” *Journal of Saudi Chemical Society*, tom 16, pp. 97-116, **2012**.
- [170] K. Dzierzbicka, G. Cholewiński i J. Rachoń, *Chemia organiczna dla zainteresowanych*, Gdańsk: Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, **2016**, p. 38.
- [171] W. König i R. Geiger, „A new method for synthesis of peptides: activation of the carboxyl group with dicyclohexylcarbodiimide using 1-hydroxybenzotriazoles as additives,” *Chemische Berichte*, tom 103, pp. 788-798, **1970**.
- [172] L. A. Carpino, H. Imazumi, B. M. Foxman, M. J. Vela, P. Henklein, A. El-Faham, J. Klose i M. Bienert, „Comparison of the effects of 5- and 6-HOAt on model peptide coupling reactions relative to the cases for the 4- and 7-Isomers,” *Organic Letters*, tom 2, pp. 2253-2256, **2000**.
- [173] S. S. Wang, J. P. Tam, B. S. Wang i R. B. Merrifield, „Enhancement of peptide coupling reactions by 4-dimethylaminopyridine,” *International Journal of Peptide*

Research and Therapeutics, tom 18, pp. 459-467, **1981**.

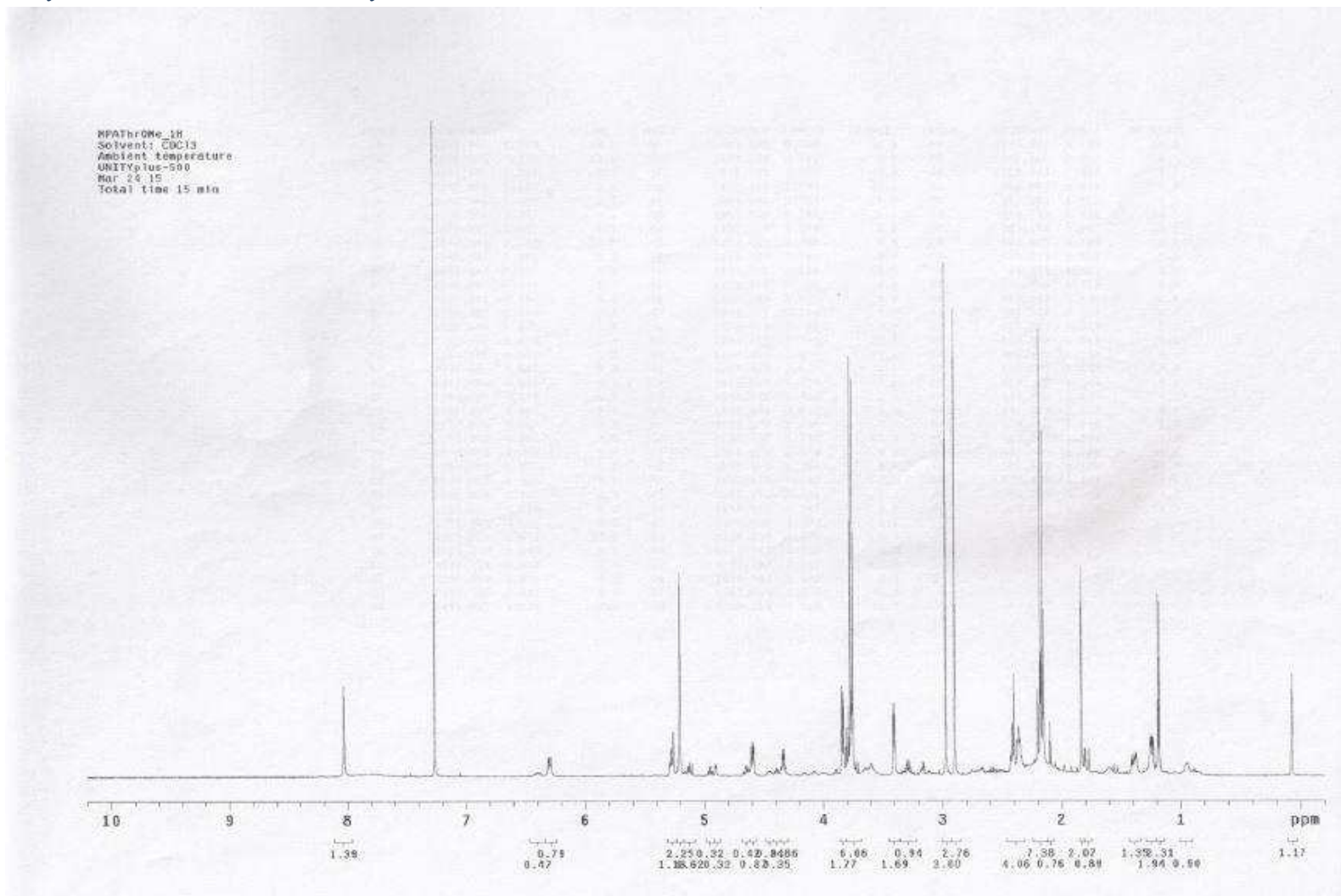
- [174] C. Gondal, „4-Dimethylamino-pyridine (DMAP),” *Synlett*, tom 10, pp. 1568-1569, **2003**.
- [175] J.-A. Fehrentz i B. Castro, „An Efficient Synthesis of Optically Active α -(t-Butoxycarbonylamino)-aldehydes from α -Amino Acids,” *Synthesis*, nr 1983, pp. 676-678, **1983**.
- [176] A. Wahhab i J. Leban, „A simple procedure for the solid phase synthesis of unsymmetrically functionalised diamides from symmetric diacids,” *Tetrahedron Letters*, tom 40, pp. 235-238, **1999**.
- [177] J. Martinez, J. P. Bali, M. Rodriguez, B. Castro, R. Magous, J. Laur i M. F. Lignon, „Synthesis and biological activities of some pseudo-peptide analogs of tetragastrin: the importance of the peptide backbone,” *Journal of Medicinal Chemistry*, tom 28, pp. 1874-1879, **1985**.
- [178] J. Coste, D. Le-Nguyen i B. Castro, „PyBOP®: A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product,” *Tetrahedron Letters*, nr 31, pp. 205-208, **1990**.
- [179] R. Subrirós-Funosas, A. El-Faham i F. Albericio, „PyOxP and PyOxB: the Oxyma-based novel family of phosphonium salts,” *Organic & Biomolecular Chemistry*, tom 8, pp. 3665-3673, **2010**.
- [180] O. Marder, Y. Shvo i F. Albericio, „HCTU and TCTU. New coupling reagents: Development and industrial aspects,” *Chimica Oggi – Chemistry Today*, nr 20, pp. 37-42, **2002**.
- [181] A. El-Faham i F. Albericio, „Morpholine-based immonium and halogenoamidinium salts as coupling reagents in Peptide synthesis,” *Journal of Organic Chemistry*, nr 73, pp. 2731-2737, **2008**.
- [182] A. El-Faham i F. Albericio, „Morpholine-Based Immonium and Halogenoamidinium Salts as Coupling Reagents in Peptide Synthesis,” *The Journal of Organic Chemistry*, nr 73, pp. 2731-2737, **2008**.
- [183] J.-A. K. Twibanire i T. B. Grindley, „Efficient and Controllably Selective Preparation of Esters Using Uronium-Based Coupling Agents,” *Organic Letters*, nr 13, pp. 2988-2991, **2011**.
- [184] B. Belleau i G. Malek, „New convenient reagent for peptide syntheses,” *Journal of the American Chemical Society*, nr 90, pp. 1651-1652, **1968**.
- [185] M. H. Hyun, M. H. Kang i S. C. Han, „Use of 2-ethoxy-1-(ethoxycarbonyl)-1, 2-dihydroquinoline as a convenient reagent for the selective protection or

- derivatization of 2-hydroxycarboxylic acids,” *Tetrahedron Letters*, nr 40, pp. 3435-3438, **1999**.
- [186] G. Nagendra, C. Madhu, T. M. Vishwanatha i V. V. Sureshbabu, „An expedient route for the reduction of carboxylic acids to alcohols employing 1-propanephosphonic acid cyclic anhydride as acid activator,” *Tetrahedron Letters*, nr 53, pp. 5059-5063, **2012**.
- [187] J. R. Dunetz, Y. Xiang, A. Baldwin i J. Ringling, „General and Scalable Amide Bond Formation with Epimerization-Prone Substrates Using T3P and Pyridine,” *Organic Letters*, tom 13, pp. 5048-5051, **2011**.
- [188] J. Brandao, R. Blair, A. Kelly, N. Fowlkes, K. Shiomitsu, F. E. Ghomes, G. Rich i T. N. Tully, „Amelanotic Melanoma in the Rabbit: A Case Report With an Overview of Immunohistochemical Characterization,” *Journal of Exotic Pet Medicine*, nr 24, pp. 193-200, **2015**.
- [189] R. Verma, K. P. Lokesh, K. Gupta i N. K. Panda, „Sinonasal amelanotic malignant melanoma-A diagnostic dilemma,” *Egyptian Journal of Ear, Nose, Throat and Allied Sciences*, nr16, pp. 275-278, **2015**.
- [190] A. Djougarian i S. Kodsi, „Hypertensive retinopathy as the initial presentation of neuroblastoma,” *American Journal of Ophthalmology Case Reports*, tom 7, pp. 123-125, **2017**.
- [191] D. Mullassery i P. D. Losty, „Neuroblastoma,” *Paediatrics and Child Health*, nr 26, pp. 68-72, **2016**.
- [192] L. Serrone, M. Zeuli, F. M. Sega i F. Cognetti, „Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty-year experience overview,” *Journal of experimental & clinical cancer research*, nr 19, pp. 21-34, **2000**.
- [193] S. Bhatia, S. S. Tykodi i J. A. Thompson, „Treatment of metastatic melanoma an overview,” *Oncology*, nr 23, pp. 488-496, **2009**.
- [194] A. Rueda Dominguez, A. Marquez, J. Guma, M. Llanos, J. Herrero, M. A. de Las Nieves, J. Miramon i E. Alba, „Treatment of stage I and II Hodgkin's lymphoma with ABVD chemotherapy: results after 7 years of a prospective study,” *Annals of Oncology*, tom 15, pp. 1798-17804, **2004**.
- [195] A. Elias, L. Ryan, J. Aisner i K. H. Antman, „Mesna, dexamethasone, ifosfamide, dacarbazine (MAID) regimen for adults with advanced sarcoma,” *Seminars in oncology*, tom 17, pp. 41-49, **1990**.
- [196] M. L. Pearl, M. Inagami, D. L. McCauley, F. A. Valea, E. Chalas i M. Fischer,

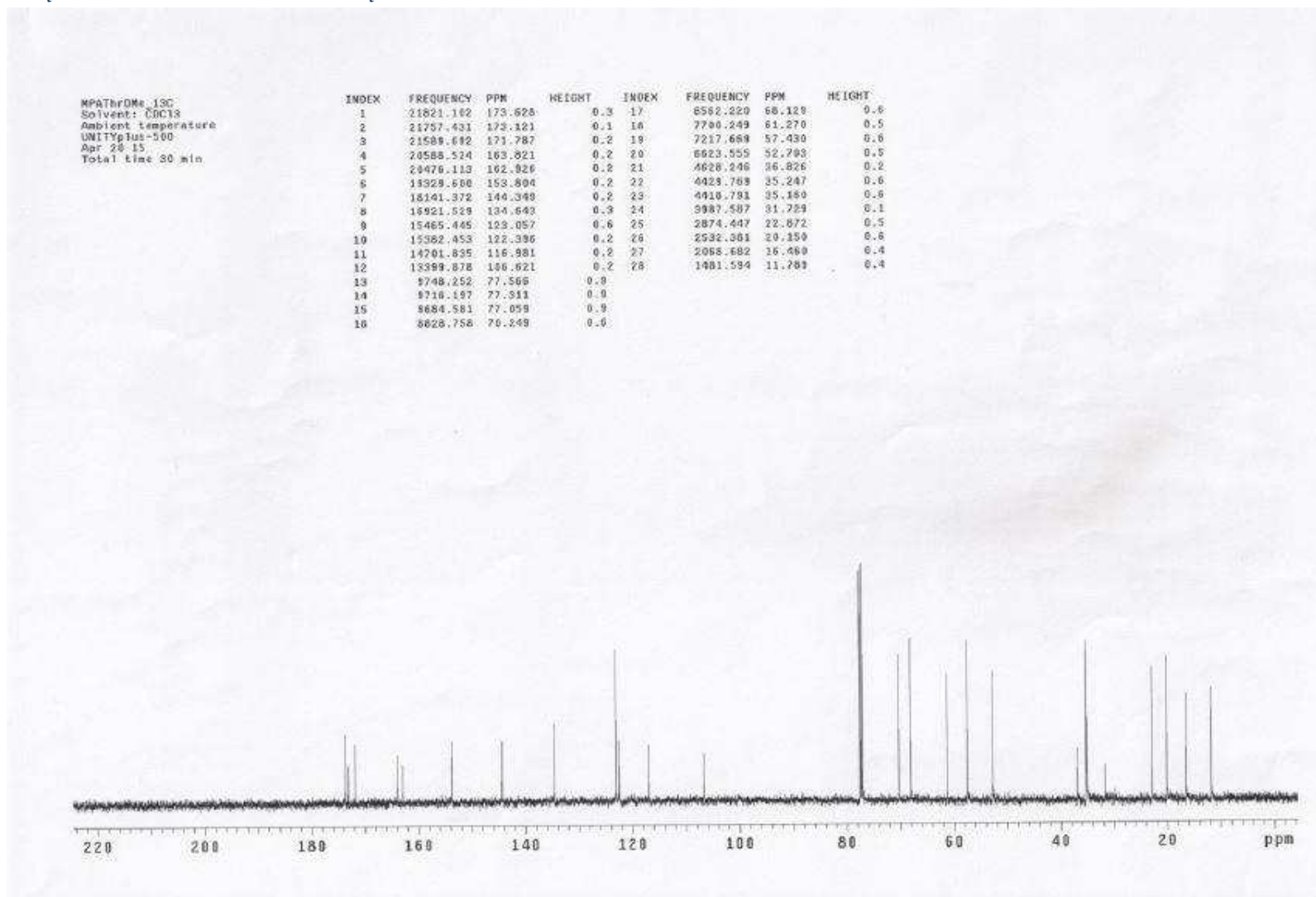
„Mesna, doxorubicin, ifosfamide and dacarbazine (MAID) chemotherapy for gynecological sarcomas,” *International Journal of Gynecological Cancer*, tom 12, pp. 745-748, **2001**.

- [197] O. Rabbab i E. Rowan, „Cisplatin induced arrhythmia; electrolyte imbalance or disturbance of the SA node?,” *European Journal of Pharmacology*, nr 811, pp. 125-128, **2017**.
- [198] J. Campbell, „High-throughput assessment of bacterial growth inhibition by optical density measurements,” *Current Protocols in Chemical Biology*, nr 3, pp. 100-115, **2011**.
- [199] S. Kolarevic, D. Milovanović, M. Avdović i B. Vuković-Gaćić, „Optimisation of the microdilution method for detection of minimum inhibitory concentration values in selected bacteria,” *Botanica Serbica*, tom 40, nr 1, pp. 29-36, **2016**.
- [200] M. Elshikh, S. Ahmed, S. Funston, P. Dunlop, M. McGaw, R. Marchant i I. Banat, „Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants,” *Biotechnology Letters*, tom 38, nr 6, pp. 1015-1019, **2016**.

Załącznik 1. Widmo ^1H NMR związku MPA-L-Thr-OMe 200

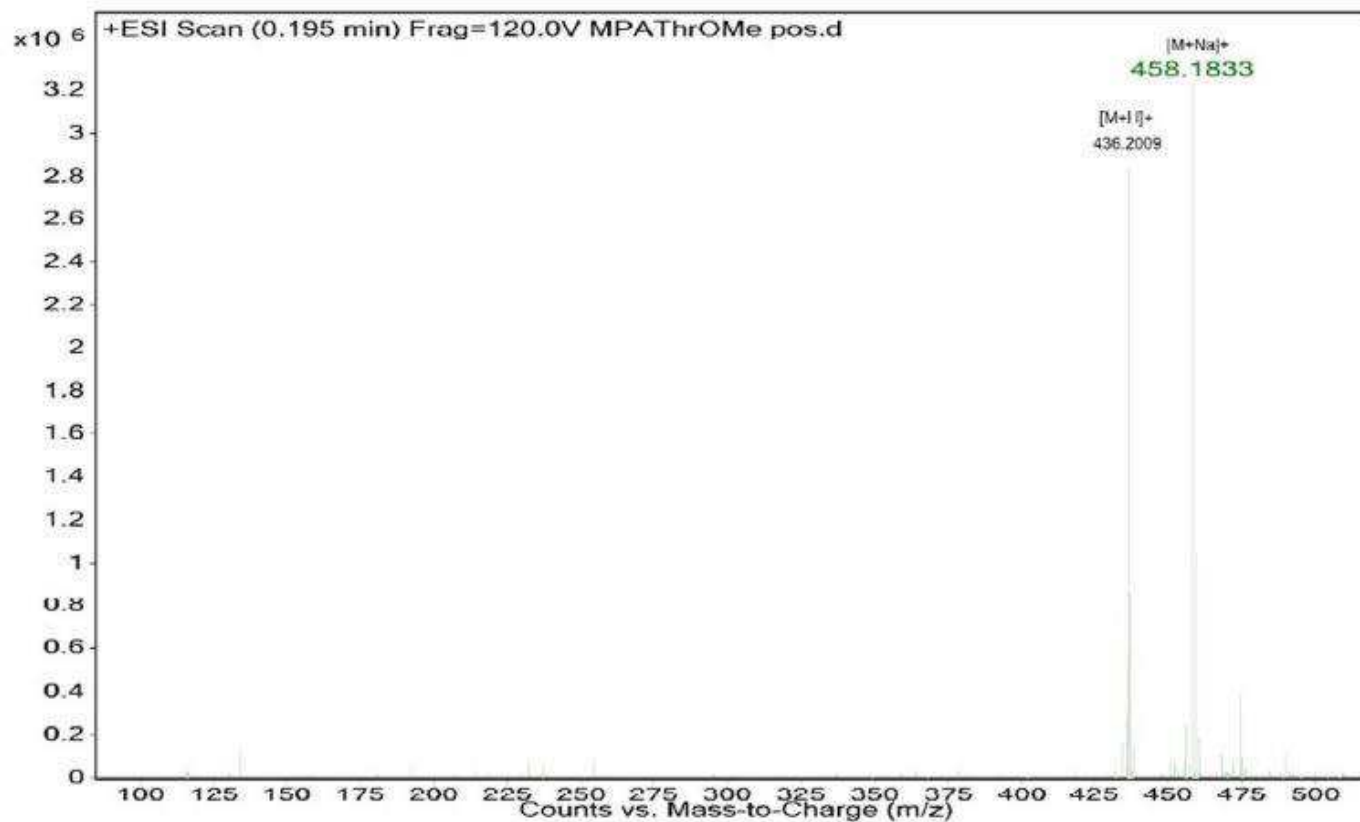


Załącznik 2. Widmo ^{13}C NMR związku MPA-L-Thr-OMe 200

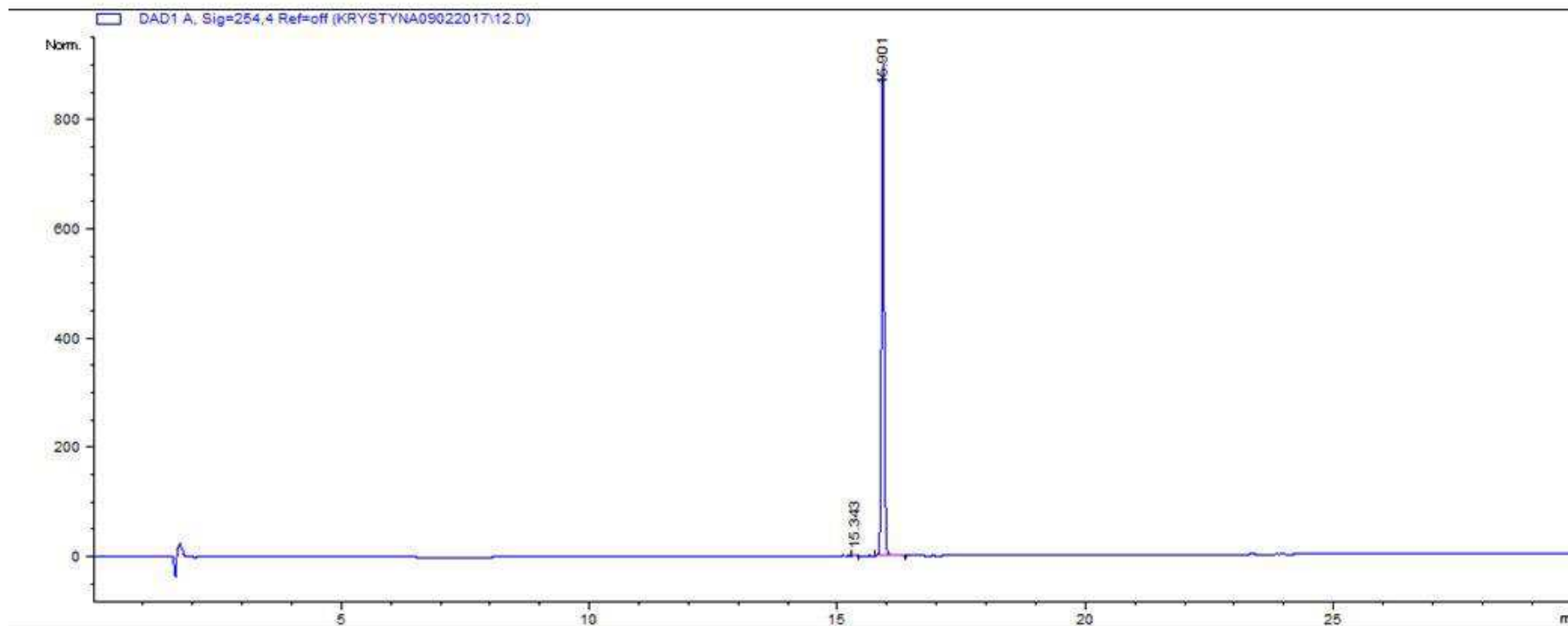


Załącznik 3. Widmo MS związku MPA-L-Thr-OMe 200

Sample Name	MPATHrOMe pos	Position	P1-A9	Instrument Name	Instrument 1	User Name	PK
Inj Vol	10	InjPosition		SampleType	Sample	IRM Calibration Status	All Ions Missed
Data Filename	MPATHrOMe pos.d	ACQ Method		Comment		Acquired Time	6/19/2015 2:05:51 PM

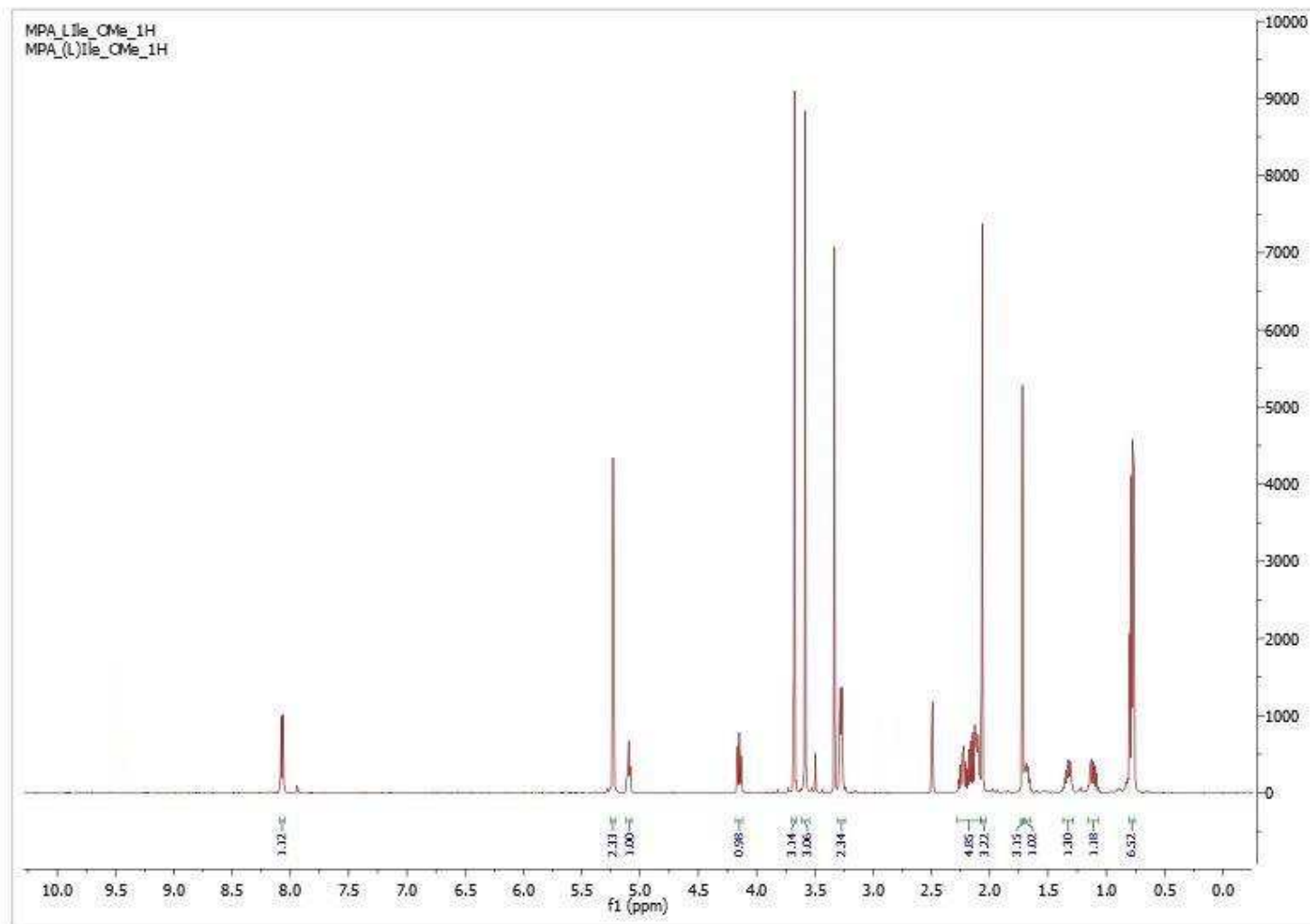


Załącznik 4. Chromatogram związku MPA-L-Thr-OMe 200

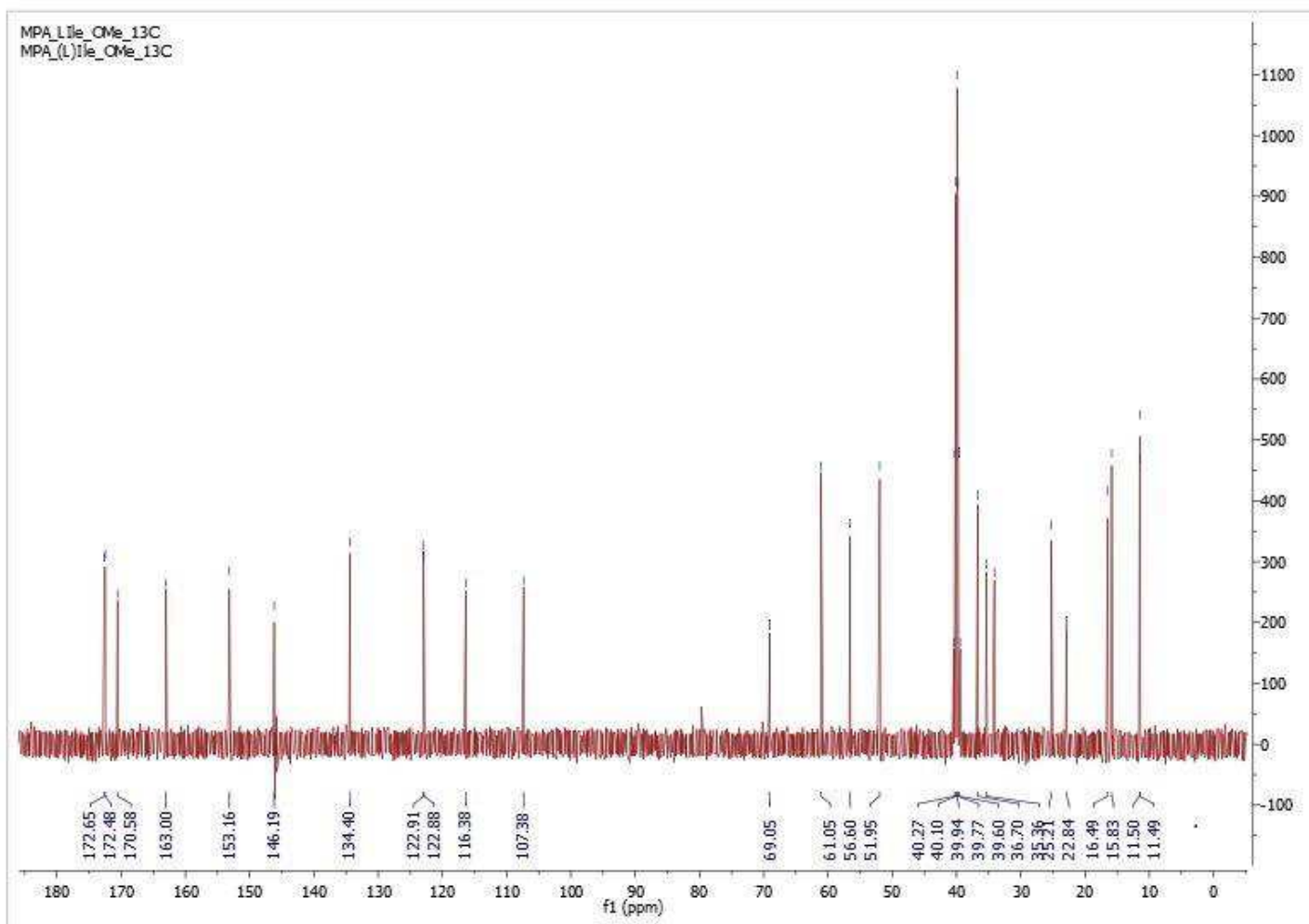


12 L (L-MPA-Thr-OMe) Czystość 99,77%

Załącznik 5. Widmo ^1H NMR związku MPA-L-Ile-OMe 202



Załącznik 6. Widmo ^{13}C NMR związku MPA-L-Ile-OMe 202

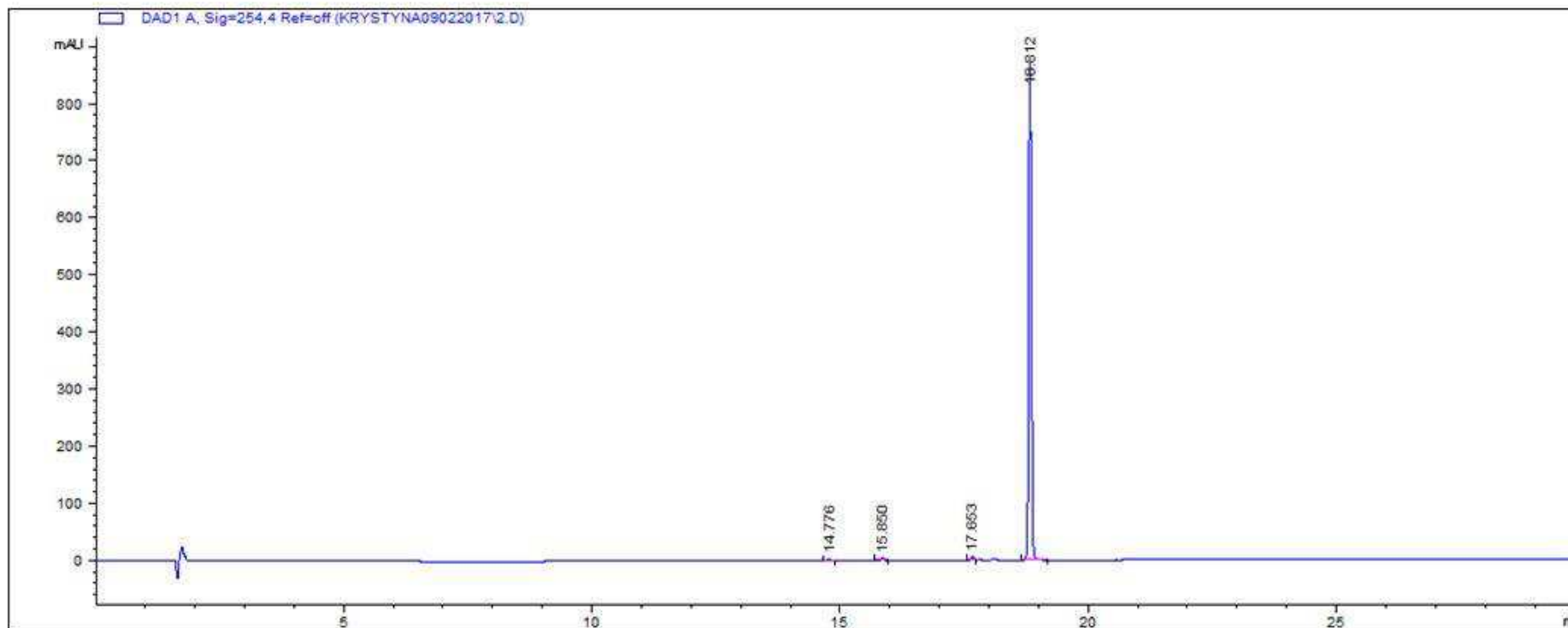


Załącznik 7. Widmo MS związku MPA-L-Ile-OMe 202

Sample Name	MPAILEOMe pos.	Position	P1-A8	Instrument Name	Instrument 1	User Name	PK
Inj Vol	10	InjPosition		SampleType	Sample	IRM Calibration Status	All Ions Mixed
Data Filename	MPAILEOMe pos.d	ACQ Method		Comment		Acquired Time	6/19/2015 1:58:34 PM

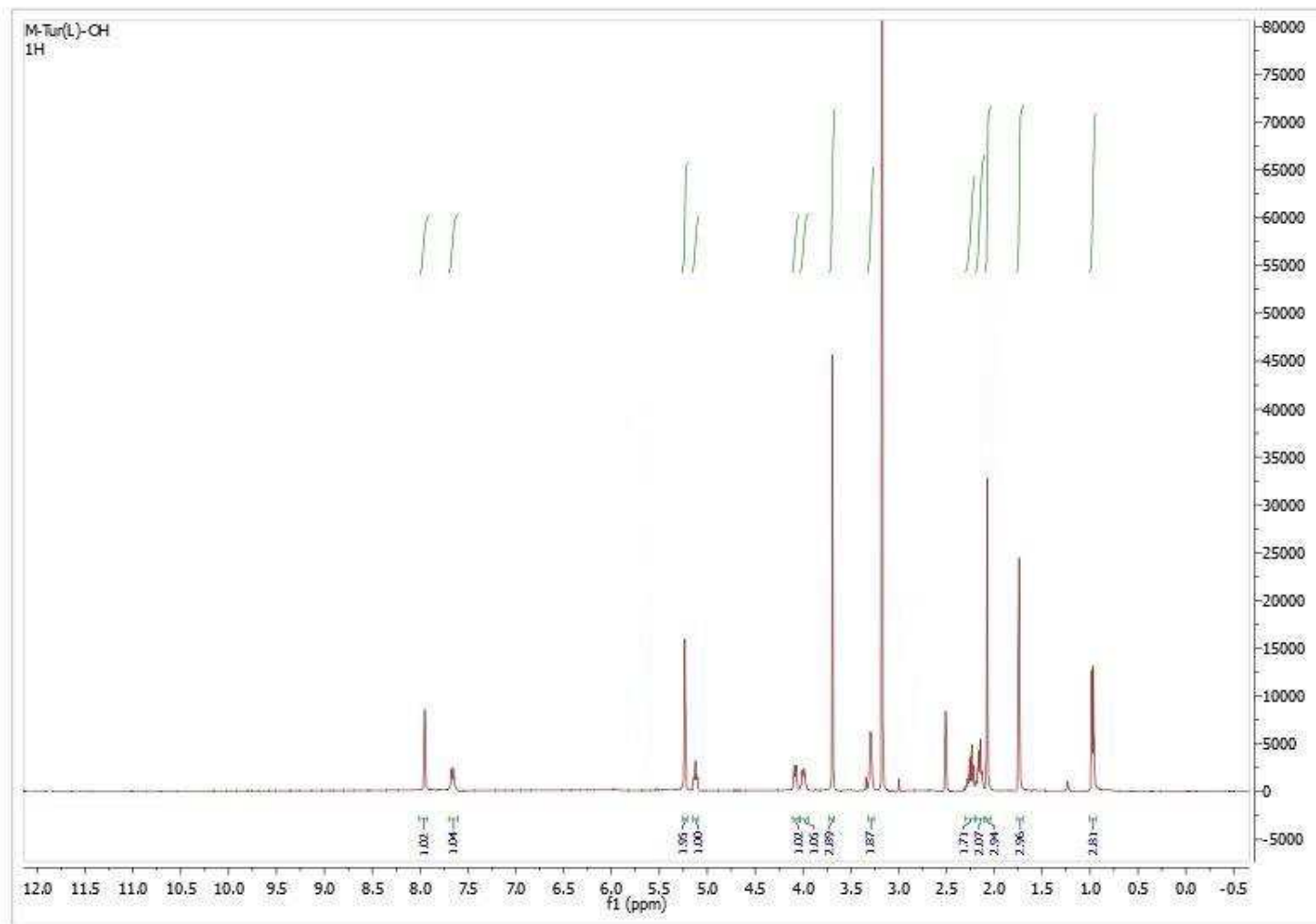


Załącznik 8. Chromatogram związku MPA-L-Ile-OMe 202

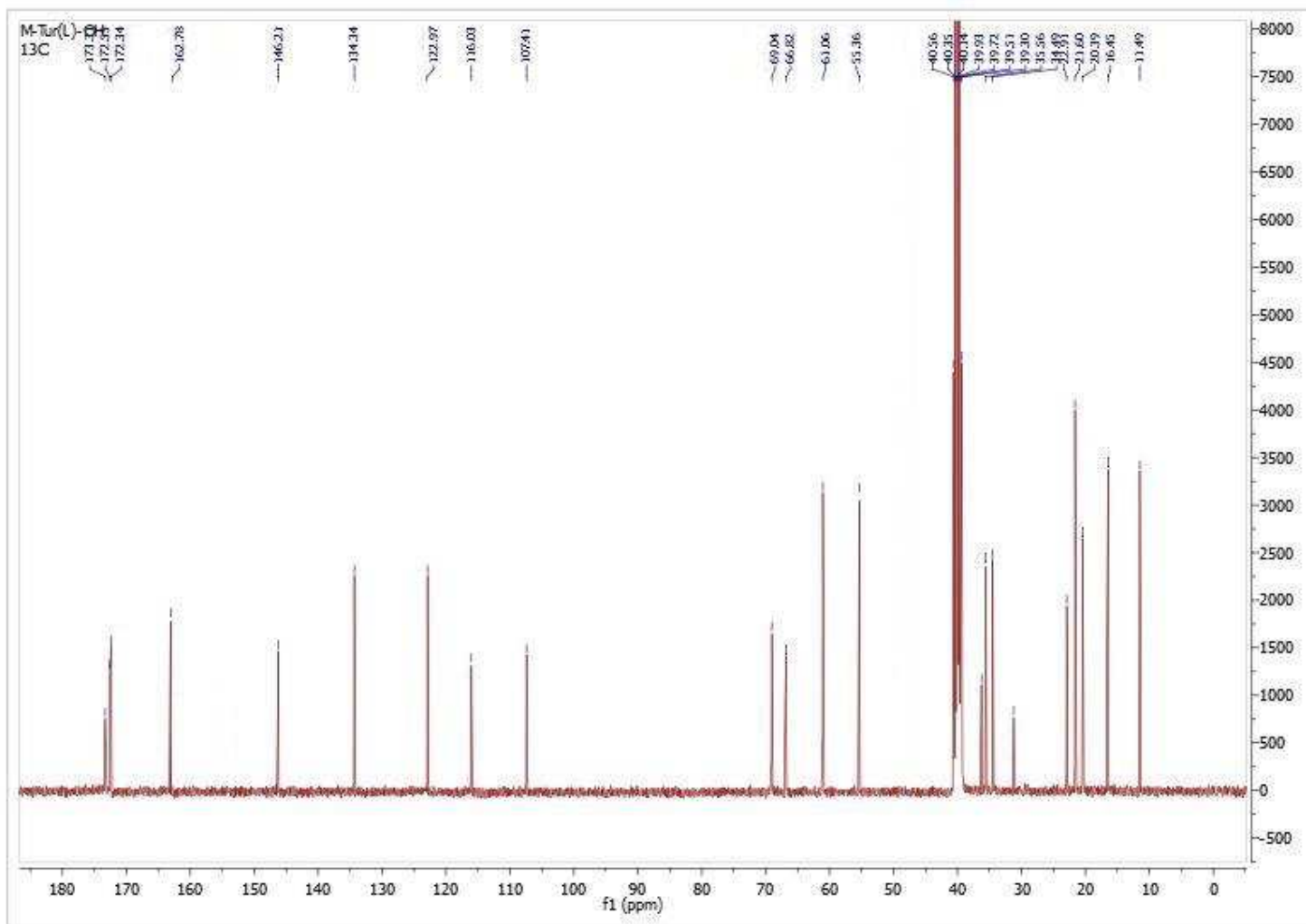


2 L (L-MPA-Ile-OMe) - Czystość 98,37%

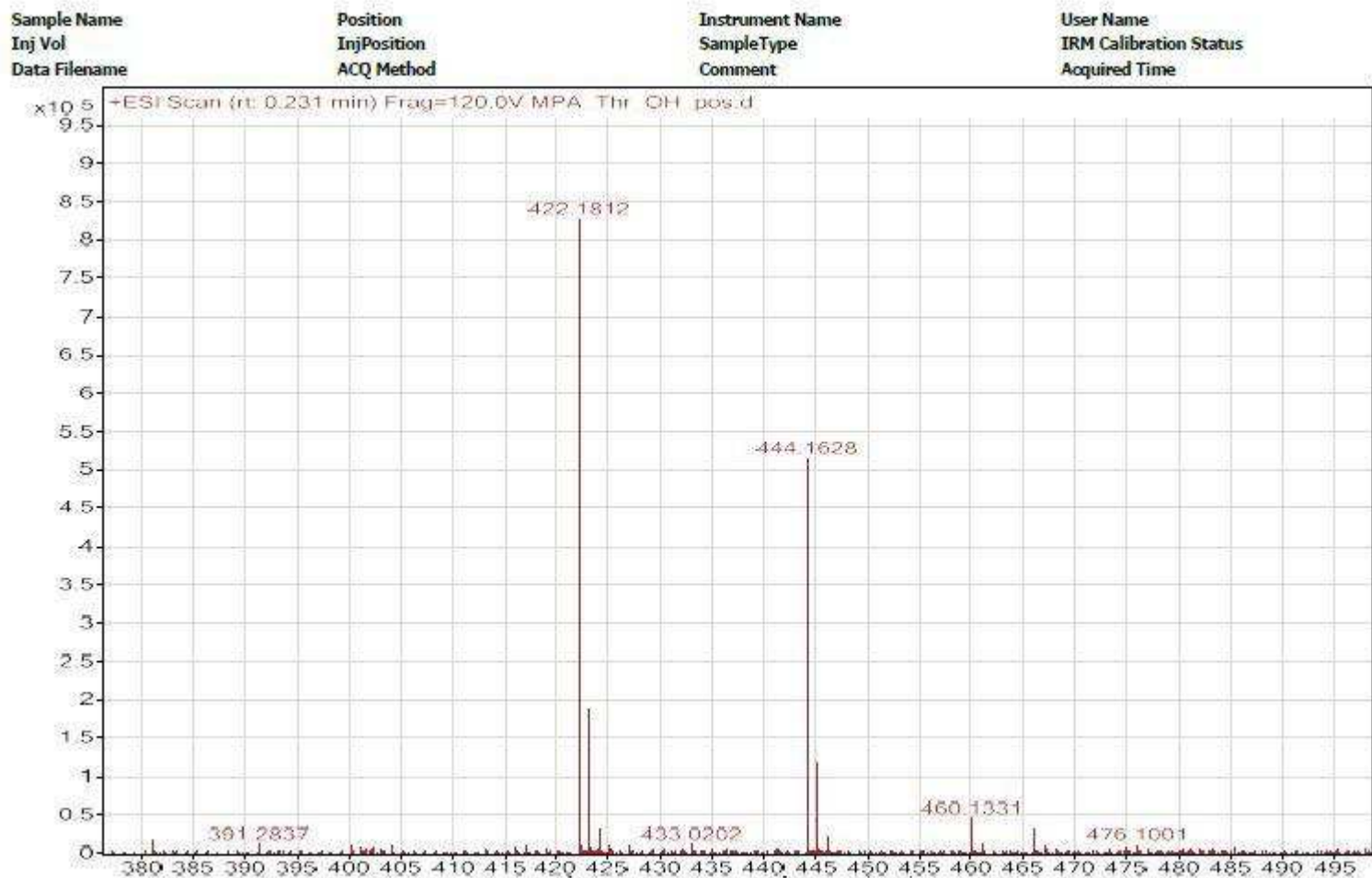
Załącznik 9. Widmo ^1H NMR związku MPA-L-Thr-OH 207



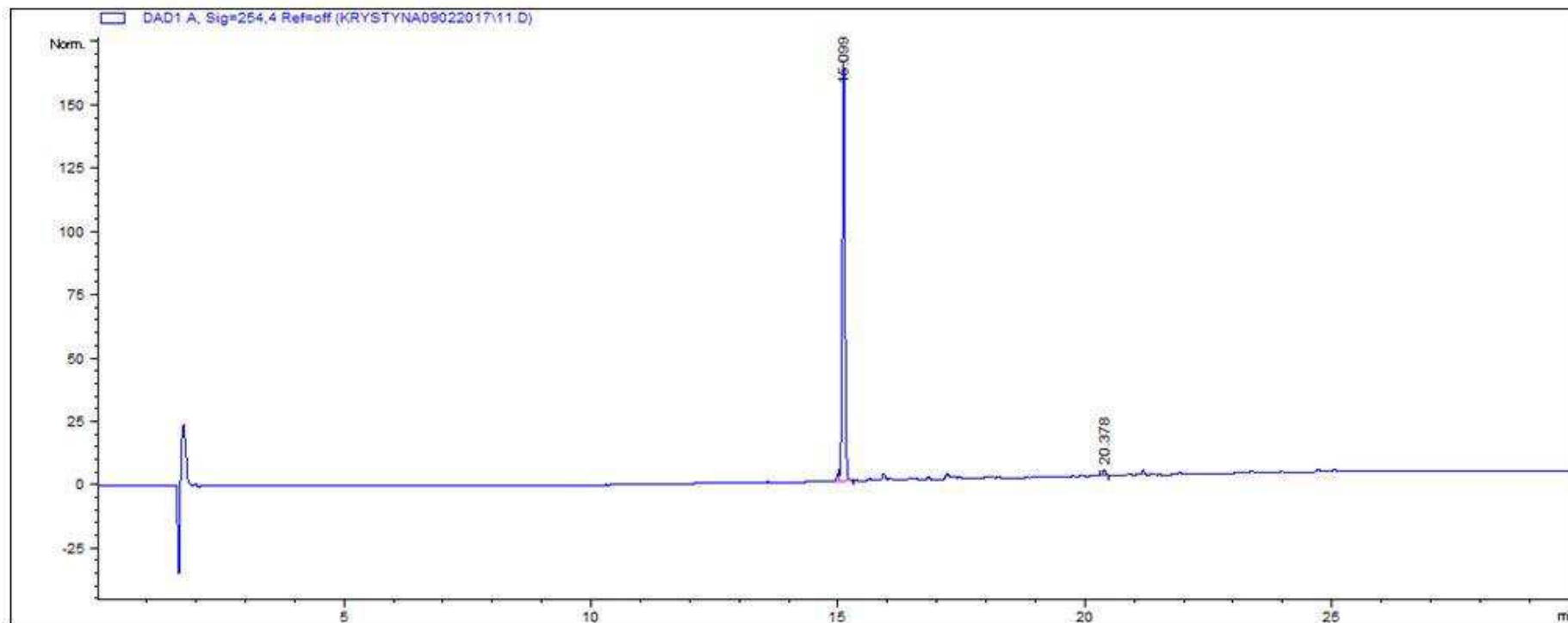
Załącznik 10. Widmo ^{13}C NMR związku MPA-L-Thr-OH 207



Załącznik 11. Widmo MS związku MPA-L-Thr-OH 207

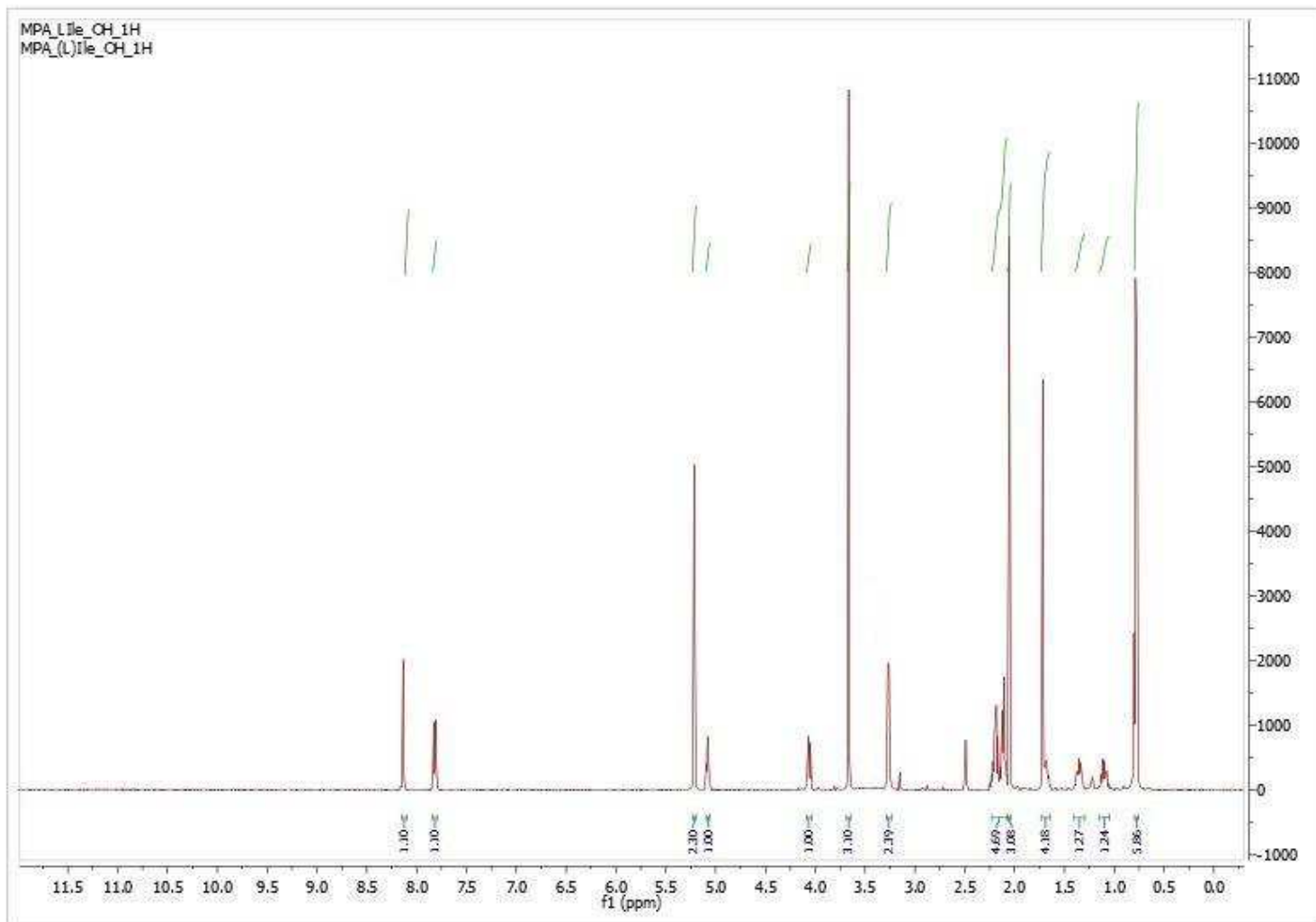


Załącznik 12. Chromatogram związku MPA-L-Thr-OH 207

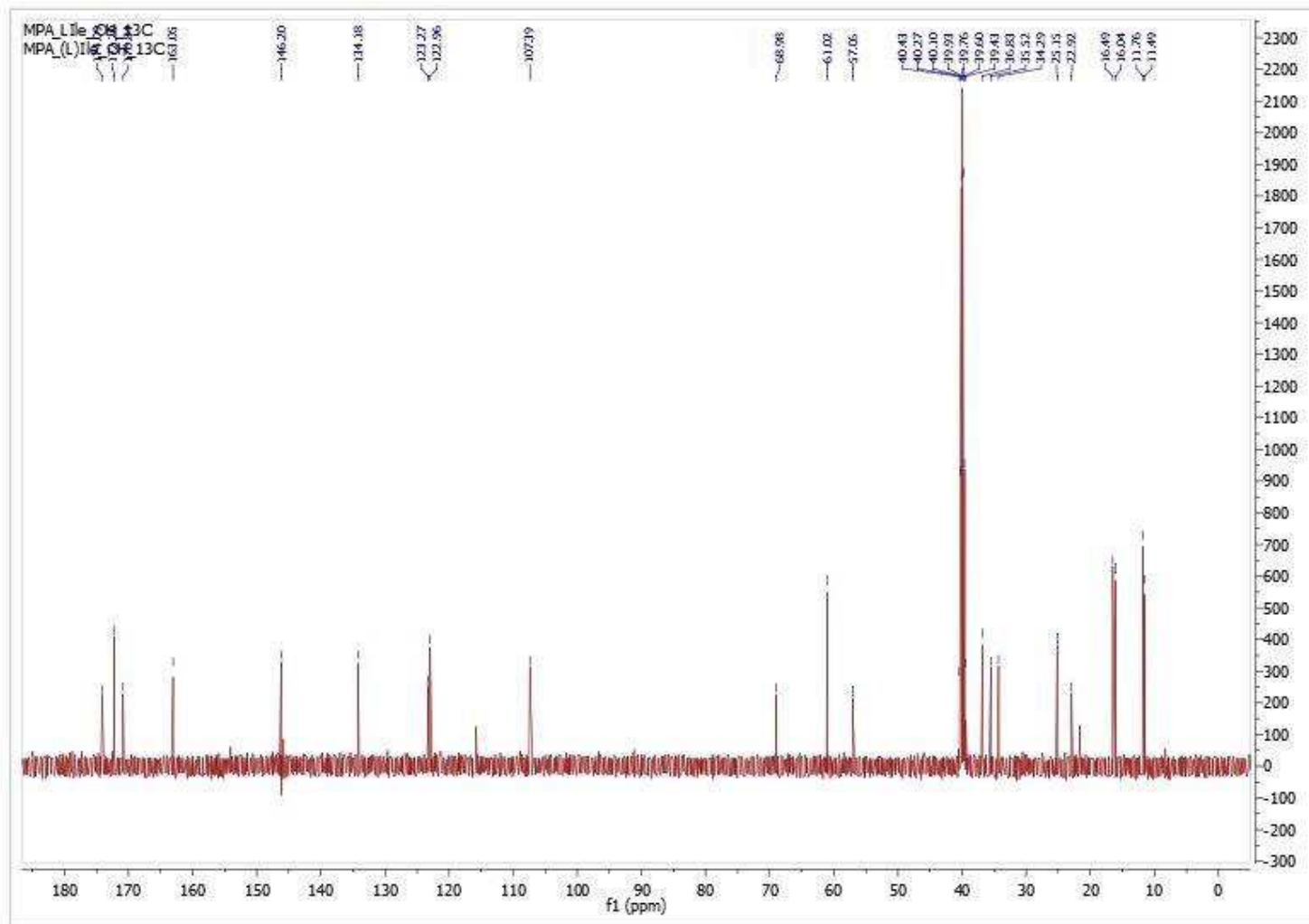


11 L (L-MPA-Thr-OH)- Czystość 98,65%

Załącznik 13. Widmo ^1H NMR związku MPA-L-Ile-OH 209

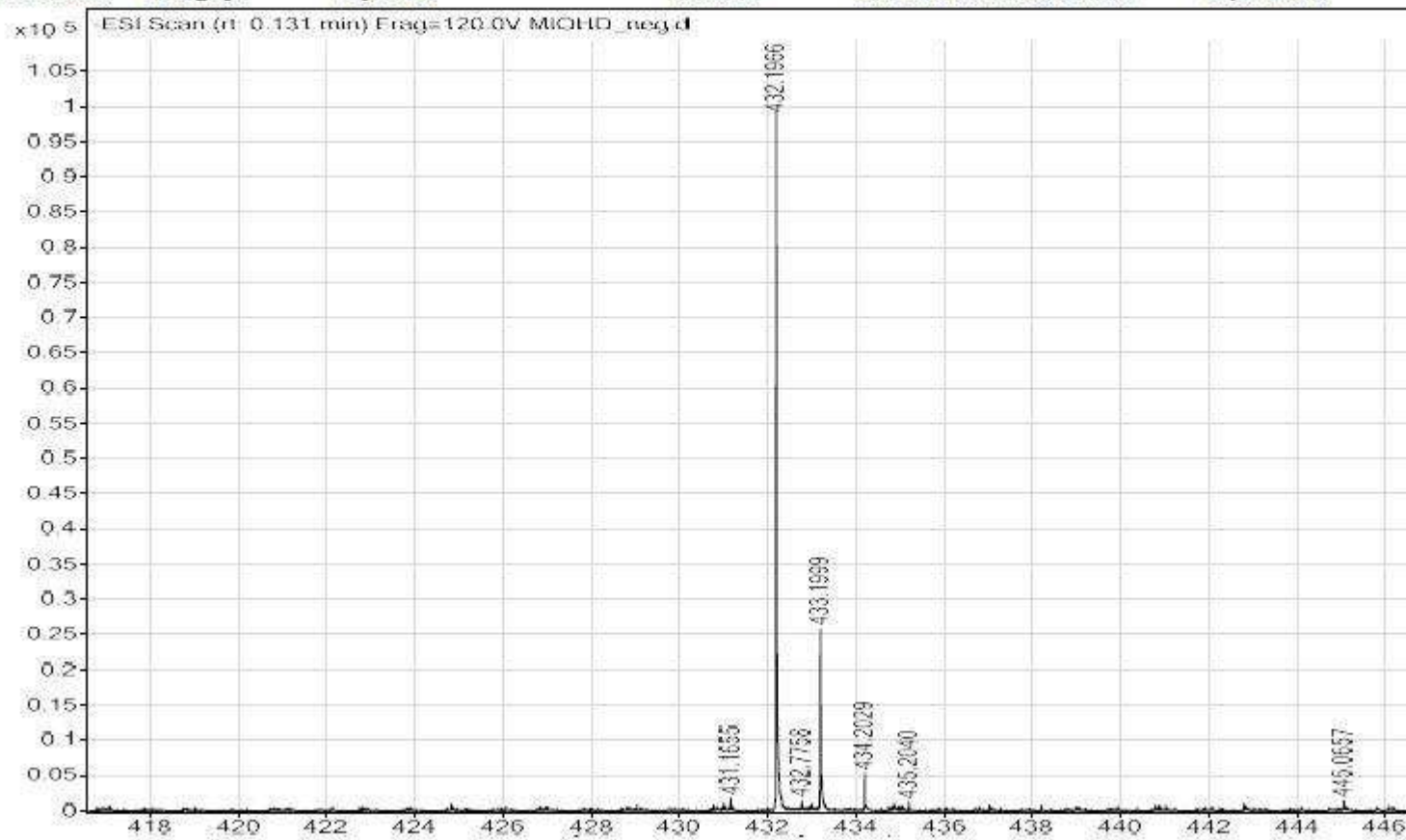


Załącznik 14. Widmo ^{13}C NMR związku MPA-L-Ile-OH 209

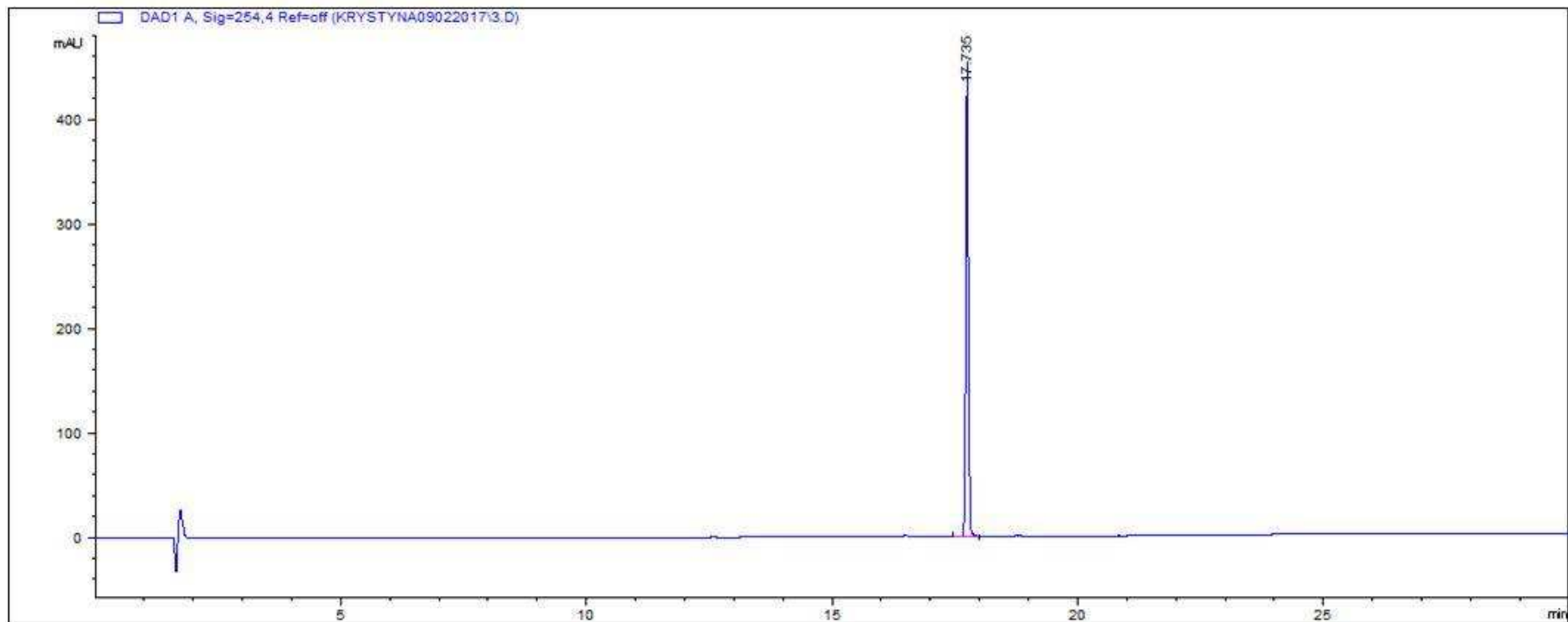


Załącznik 15. Widmo MS związku MPA-L-Ile-OH 209

Sample Name	MIOHD_neg	Position	P1-E3	Instrument Name	Instrument 1	User Name	DK
Inj Vol	1	InjPosition		SampleType	Sample	IRM Calibration Status	All Ions M
Data Filename	MIOHD_neg.d	ACQ Method		Comment	Kolumna x terra c8 2.150mm 3.5 um	Acquired Time	3/2/2017

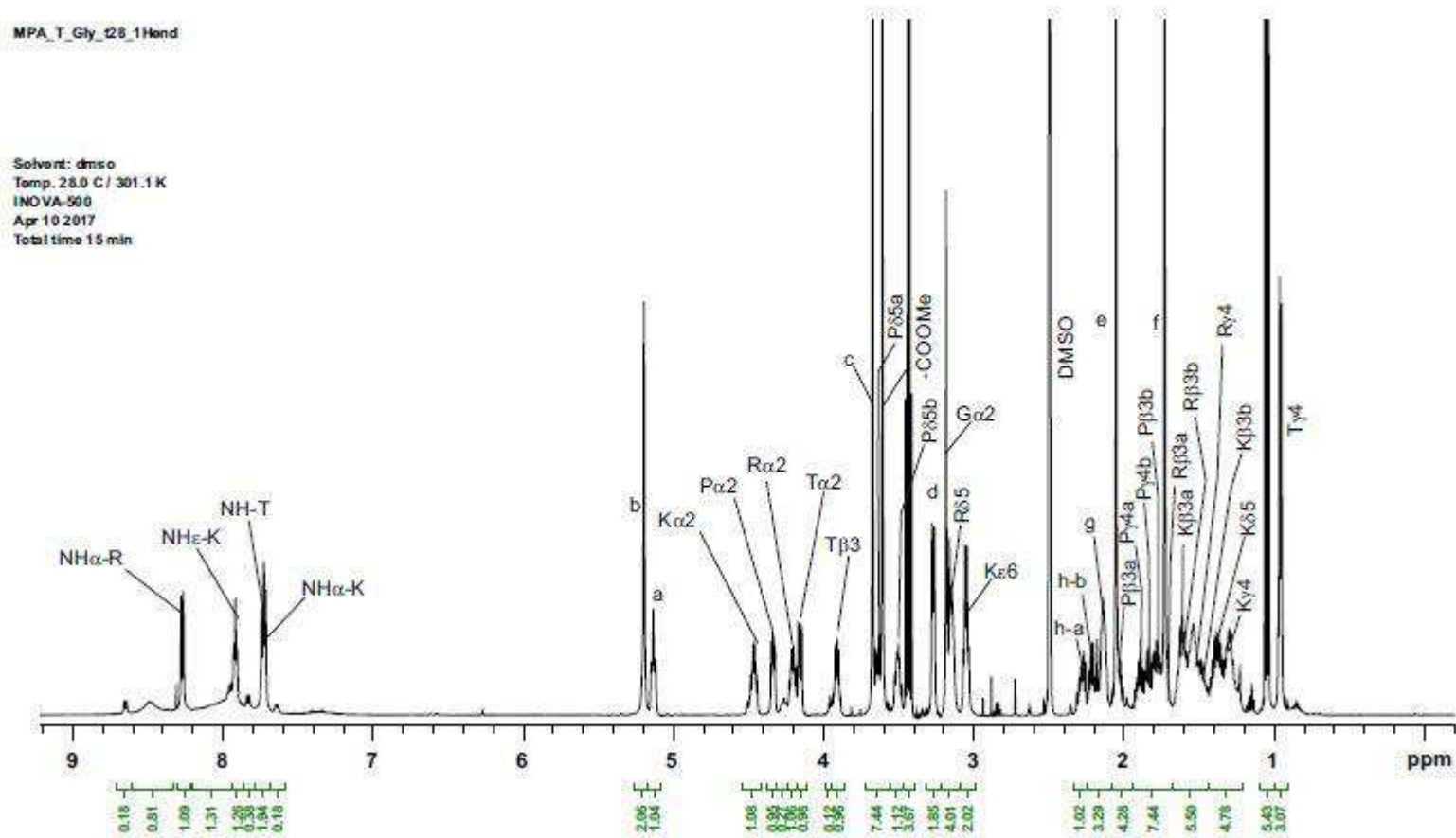


Załącznik 16. Chromatogram związku MPA-L-Ile-OH 209



3 L (L-MPA-Ile-OH)- Czystość 100%

Załącznik 17. Widmo ^1H NMR związku MPA-T-Gly 271

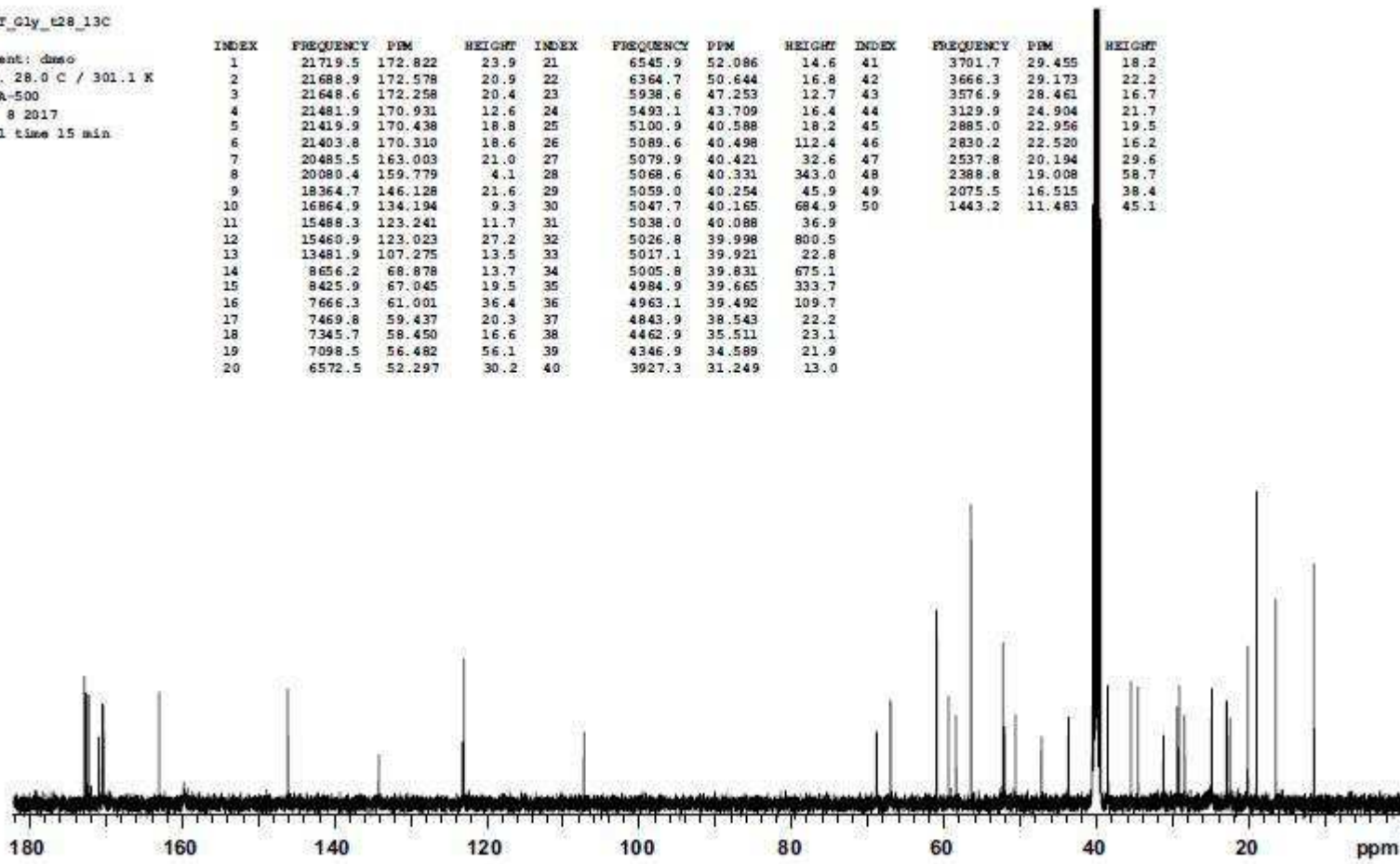


Załącznik 18. Widmo ^{13}C NMR związku MPA-T-Gly 271

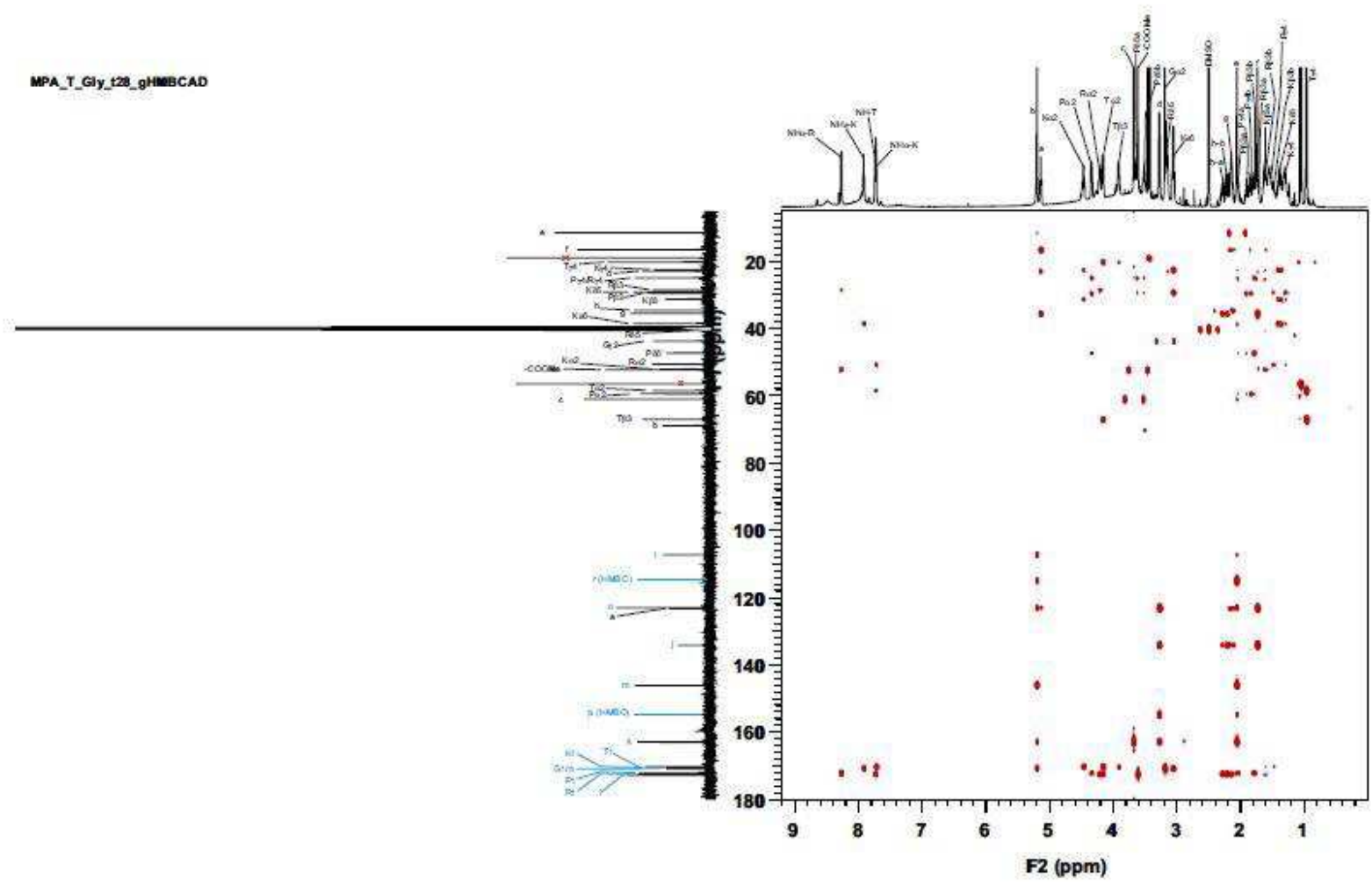
MPA_T_Gly_e28_13C

Solvent: dmsc
 Temp. 28.0 C / 301.1 K
 INOVA-500
 Apr 8 2017
 Total time 15 min

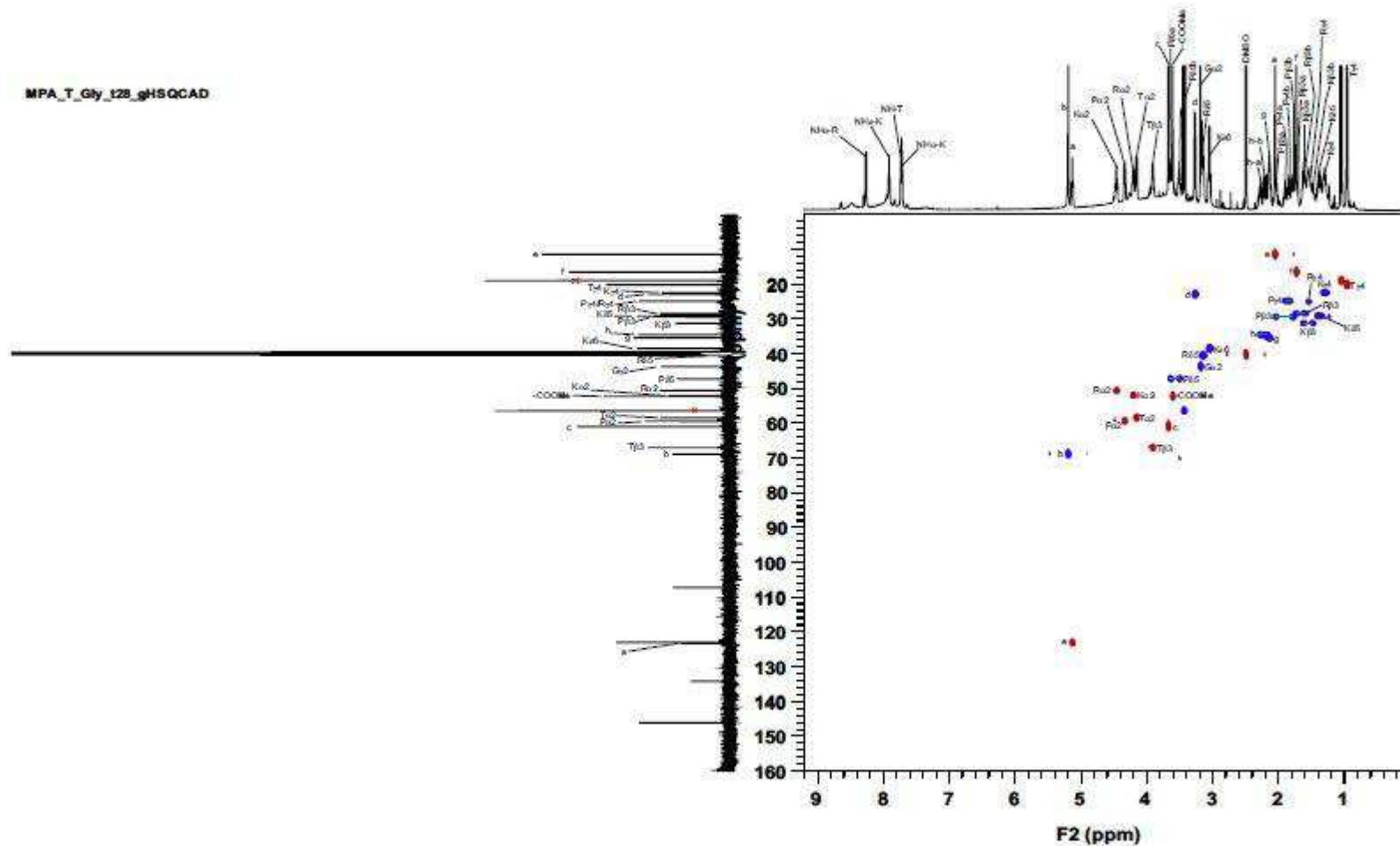
INDEX	FREQUENCY	PPM	HEIGHT	INDEX	FREQUENCY	PPM	HEIGHT	INDEX	FREQUENCY	PPM	HEIGHT
1	21719.5	172.822	23.9	21	6545.9	52.086	14.6	41	3701.7	29.455	18.2
2	21688.9	172.578	20.9	22	6364.7	50.644	16.8	42	3666.3	29.173	22.2
3	21648.6	172.258	20.4	23	5938.6	47.253	12.7	43	3576.9	28.461	16.7
4	21481.9	170.931	12.6	24	5493.1	43.709	16.4	44	3129.9	24.904	21.7
5	21419.9	170.438	18.8	25	5100.9	40.588	18.2	45	2885.0	22.956	19.5
6	21403.8	170.310	18.6	26	5089.6	40.498	112.4	46	2830.2	22.520	16.2
7	20485.5	163.003	21.0	27	5079.9	40.421	32.6	47	2537.8	20.194	29.6
8	20080.4	159.779	4.1	28	5068.6	40.331	343.0	48	2388.8	19.008	58.7
9	18364.7	146.128	21.6	29	5059.0	40.254	45.9	49	2075.5	16.515	38.4
10	16864.9	134.194	9.3	30	5047.7	40.165	684.9	50	1443.2	11.483	45.1
11	15488.3	123.241	11.7	31	5038.0	40.088	36.9				
12	15460.9	123.023	27.2	32	5026.8	39.998	800.5				
13	13481.9	107.275	13.5	33	5017.1	39.921	22.8				
14	8656.2	68.878	13.7	34	5005.8	39.831	675.1				
15	8425.9	67.045	19.5	35	4984.9	39.665	333.7				
16	7666.3	61.001	36.4	36	4963.1	39.492	109.7				
17	7469.8	59.437	20.3	37	4843.9	38.543	22.2				
18	7345.7	58.450	16.6	38	4462.9	35.511	23.1				
19	7098.5	56.482	56.1	39	4346.9	34.589	21.9				
20	6572.5	52.297	30.2	40	3927.3	31.249	13.0				



Załącznik 20. Widmo HMBC związku MPA-T-Gly 271

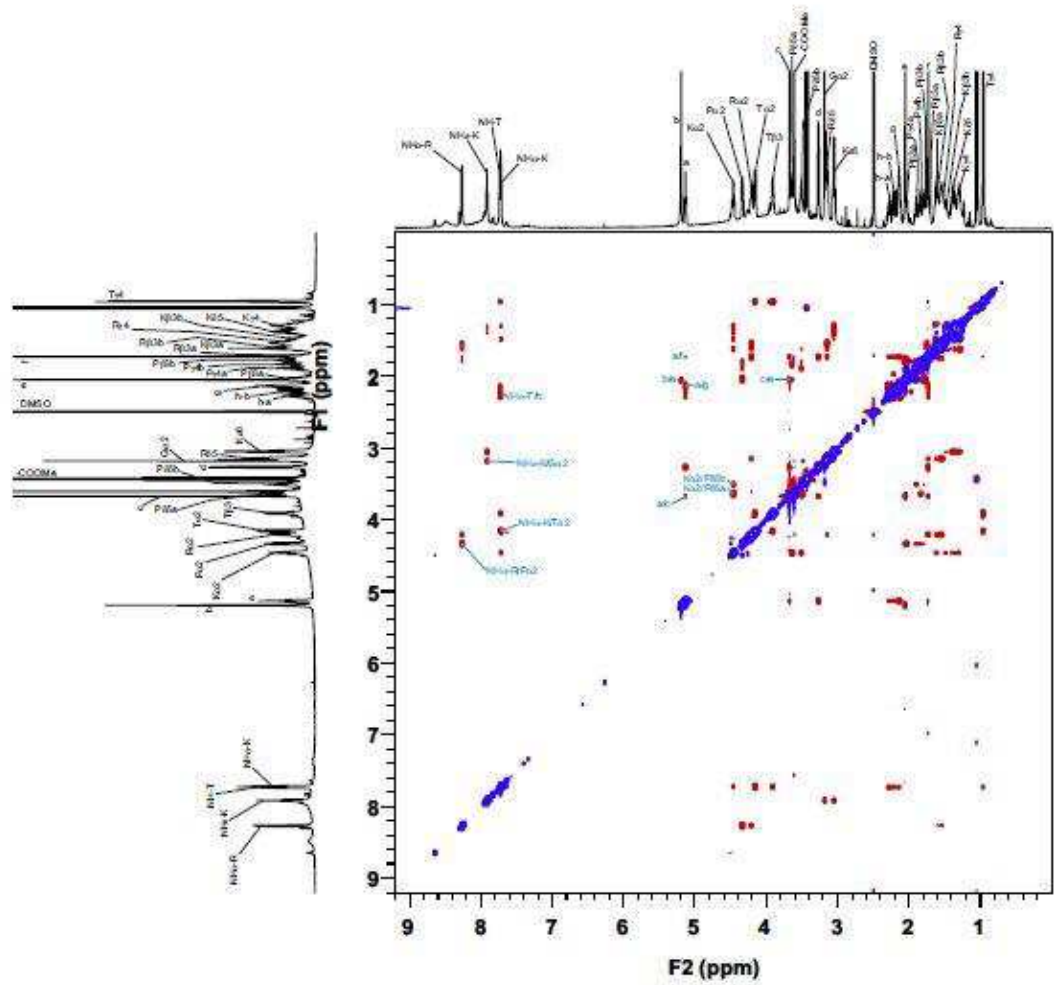


Załącznik 21. Widmo HSQC związku MPA-T-Gly 271



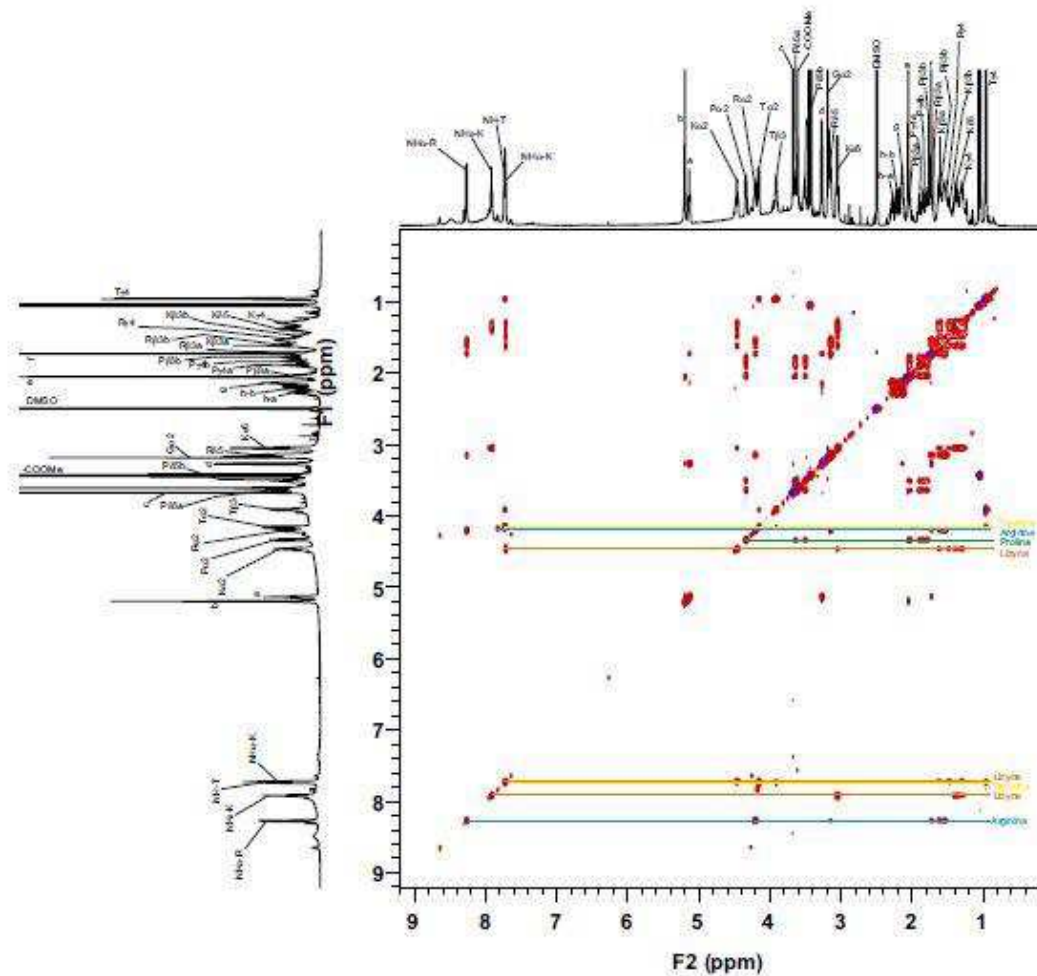
Załącznik 22. Widmo ROESY związku MPA-T-Gly 271

MPA_T_Gly_128_ROESY450



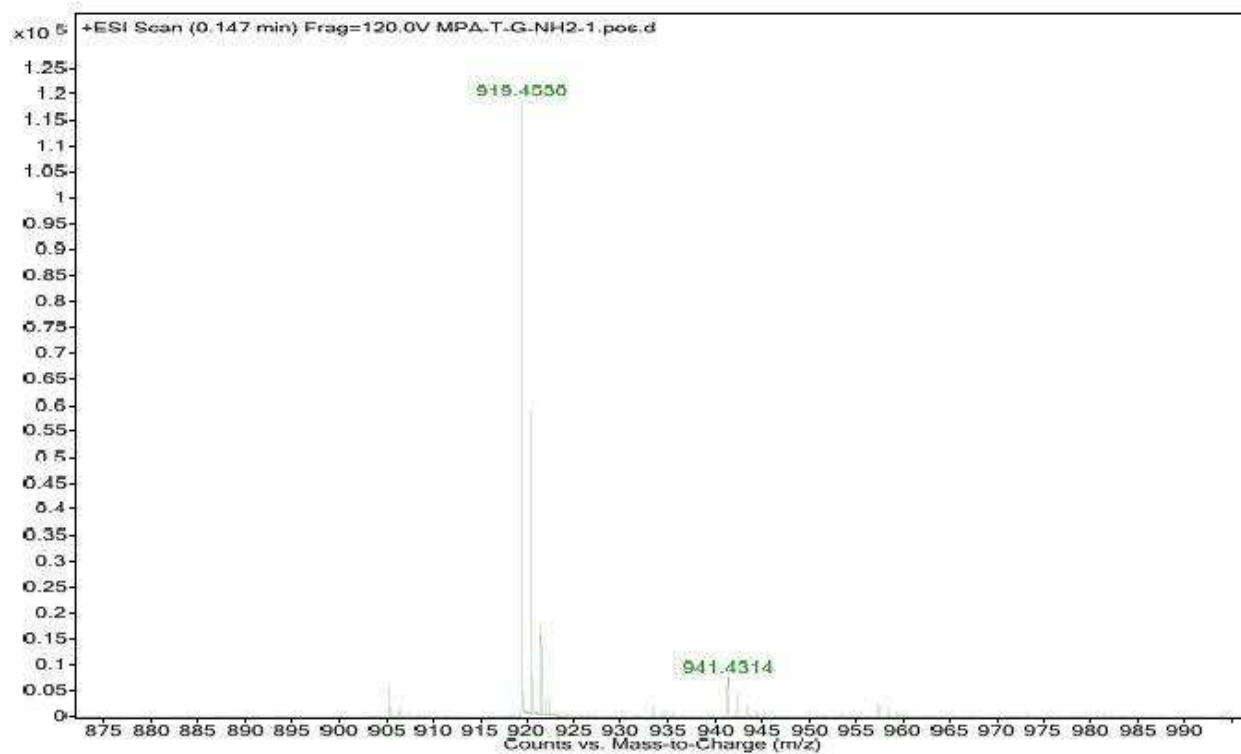
Załącznik 23. Widmo TOCSY związku MPA-T-Gly 271

MPA_T_Gly_128_zTOCSY90

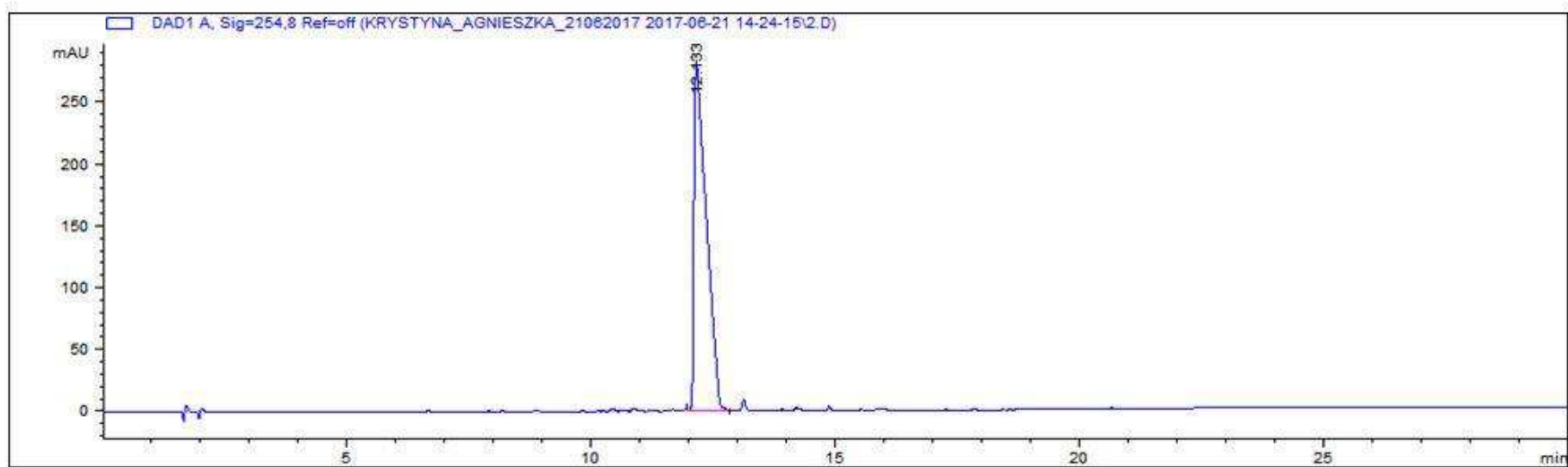


Załącznik 26. Widmo MS związku MPA-T-Gly 271

Sample Name	MPA-T-G-NH2-1.pos	Position	P1-05	Instrument Name	Instrument 1	User Name	PK
Inj Vol	2	InjPosition		SampleType	Sample	IRM Calibration Status	All Ions Missed
Data Filename	MPA-T-G-NH2-1.pos.d	ACQ Method		Comment		Acquired Time	12/18/2015 1:37:42 PM

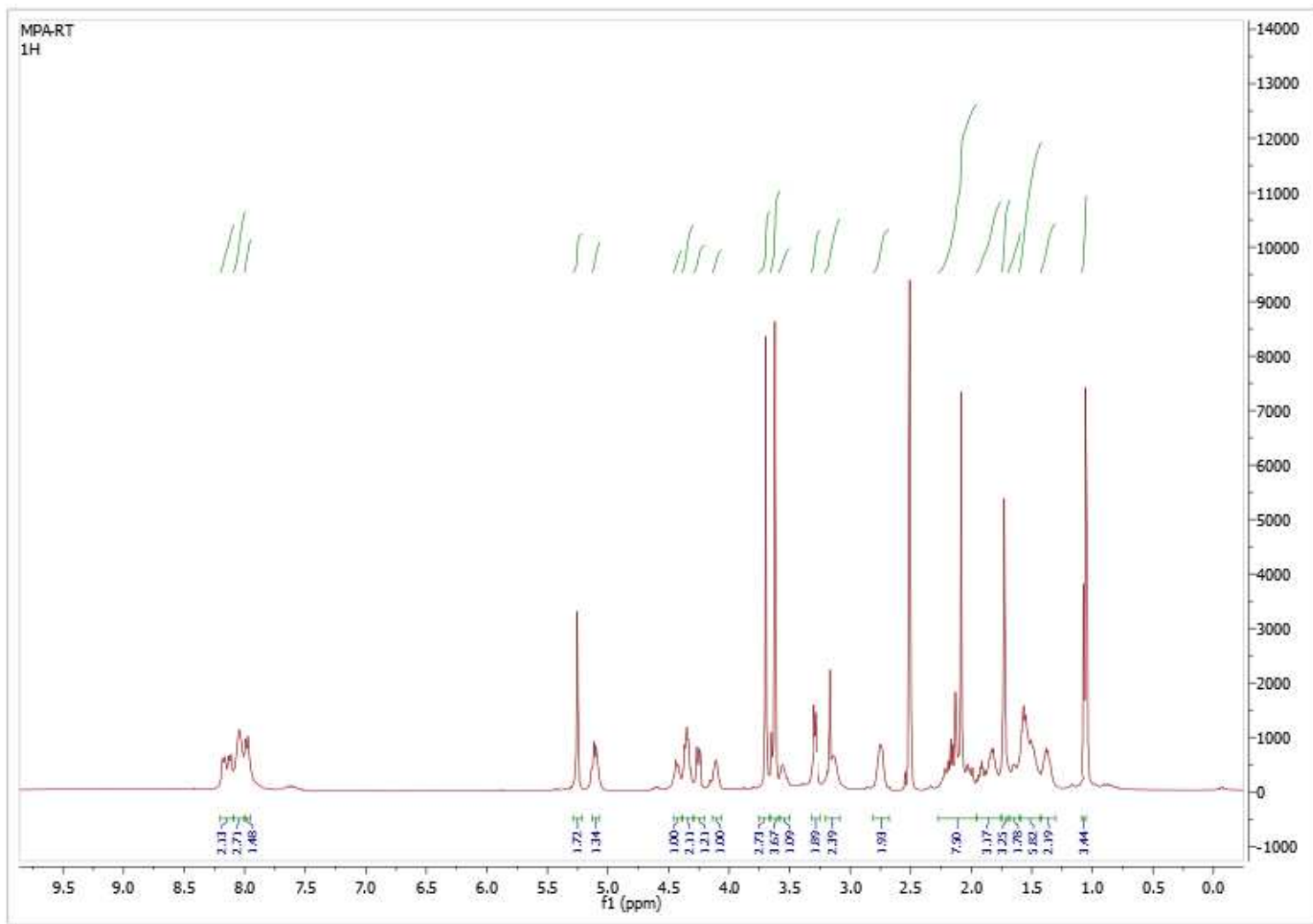


Załącznik 27. Chromatogram związku MPA-T-Gly 271

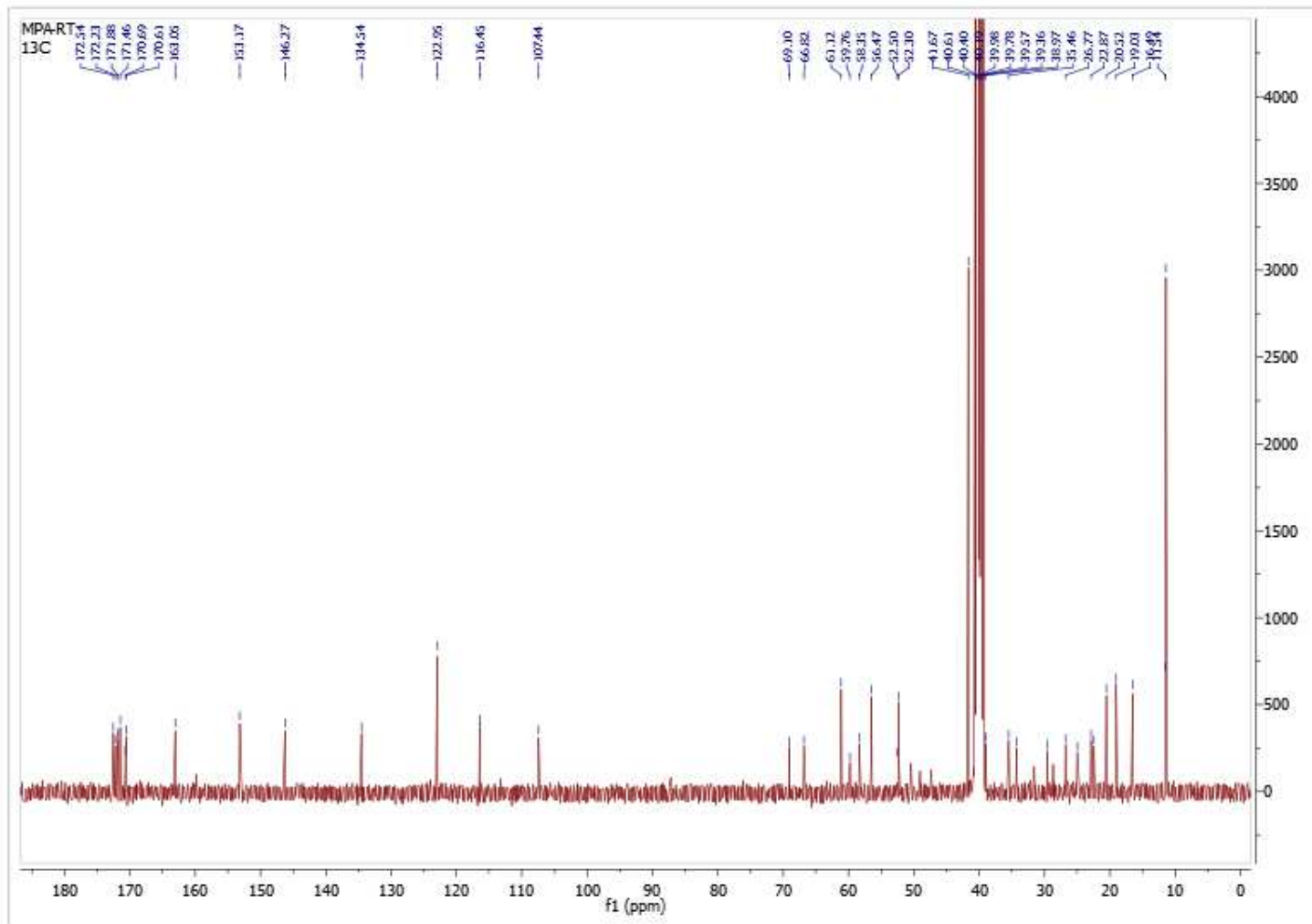


2 – czystość 100 % - MPA-T-Gly

Załącznik 28. Widmo ^1H NMR związku MPA-RT 285



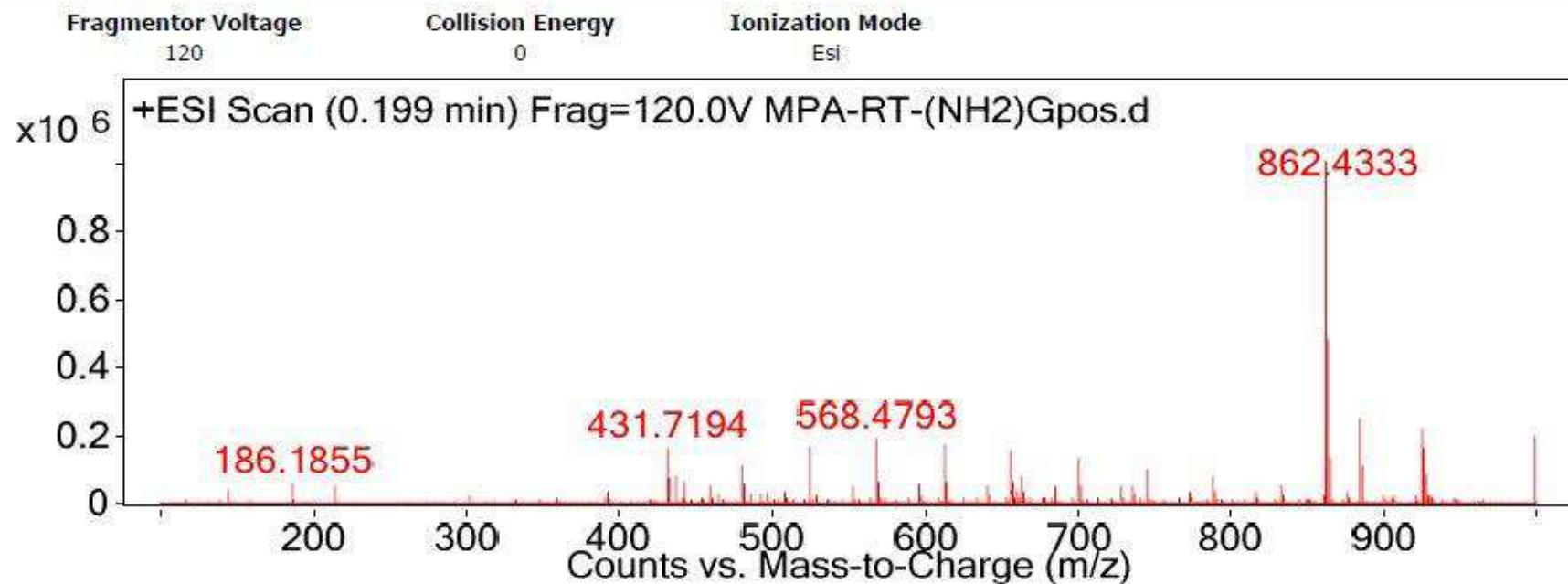
Załącznik 29. Widmo ^{13}C NMR związku MPA-RT 285



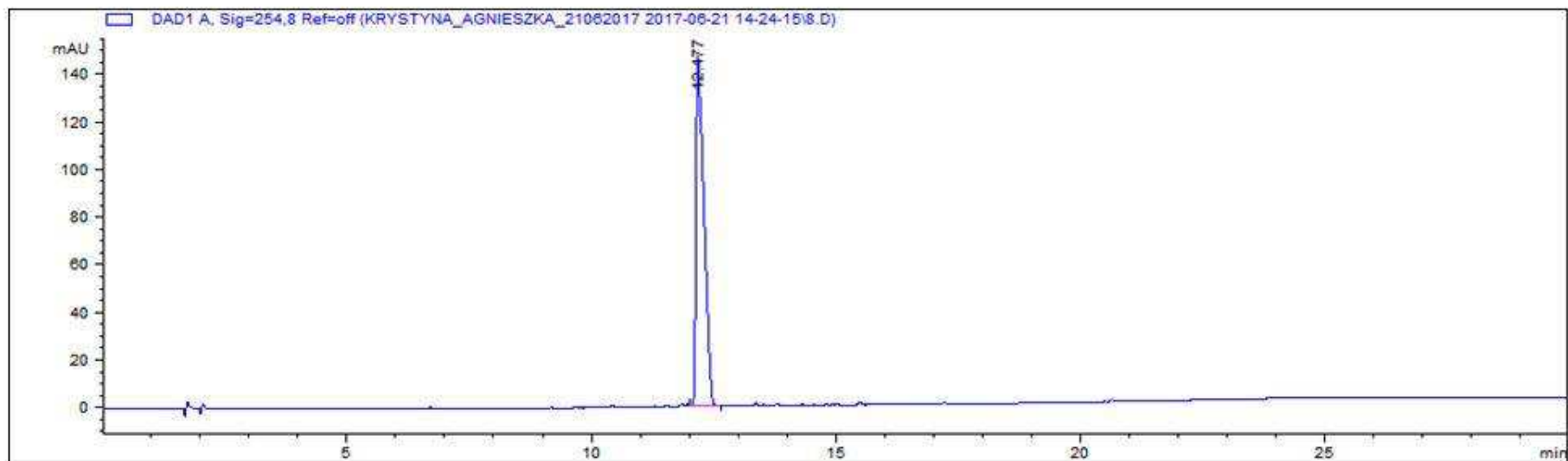
Załącznik 30. Widmo MS związku MPA-RT 285

Data Filename	MPA-RT-(NH2)Gpos.d	Sample Name	MPA-RT-(NH2)Gpos
Sample Type	Sample	Position	P1-D6
Instrument Name	Instrument 1	User Name	PK
Acq Method		Acquired Time	9/8/2015 4:44:21 PM
IRM Calibration Status		DA Method	Default.m
Comment			

User Spectra



Załącznik 31. Chromatogram związku MPA-RT 285

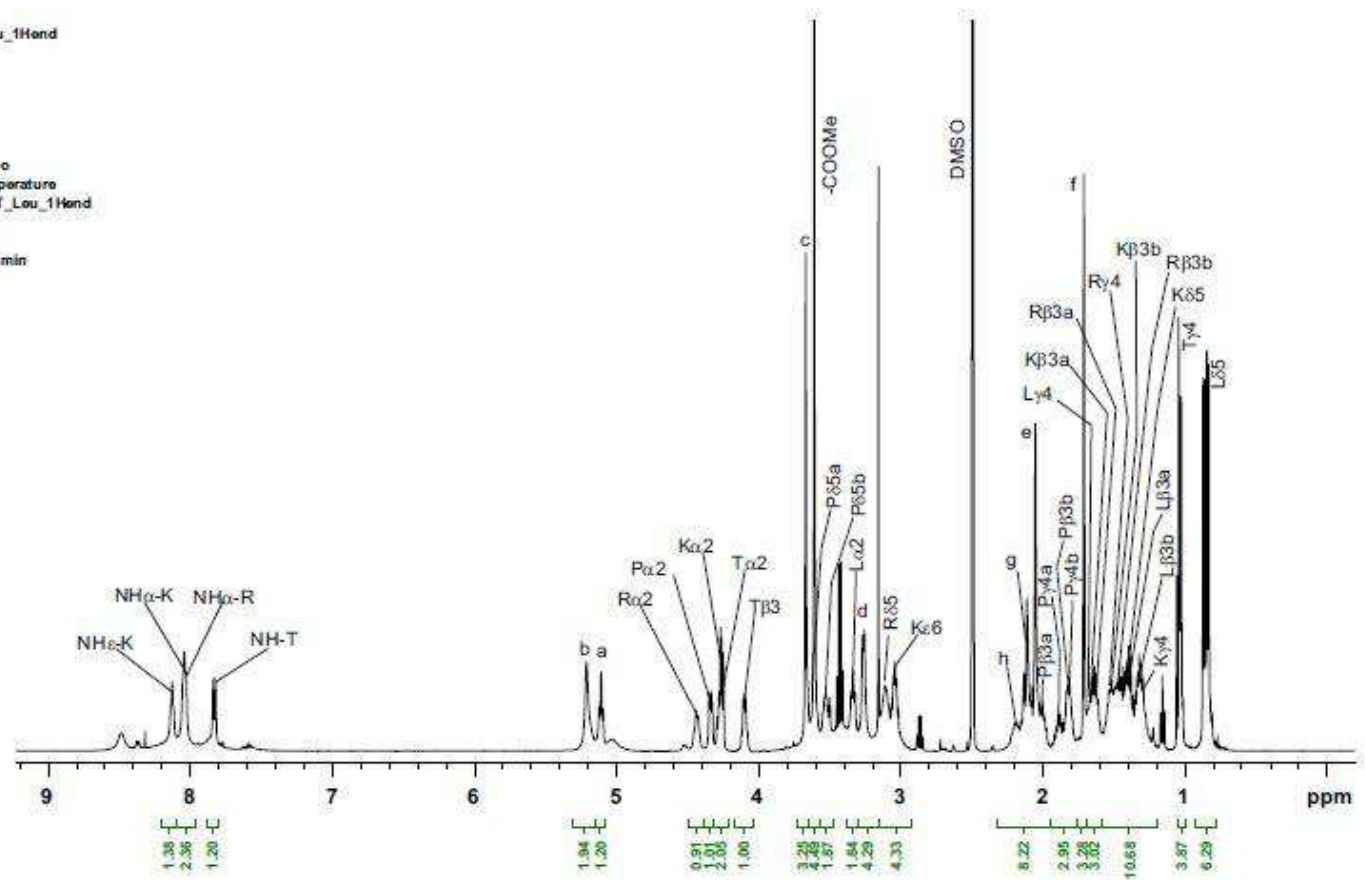


8 – czystość 100 %MPA-RT

Załącznik 32. Widmo ^1H NMR związku MPA-RT-Leu 290

MPA_RT_Lou_1Hend

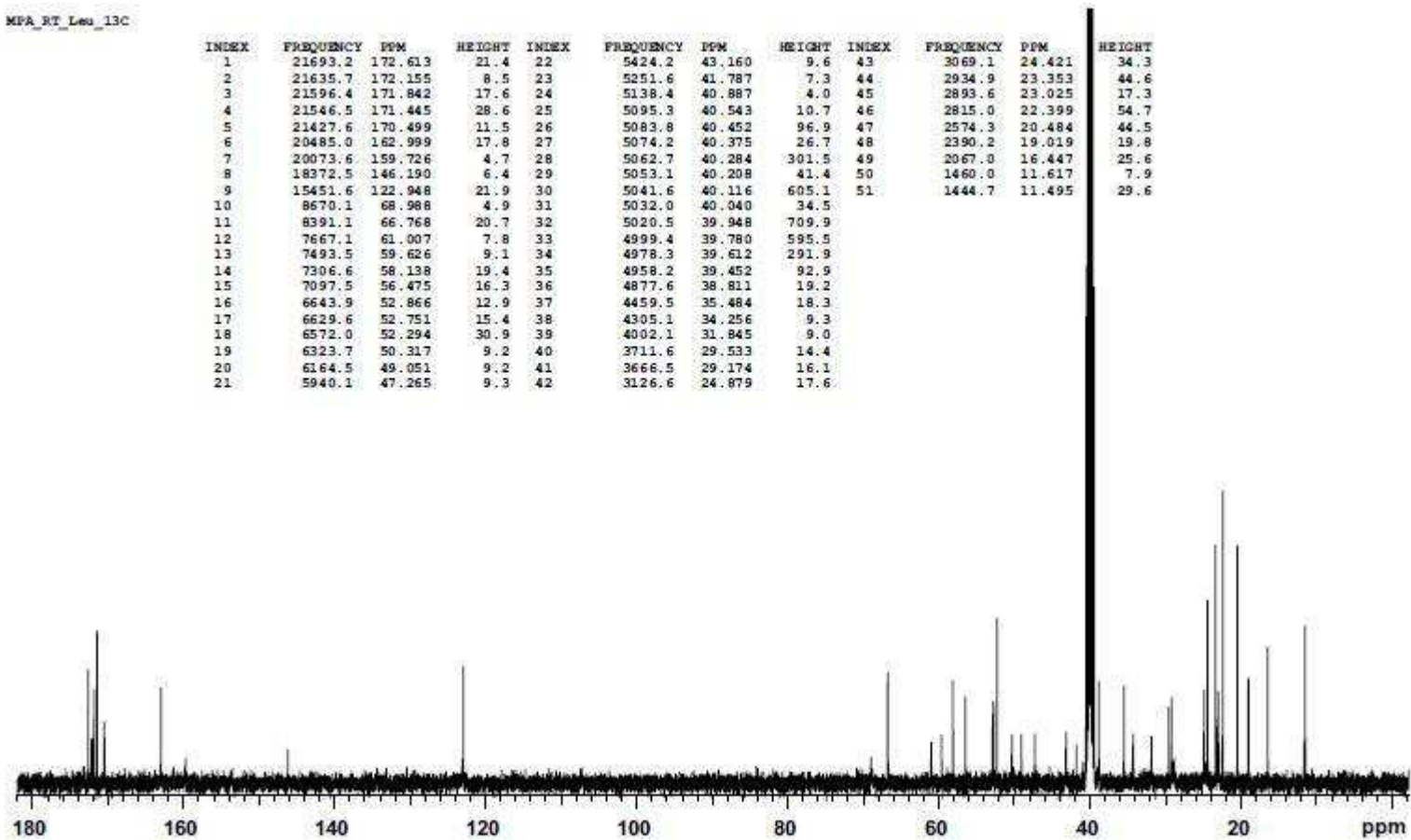
Solvent: dms-o
 Ambient temperature
 File: MPA_RT_Lou_1Hend
 INOVA-500
 Mar 31 2017
 Total time 45 min



Załącznik 33. Widmo ^{13}C NMR związku MPA-RT-Leu 290

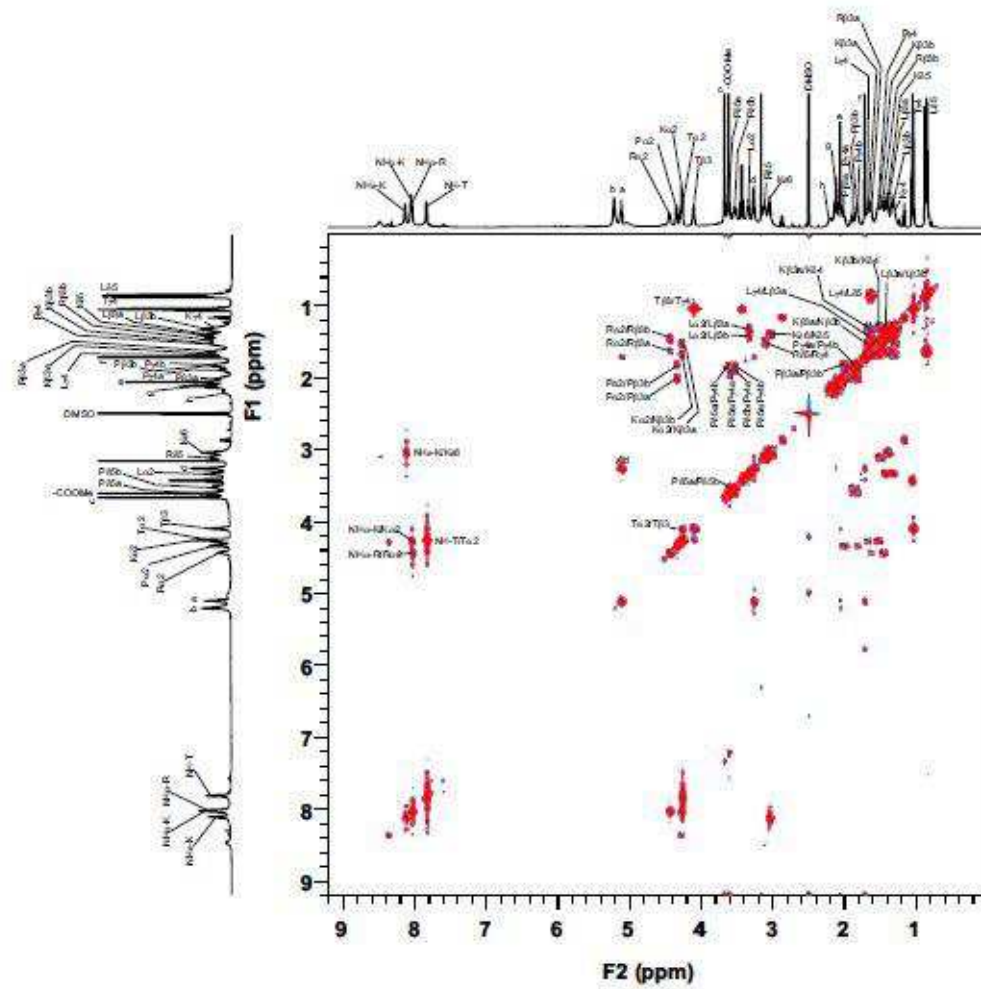
MPA_RT_Leu_13C

INDEX	FREQUENCY	PPM	HEIGHT	INDEX	FREQUENCY	PPM	HEIGHT	INDEX	FREQUENCY	PPM	HEIGHT
1	21693.2	172.613	21.4	22	5424.2	43.160	9.6	43	3069.1	24.421	34.3
2	21635.7	172.155	8.5	23	5251.6	41.787	7.3	44	2934.9	23.353	44.6
3	21596.4	171.842	17.6	24	5138.4	40.887	4.0	45	2893.6	23.025	17.3
4	21546.5	171.445	28.6	25	5095.3	40.543	10.7	46	2815.0	22.399	54.7
5	21427.6	170.499	11.5	26	5083.8	40.452	96.9	47	2574.3	20.484	44.5
6	20485.0	162.999	17.8	27	5074.2	40.375	26.7	48	2390.2	19.019	19.8
7	20073.6	159.726	4.7	28	5062.7	40.284	301.5	49	2067.0	16.447	25.6
8	18372.5	146.190	6.4	29	5053.1	40.208	41.4	50	1460.0	11.617	7.9
9	15451.6	122.948	21.9	30	5041.6	40.116	605.1	51	1444.7	11.495	29.6
10	8670.1	68.988	4.9	31	5032.0	40.040	34.5				
11	8391.1	66.768	20.7	32	5020.5	39.948	709.9				
12	7667.1	61.007	7.8	33	4999.4	39.780	595.5				
13	7493.5	59.626	9.1	34	4978.3	39.612	291.9				
14	7306.6	58.138	19.4	35	4958.2	39.452	92.9				
15	7097.5	56.475	16.3	36	4877.6	38.811	19.2				
16	6643.9	52.866	12.9	37	4459.5	35.484	18.3				
17	6629.6	52.751	15.4	38	4305.1	34.256	9.3				
18	6572.0	52.294	30.9	39	4002.1	31.845	9.0				
19	6323.7	50.317	9.2	40	3711.6	29.533	14.4				
20	6164.5	49.051	9.2	41	3666.5	29.174	16.1				
21	5940.1	47.265	9.3	42	3126.6	24.879	17.6				

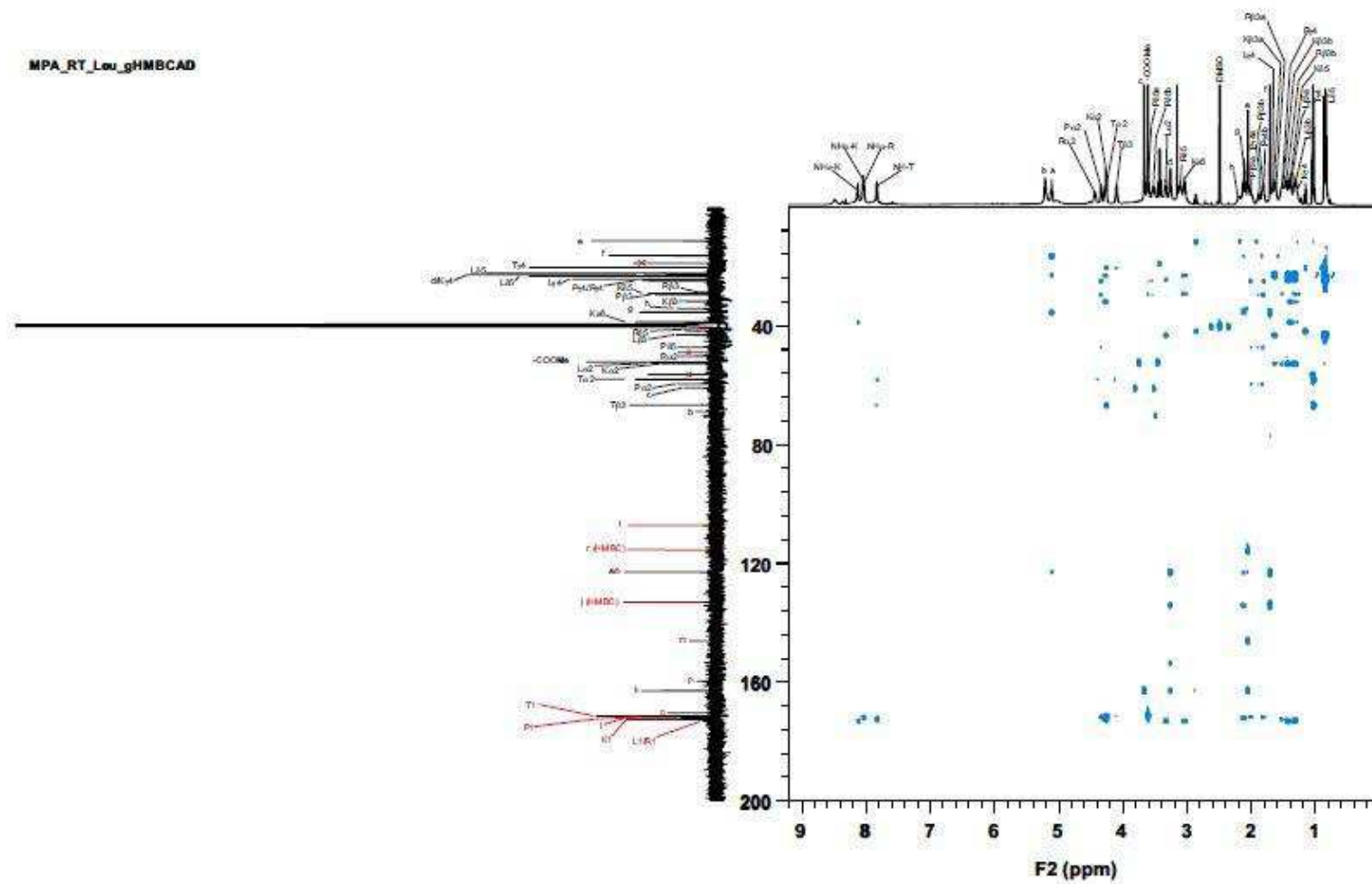


Załącznik 34. Widmo COSY związku MPA-RT-Leu 290

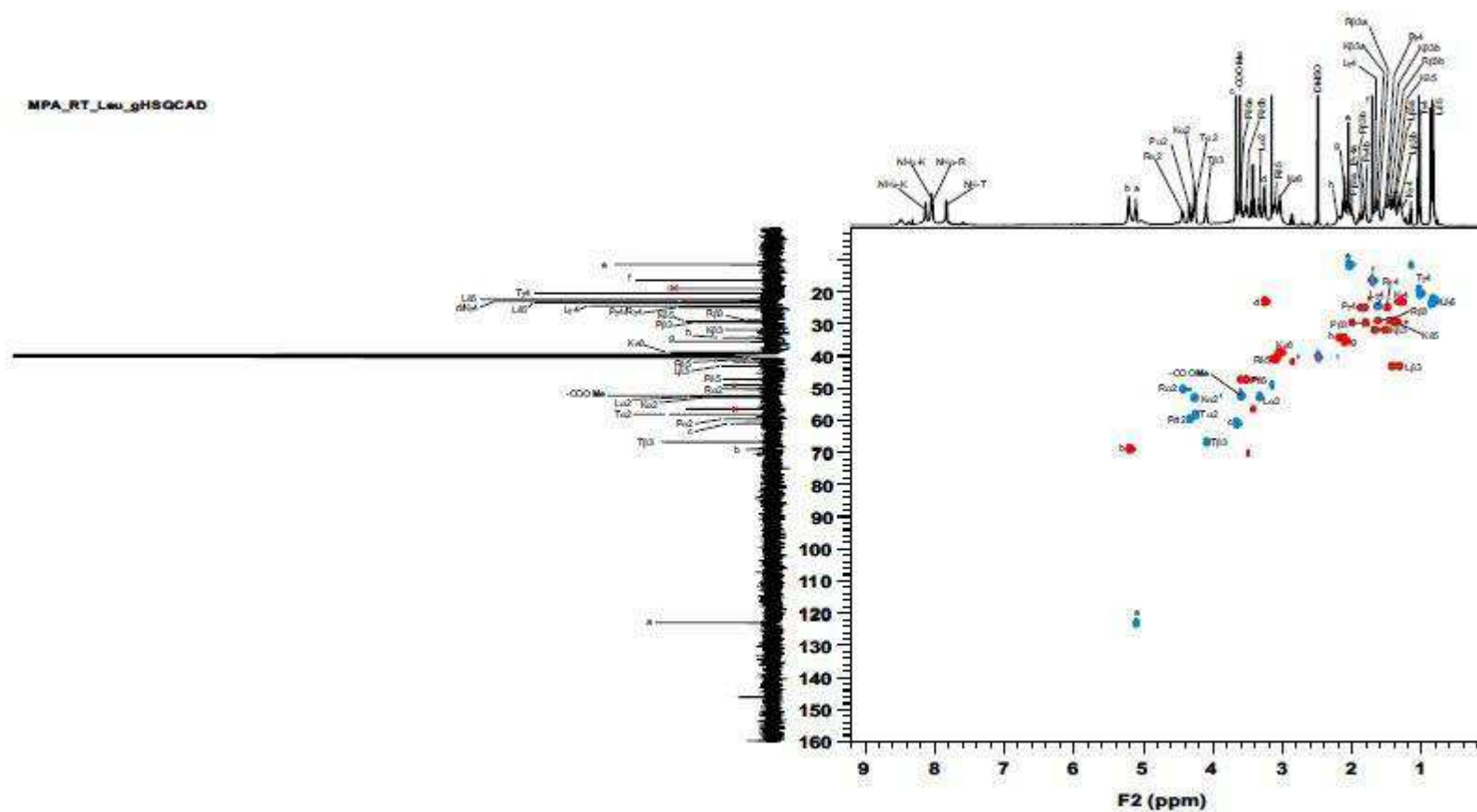
MPA_RT_Leu_gDQCOSY



Załącznik 35. Widmo HMBC związku MPA-RT-Leu 290

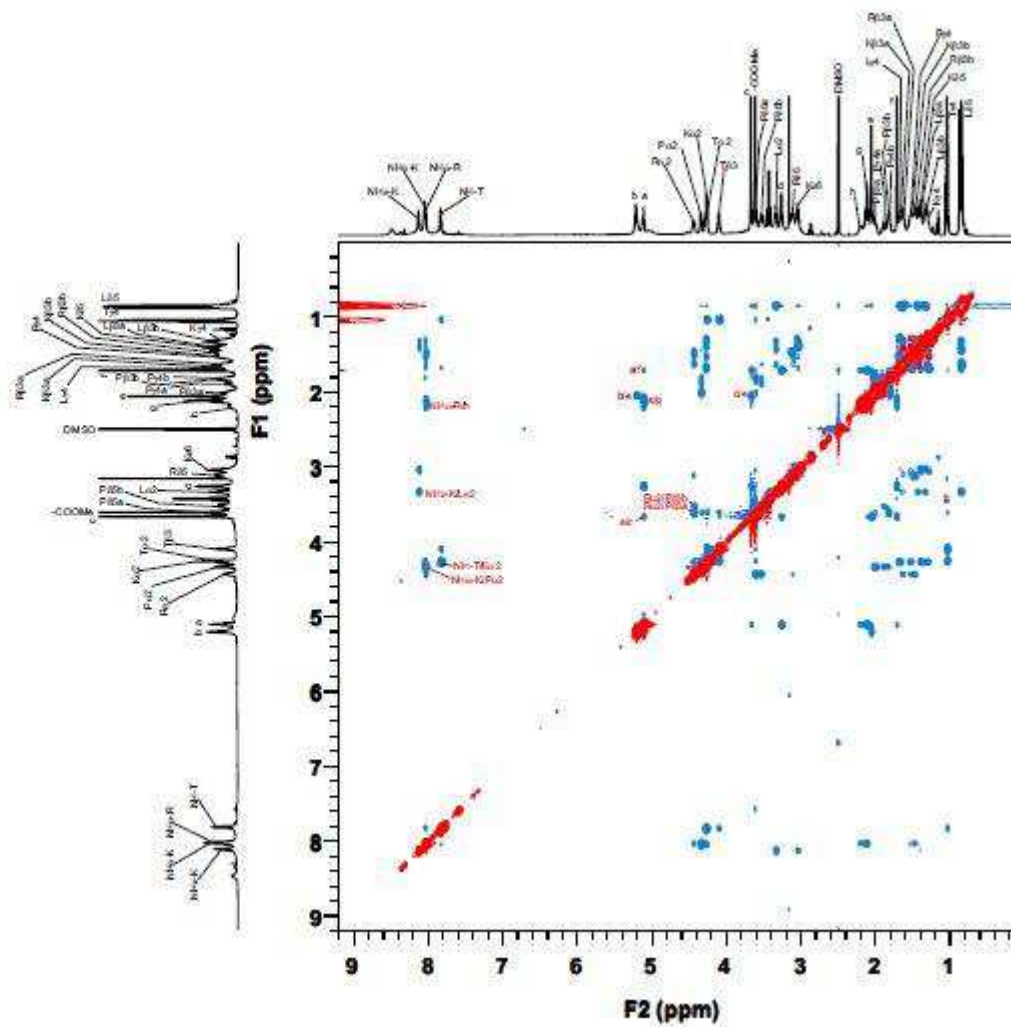


Załącznik 36. Widmo HSQC związku MPA-RT-Leu 290



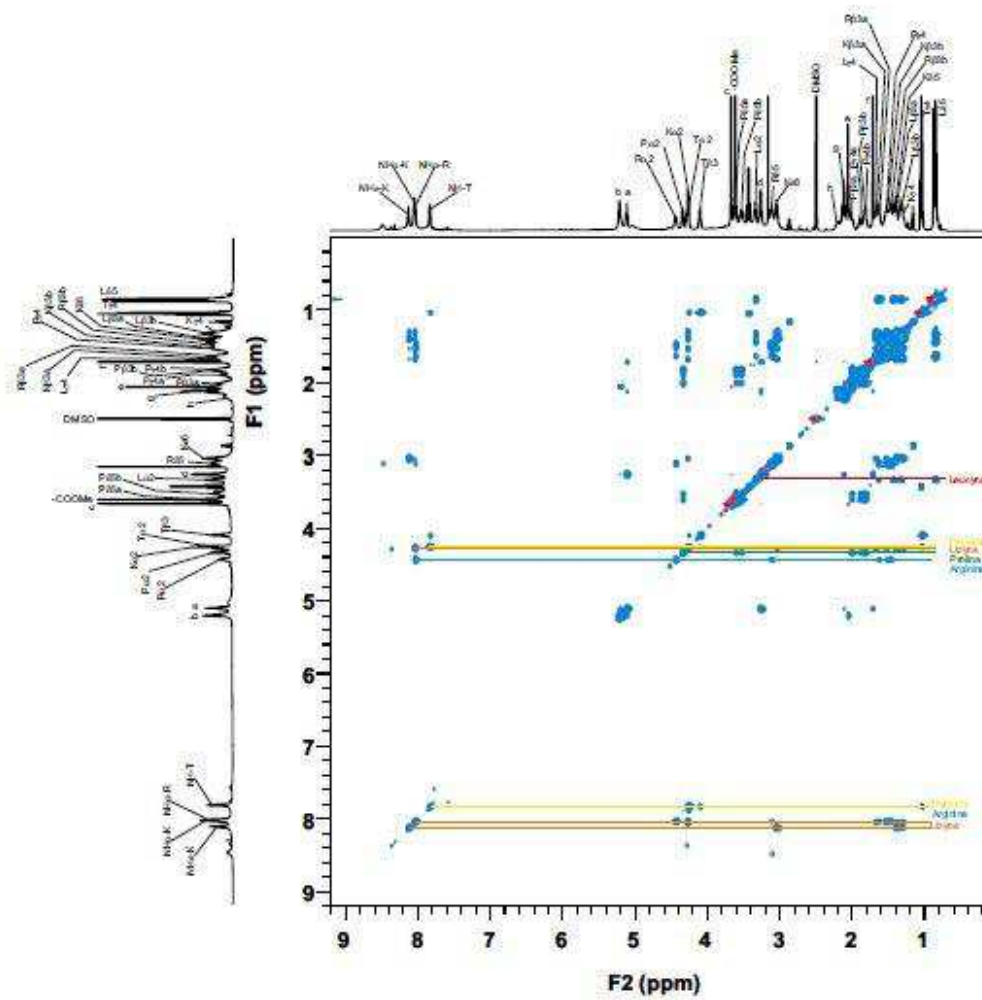
Załącznik 37. Widmo ROESY związku MPA-RT-Leu 290

MPA_RT_Leu_ROESY480



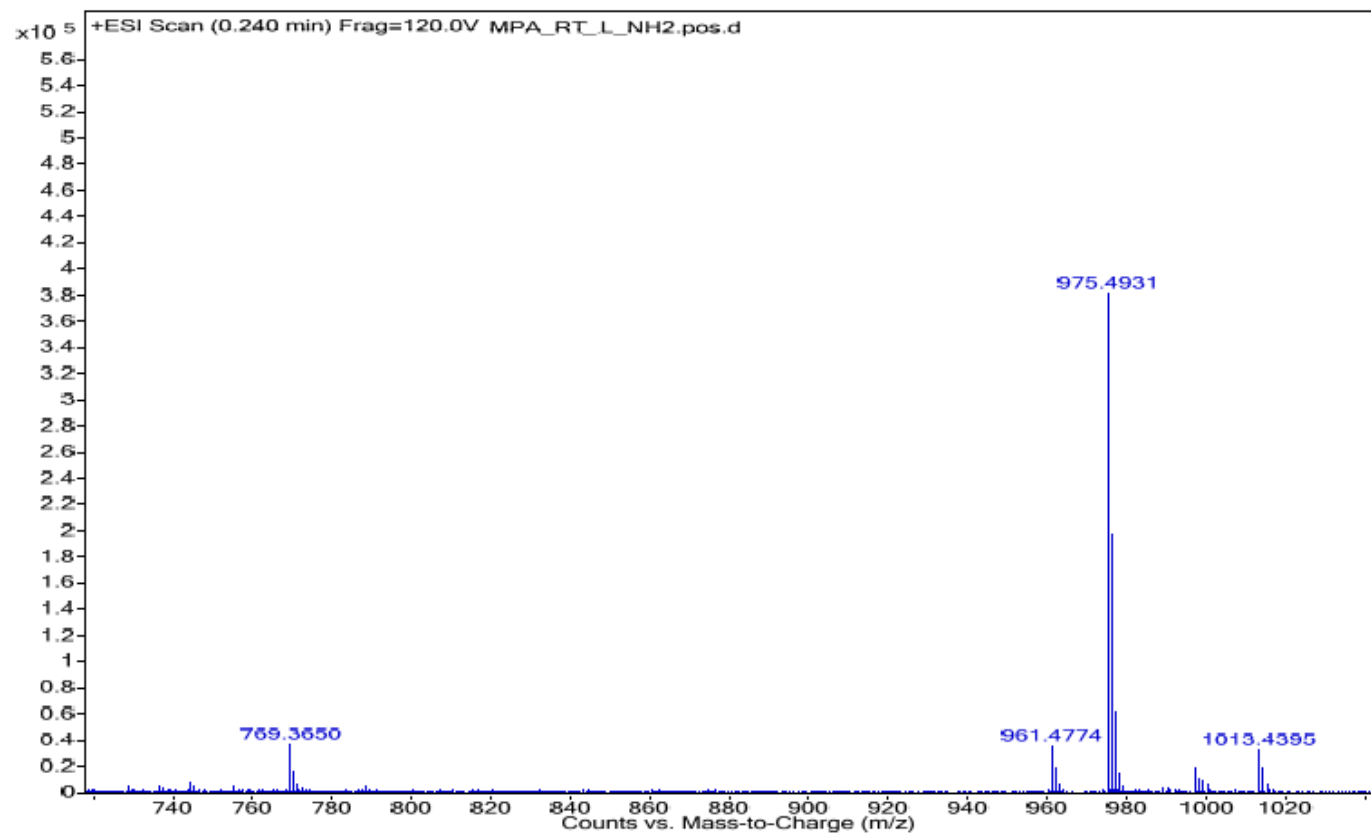
Załącznik 38. Widmo TOCSY związku MPA-RT-Leu 290

MPA_RT_Leu_zTOCSY80

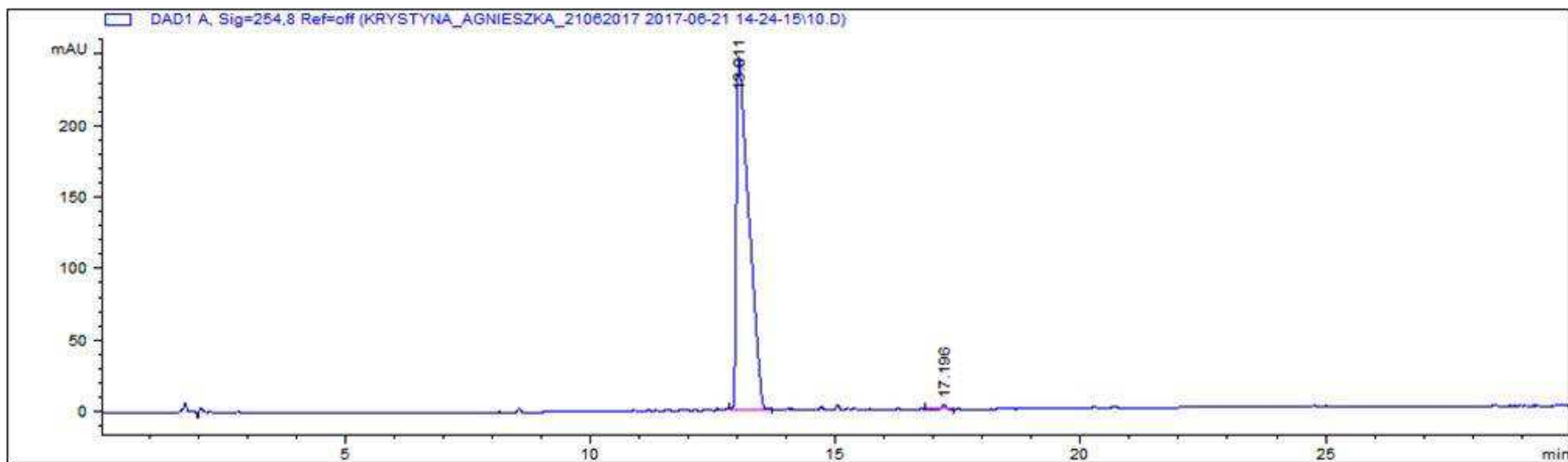


Załącznik 39. Widmo MS związku MPA-RT-Leu 290

Sample Name	MPA_RT_L_NH2.pos	Position	P1-B2	Instrument Name	Instrument 1	User Name	WH
Inj Vol	2	InjPosition		SampleType	Sample	IRM Calibration Status	All Ions Missed
Data Filename	MPA_RT_L_NH2.pos.d	ACQ Method		Comment		Acquired Time	5/13/2016 10:57:53 AM



Załącznik 40. Chromatogram związku MPA-RT-Leu 290



10 – czystość 99.5 % -MPA-RT-Leu