

Imię i nazwisko autora rozprawy: **Juliusz Maksymilian Walczak**

Dyscyplina naukowa: **Nauki Chemiczne**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim:

Synteza amidowych, estrowych i bioizosterycznych pochodnych kwasu mykofenolowego jako związków o działaniu antyproliferacyjnym

Tytuł rozprawy w języku angielskim:

Synthesis of amide, ester, and bioisosteric derivatives of mycophenolic acid as antiproliferative agents

Promotor

podpis

dr hab. inż. Grzegorz Cholewiński, prof. PG

Gdańsk, rok 2025





OŚWIADCZENIE

Autor rozprawy doktorskiej: **Juliusz Maksymilian Walczak**

Ja, niżej podpisany, oświadczam, iż jestem świadomy, że zgodnie z przepisem art. 27 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (t.j. Dz.U. z 2021 poz. 1062), uczelnia może korzystać z mojej rozprawy doktorskiej zatytułowanej: **Synteza amidowych, estrowych i bioizosterycznych pochodnych kwasu mykofenolowego jako związków o działaniu antyproliferacyjnym** do prowadzenia badań naukowych lub w celach dydaktycznych.¹

Świadomy odpowiedzialności karnej z tytułu naruszenia przepisów ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych, i konsekwencji dyscyplinarnych określonych w ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2021.478 t.j.), a także odpowiedzialności cywilno-prawnej oświadczam, że przedkładana rozprawa doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie.

Oświadczam, że treść rozprawy opracowana została na podstawie wyników badań prowadzonych pod kierunkiem i w ścisłej współpracy z promotorem **dr. hab. inż. Grzegorzem Cholewińskim, prof. PG**.

Niniejsza rozprawa doktorska nie była wcześniej podstawą żadnej innej urzędowej procedury związanej z nadaniem stopnia doktora.

Wszystkie informacje umieszczone w ww. rozprawie uzyskane ze źródeł pisanych i elektronicznych, zostały udokumentowane w wykazie literatury odpowiednimi odnośnikami, zgodnie z przepisem art. 34 ustawy o prawie autorskim i prawach pokrewnych.

Potwierdzam zgodność niniejszej wersji pracy doktorskiej z załączoną wersją elektroniczną.

Gdańsk, dnia

.....
podpis doktoranta

Ja, niżej podpisany, wyrażam zgodę na umieszczenie ww. rozprawy doktorskiej w wersji elektronicznej w otwartym, cyfrowym repozytorium instytucjonalnym Politechniki Gdańskiej.

Gdańsk, dnia

.....
podpis doktoranta

¹ Art. 27. 1. Instytucje oświatowe oraz podmioty, o których mowa w art. 7 ust. 1 pkt 1, 2 i 4–8 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, mogą na potrzeby zilustrowania treści przekazywanych w celach dydaktycznych lub w celu prowadzenia działalności naukowej korzystać z rozpowszechnionych utworów w oryginale i w tłumaczeniu oraz wielokrotnie w tym celu rozpowszechnione drobne utwory lub fragmenty większych utworów.
2. W przypadku publicznego udostępniania utworów w taki sposób, aby każdy mógł mieć do nich dostęp w miejscu i czasie przez siebie wybranym korzystanie, o którym mowa w ust. 1, jest dozwolone wyłącznie dla ograniczonego kręgu osób uczących się, nauczających lub prowadzących badania naukowe, zidentyfikowanych przez podmioty wymienione w ust. 1.





OPIS ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Autor rozprawy doktorskiej: Juliusz Maksymilian Walczak

Tytuł rozprawy doktorskiej w języku polskim: Synteza amidowych, estrowych i bioizosterycznych pochodnych kwasu mykofenolowego jako związków o działaniu antyproliferacyjnym

Tytuł rozprawy w języku angielskim: Synthesis of amide, ester, and bioisosteric derivatives of mycophenolic acid as antiproliferative agents

Język rozprawy doktorskiej: polski

Promotor rozprawy doktorskiej: dr hab. inż. Grzegorz Cholewiński, prof. PG

Data obrony:

Słowa kluczowe rozprawy doktorskiej w języku polskim: kwas mykofenolowy; amidy pierwszorzędowe; estry aryłowe; podstawienie bioizosteryczne; chemia medyczna

Słowa kluczowe rozprawy doktorskiej w języku angielskim: mycophenolic acid; primary amides; aryl esters; bioisosteric replacement; medicinal chemistry

Streszczenie rozprawy w języku polskim: Odrzucanie przeszczepów oraz leczenie chorób autoimmunologicznych pozostaje poważnym wyzwaniem w terapiach immunosupresyjnych. W związku z wysoką toksycznością polekową, obejmującą infekcje i choroby nowotworowe, a także niezadowalającą skutecznością leczenia, konieczne jest poszukiwanie nowych rozwiązań. Jednym z nich są modyfikacje strukturalne cząsteczki kwasu mykofenolowego (**MPA**) będącego substancją aktywną stosowanego klinicznie immunosupresantu. Na podstawie danych literaturowych i własnych badań *in silico*, zaprojektowałem, otrzymałem i scharakteryzowałem 49 nowych pochodnych **MPA**. Serie tych związków obejmują *N*-heterocykliczne amidy zbudowane z rdzeni benzo[d]tiazolu, benzo[d]oksazolu, benzo[d]-1*H*-imidazolu lub 2-metylopirymidyny, estry naturalnych fenoli, takich jak np. keton malinowy czy eugenol, a także bioizostery oparte o układ 1,3,4- czy też 1,2,4-oksadiazolowy. Wstępne badania aktywności biologicznej wykazały, iż związki te są inhibitorami dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny (IMPDH), podobnie do **MPA**, a większość z nich jest mniej od niego cytotoksyczna, w warunkach *in vitro*, wobec ludzkich jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC) oraz T-Jurkat (model immunosupresyjny). Ponadto, dla wybranych związków zbadano aktywność przeciwutleniającą (test DPPH), przeciwnowotworową, wobec komórek raka trzustki (AsPC-1), a także inhibicję deacetylazy histonowej HDAC6.

Streszczenie rozprawy w języku angielskim: Graft rejection and treatment of autoimmune diseases are still a challenge in immunosuppressive therapies. Due to high drug toxicities, including opportunistic infections and cancerogenesis, and unsatisfactory results of remedying, new approaches are required. One concerns structural modifications of mycophenolic acid (**MPA**), an active pharmaceutical ingredient of a clinically used immunosuppressant. Based on the literature review and *in silico* studies, I designed, synthesized and characterized 49 novel **MPA** derivatives. It contains *N*-heterocyclic-based amides, bearing benzo[d]thiazole, benzo[d]oxazole, benzo[d]-1*H*-imidazole, and 2-methylpyrimidine structural cores, esters of naturally occurring phenolics, such as raspberry ketone or eugenol, and bioisosteres derived from 1,3,4- and 1,2,4-oxadiazole motifs. Preliminary studies of biological activity have shown that these derivatives were inhibitors of inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH), in a similar manner as **MPA** itself, and most of them presented reduced cytotoxicities in relation to peripheral mononuclear blood cells (PMBC) and T-Jurkat cells (model of immunosuppression). Additionally, for particular compounds, antioxidative potential (DPPH test), anticancer properties against pancreas cancer cells (AsPC-1), as well as histone deacetylase 6 (HDAC6) inhibitory features were elaborated.



Powstanie niniejszej pracy jest wynikiem wielu lat starań i zaangażowania, które nie byłyby możliwe bez wsparcia i pomocy wielu osób. Wyrazy wdzięczności kieruję do wszystkich tych, którzy swoją dobrą wolą, cierpliwością i wiedzą wspierali mnie na każdym etapie jej tworzenia.

Z całego serca chciałbym podziękować moim **Rodzicom**, Mamie Ilonie i Tacie Waldemarowi, których trud pracy zaowocował możliwością podjęcia przeze mnie tej ścieżki rozwoju. Rodzinom **Walczaków** i **Czapiewskich** — za nieustającą wiarę i zainteresowanie.

Chciałbym podziękować także mojemu **Promotorowi**, dr. hab. inż. **Grzegorzowi Cholewińskiemu**, za wszelką okazaną mi pomoc i wsparcie merytoryczne, bez którego niniejsza praca nie mogłaby powstać.

Pragnę wyrazić wdzięczność moim **Współpracownikom**, z którymi realizowałem wspólne prace, bez których taka wielopłaszczyznowa analiza właściwości fizykochemicznych i biologicznych otrzymanych koniugatów nie byłaby możliwa.

Jestem szczególnie wdzięczny **Mikołajowi** za nieocenione wsparcie, obecność, cierpliwość i motywację, które miały kluczowe znaczenie na każdym etapie pracy i stanowiły fundament w realizowaniu tego projektu.

Dodatkowo, wyrazy wdzięczności kieruję do całego zespołu **Katedry Chemii Organicznej Politechniki Gdańskiej**, a w szczególności: **Alicji** i **Olgi**, za uczynienie tej drogi mniej wyboistą.

W trakcie tego długotrwałego procesu towarzyszyła mi maksyma **ΓΝΩΘΙ ΣΑΥΤΟΝ** (*Nosce te ipsum*), uwyrażniając, że równie istotna, jak osiągnane wyniki, jest sama droga, proces poznawania siebie oraz rozwój naukowy.





Streszczenie

Odrzucenie przeszczepu pozostaje poważnym wyzwaniem w transplantologii pomimo postępu w terapiach immunosupresyjnych. Choć leki obecnie stosowane wyraźnie zminimalizowały częstość występowania wczesnej utraty przeszczepu z powodu ostrego odrzucenia, nie są one jednak skuteczne w leczeniu wariantu przewlekłego i wprowadziły nowe zagrożenia, takie jak ciężkie infekcje i nowotwory. Proces odrzucania obejmuje skomplikowane interakcje pomiędzy swoistą i nieswoistą odpowiedzią immunologiczną, przy czym kluczową rolę odgrywają w nich limfocyty T biorcy.

Udoskonalanie terapii immunosupresyjnych może mieć kluczowe znaczenie dla przezwycięzania ograniczeń obecnie stosowanych strategii klinicznych. Głównym wyzwaniem jest nadmierna immunosupresja i toksyczność polekowa, które przyczyniają się do przewlekłej dysfunkcji przeszczepu i podwyższenia ryzyka wystąpienia efektów niepożądanych.

W celu podjęcia próby redukcji skutków ubocznych wynikających ze stosowania immunosupresantów, przeprowadzono procedurę transformacji strukturalnej stosowanej klinicznie substancji aktywnej — kwasu mykofenolowego. Mykofenolany wywierają szereg poważnych efektów ubocznych u pacjentów po przeszczepie organów, a także leczonych z powodu wystąpienia niektórych chorób autoimmunologicznych. W opracowaniu tym uwaga koncentrowana jest na zjawisku podstawienia bioizosterycznego, które może doprowadzić do zmienionej farmakokinetyki i tym samym redukcji objawów niepożądanych. Strategia ta zakłada wykorzystanie badań obliczeniowych, syntezy chemicznej oraz oceny biologicznej projektowanych pochodnych w celu najlepszego określenia przydatności zastosowanych modyfikacji.

Poza przytoczoną aktywnością immunosupresyjną kwasu mykofenolowego oraz jego pochodnych, badana była także inna bioaktywność oparta na procesach karcynogenezy, a dokładniej na epigenetycznym celu molekularnym. To podejście może pozwolić na poszerzenie spektrum działania znanej już cząsteczki, w obszarze spójnym z efektami długotrwałego stosowania terapii immunosupresyjnej, czyli — rakowaceniu.

Niniejsza praca doktorska poświęcona jest przeglądowi literatury oraz badaniom z zakresu chemii medycznej, które w efekcie mają przybliżyć uzyskanie najbardziej obiecującego analogu kwasu mykofenolowego, o zredukowanej toksyczności polekowej.

Ten pierwszy fragment pokrywa zagadnienia związane z kwasem mykofenolowym, jego otrzymywaniem, bioaktywnością, a także właściwościami jego pochodnych. W dalszej kolejności omówione zostały fenolowe związki pochodzenia naturalnego w ujęciu aktywności przeciwutleniającej, która także była rozważana. Kolejno, przedyskutowane zostały aspekty otrzymywania wybranych układów heteroaromatycznych oraz ich bioaktywności, co stanowi solidny fundament pod przekształcenia bioizosteryczne, tak istotne z punktu widzenia nowoczesnej chemii medycznej. Ostatnim z aspektów teoretycznych był wątek epigenetycznego celu molekularnego, jakim są deacetylazy histonowe.

Drugi wątek, o charakterze eksperymentalnym, podzielony był na trzy poszczególne klasy pochodnych: amidy pierwszorzędowe, estry aromatyczne, a także bioizostery kwasu



mykofenolowego. Ta ostatnia klasa oparta była o struktury 1,3,4-oksadiazoli, 1,2,4-oksadiazoli, a także prostszych wariantów niecyklicznych.

Zagadnienia poruszane w ramach badania amidowych pochodnych kwasu mykofenolowego związane były z dokowaniem molekularnym, klasyczną syntezą organiczną oraz testami biologicznymi w warunkach *in vitro*. Częsteczki z tej klasy składały się z rdzenia strukturalnego kwasu mykofenolowego, do którego poprzez reakcję kondensacji dobudowany został fragment aminy, w większości przypadków, heteroaromatycznej, opartej o motyw benzo[d]tiazolu, benzo[d]oksazolu, benzo[d]-1*H*-imidazolu oraz 2-metylopirymidyny.

Związki te zostały przeanalizowane pod kątem siły wiązania z dehydrogenazą monofosforanu inozyny (IMPDH, kod PDB: 1JR1), której inhibitorem jest właśnie kwas mykofenolowy. W związku z tym, że ich wolna energia wiązania mieściła się w granicach od -9,5 do -8,7 kcal/mol (dla związku odniesienia wynosiła -7,8 kcal/mol), podjęta została próba ich otrzymania.

Dzięki zastosowaniu protokołu dehydratacji, możliwe było uzyskanie 18 związków (**A1-A18**), z wydajnościami mieszczącymi się w granicach 43-100%, gdzie większość pochodnych nie wymagała oczyszczania metodami chromatograficznymi, a jedynie odmywania otrzymanych osadów schłodzonym rozpuszczalnikiem. Pochodne te charakteryzowały się wysoką czystością i były łatwo identyfikowalne w metodach NMR i MS.

W kolejnym kroku przeanalizowano ich właściwości cytotoksyczne oraz antyproliferacyjne w odniesieniu do linii komórek T-Jurkat oraz PBMC. Wszystkie analizowane związki prezentowały obniżoną cytotoksyczność wobec zdrowych komórek (PBMC) w stosunku do odnośnikowego kwasu mykofenolowego, a tylko jedna z nich, **A2**, przedstawiła zbliżoną do niego aktywność antyproliferacyjną (współczynniki EC₅₀ wynosiły odpowiednio: 0,85 i 0,49 µM). Dodatkowo, przeprowadzony test GMP wykazał, że amidy tego typu działają według podobnego mechanizmu wobec IMPDH co kwas mykofenolowy.

Badania te pozwoliły określić, iż pochodne benzo[d]oksazolowe mogą mieć najwyższy potencjał w osiąganiu właściwości antyproliferacyjnych, przy jednocześnie obniżonej toksyczności wobec zdrowych komórek.

Analiza pochodnych estrowych była oparta na założeniu, że dobudowanie cząsteczki wykazującej właściwości antyoksydacyjne wzbogaci rdzeń kwasu mykofenolowego o unikalne właściwości przeciwutleniające. Badania te obejmowały zarówno syntezę organiczną, jak i ocenę aktywności biologicznej w warunkach *in vitro*.

Stosując protokół reakcji estryfikacji Steglicha z udziałem kwasu mykofenolowego i naturalnych fenoli, takich jak keton malinowy czy gwajakol, możliwe było otrzymanie szeregu koniugatów estrowych (**MP1-MP9** oraz **P1-P7**) z wydajnościami mieszczącymi się w granicach 12-55%. Choć konieczne było zastosowanie chromatograficznych technik oczyszczania, nie zaszła potrzeba wprowadzenia grupy ochronnej na wolną funkcję fenolową w kwasie mykofenolowym. Czystość oraz strukturę związków potwierdzono z wykorzystaniem technik NMR, HPLC oraz HR-MS.

W dalszej kolejności, pochodne te badano w warunkach testu DPPH. Związkami o najbardziej zaznaczonej aktywności antyoksydacyjnej były cząsteczki: **P7** ($IC_{50} = 0,124$ mM), **P4** ($IC_{50} = 0,308$ mM) oraz **MP9** ($IC_{50} = 0,373$ mM), przewyższając w tej własności odnośnikowy kwas mykofenolowy ($IC_{50} = 15,733$ mM) i mykofenolan mofetylu ($IC_{50} = 18,962$ mM), a także witaminę C ($IC_{50} = 0,545$ mM). Pozostałe koniugaty prezentowały umiarkowaną zdolność do zmiatania rodnika DPPH.

Na tej podstawie, najbardziej obiecujące związki przeanalizowano pod kątem cytotoksyczności wobec linii komórek AsPC-1, związanych z rakiem trzustki, szczególnie zależnym od reaktywnych form tlenu. Wyniki niniejszych badań wskazały, że każda z testowanych pochodnych jest cytotoksyczna wobec komórek AsPC-1 w tym samym rzędzie wielkości co związki odniesienia ($IC_{50} = 1,740$ μ M i $2,029$ μ M), jednak dwa rzędy wielkości słabiej niż gemcytabina ($IC_{50} = 0,025$ μ M).

Na kolejnym etapie prac określono właściwości biologiczne w odniesieniu do linii komórek T-Jurkat oraz PBMC. Niemal połowa estrów jest silniej cytotoksyczna niż cząsteczki odnośnikowe w badaniach na PBMCs. Natomiast wszystkie z analizowanych cząsteczek są mniej cytotoksyczne wobec linii komórek T-Jurkat, zwykle posiadając współczynnik IC_{50} o rząd wielkości większy niż związki referencyjne. Z przeprowadzonych eksperymentów wynika, że zdecydowana większość (12 z 16 wobec PBMCs i 14 z 16 wobec linii komórek T-Jurkat) pochodnych ma wartości EC_{50} wyższe niż te osiągane przez kwas mykofenolowy. Żaden ze wskazanych koniugatów nie przewyższa jednak aktywności mykofenolanu mofetylu w tych dwóch rodzajach eksperymentów.

Choć syntezowane związki z założenia miały charakteryzować się właściwościami antyoksydacyjnymi, ich pierwotna aktywność immunosupresyjna wynikająca z obecności rdzenia strukturalnego kwasu mykofenolowego jest nadal obserwowana. Test GMP z udziałem wybranych koniugatów estrowych wykazał, że podobnie do kwasu mykofenolowego i mykofenolanu mofetylu, są one inhibitorami IMPDH.

Ostatnią analizowaną serią związków były pochodne bioizosteryczne kwasu mykofenolowego. W tym przypadku, poprzez podstawienie bioizosteryczne rozumie się zamianę grupy karboksylowej w odpowiednik: 1,3,4-oksadiazolowy (6), 1,2,4-oksadiazolowy (6) lub niecykliczny (3). W ramach tej ostatniej podklasy mieści się opisany w literaturze kwas hydroksamowy, a także amid pierwszorzędowy oraz hydrazyd kwasu mykofenolowego, jako związki odniesienia. Wprowadzone modyfikacje strukturalne miały na celu znalezienie nowego celu molekularnego dla związków opartych na rdzeniu kwasu mykofenolowego, z jednoczesną szansą zachowania podstawowych właściwości immunosupresyjnych. Atomy azotu oraz tlenu pełnią szczególną rolę w tym opracowaniu, gdyż skupienie się na nich w kontekście zjawiska podstawienia bioizosterycznego, wynikało bezpośrednio z rezultatów otrzymanych dla pochodnej **A2** już wcześniej.

W celu określenia celu molekularnego, wykonana została analiza odwrotnego dokowania. Jej efektem jest podkreślenie deacetylazy histonowej 6 (HDAC6) i IMPDH2 jako protein, z którymi projektowane ligandy szczególnie dobrze wchodzi w interakcję. W toku badań



obliczeniowych określono także podstawowe parametry fizykochemiczne oraz biologiczne analizowanych cząsteczek (narzędzie: SwissADME).

Otrzymano 12 pochodnych cyklicznych, z wykorzystaniem protokołu odwadniającej cyklizacji. Wydajność tych przemian mieściła się w granicach 16-87% dla 1,3,4-oksadiazoli i 22-43% dla 1,2,4-oksadiazoli, i 3 warianty niecykliczne, gdzie zastosowano typowe procedury dehydratacji ($Y = 33, 60, 92\%$). Czystość oraz strukturę związków potwierdzono z wykorzystaniem technik NMR, HPLC oraz HR-MS.

Po otrzymaniu puli 15 pochodnych bioizosterycznych poddano je badaniom przesiewowym na szeregu różnych linii komórek nowotworowych. Największy potencjał cytotoksyczny wykazały pochodne **MPA-CO-NH-OH**, **134OX_3-Py** i **124OX_Fur**, choć osiągnięte wyniki są o rząd lub dwa rzędy wielkości wyższe (współczynnik CC_{50}), niż w przypadku związków odniesienia. Bioizostery niecykliczne, w ogólnym ujęciu, okazały się bardziej cytotoksyczne niż ich cykliczne odpowiedniki. Może mieć to związek z większym prawdopodobieństwem uwolnienia kwasu mykofenolowego jako substancji aktywnej farmakologicznie w środowisku badanych komórek.

Związki te są obecnie badane pod kątem inhibicji enzymu HDAC6 w Narodowym Instytucie Onkologii oraz właściwości antyproliferacyjnych na linii komórek T-Jurkat i PBMC w Gdańskim Uniwersytecie Medycznym. Otrzymanie tych wyników poskutkowałoby weryfikacją badań obliczeniowych w warunkach rzeczywistych, a także analizą wpływu zastosowanego podstawienia bioizosterycznego na podstawową aktywność antyproliferacyjną.

W toku niniejszych prac otrzymano i wstępnie zbadano metodami *in vitro* 49 pochodnych, co stanowi próbę znalezienia mniej cytotoksycznego związku immunosupresyjnego niż kwas mykofenolowy. Przydatność niektórych z nich została przeanalizowana z wykorzystaniem technik obliczeniowych. Choć żaden z koniugatów nie wykazał wyższej aktywności antyproliferacyjnej niż stosowany klinicznie kwas mykofenolowy, część z nich charakteryzuje się niższą cytotoksycznością wobec zdrowych komórek, co jest istotne w kontekście potencjalnej redukcji niepożądanych efektów ubocznych.

Abstract

Graft rejections remain a serious challenge in transplantology, despite recent advances in immunosuppressive therapies. Currently used drugs significantly reduce the incidence of early organ loss due to acute rejection, albeit they are ineffective in the treatment of chronic rejection variants, and they impose other risks such as severe opportunistic infections and malignancies. The rejection process involves complex interactions between adaptive and innate immunological responses, whereas lymphocytes T of the recipient play a key role in such a balance.

Constant improvements in immunosuppressive therapies can be crucial in overcoming the limitations of modern clinical strategies. The main challenge concerns excessive immunosuppression and drug-related toxicities which then imply chronic malfunctioning of organs and the increase in observed side effects.

For the reduction of severe side effects, resulting from immunosuppressive therapy deployment, structural transformations of clinically used mycophenolic acid were performed. Mycophenolates are known for their particular drug-related toxicities, especially for organ recipients, as well as for patients during autoimmune disease remedying. This study is focused on the bioisosteric replacement procedure that can alter the original pharmacokinetics of mycophenolic acid thus reducing its adverse events. This strategy covers computational studies, organic synthesis, as well as biological evaluation of designed drugs, based on mycophenolic acid core, to assess the effectiveness of implemented modification.

Besides the immunosuppressive properties of mycophenolic acid and its derivatives, diverse bioactivity based on carcinogenesis, especially epigenetic molecular targets, was also in demand. This approach facilitates broadening the scope of activities of this well-known drug, on the basis of the long-term application of immunosuppressive therapies and their adverse events, principally pro-oncogenic.

The present doctoral dissertation is devoted to a literature review and studies related to medicinal chemistry, which in turn would highlight the most promising analogue of mycophenolic acid, with reduced drug-related toxicity.

The first part questions the properties of mycophenolic acid, its total and biological synthesis, as well as for some of its analogues. Subsequently, aspects related to naturally occurring phenolics in the context of their antioxidative features are discussed. Next, bioactivities and the synthetic procedures of selected heteroaromatic cores are presented to provide a theoretical basis for bioisosteric replacement, which is remarkably important for modern medicinal chemistry. The last theoretical coverage refers to the epigenetic molecular targets, *i.e.* histone deacetylases.

The second, experimental part is divided into three subclasses of mycophenolic acid derivatives: primary amides, aromatic esters, and bioisosteres. The latter type concerns structural motifs such as 1,3,4-oxadiazoles, and 1,2,4-oxadiazoles, as well as simple, non-cyclic bioisosteres.

Regarding amide derivatives of mycophenolic acid, docking studies, classic organic synthesis, as well as *in vitro* biological tests are discussed. This series of compounds consists of

a mycophenolic acid structural core with an amine fragment incorporated through a condensation reaction. In most cases, the aromatic structural motifs were built on, such as benzo[d]thiazole, benzo[d]oxazole, benzo[d]-1*H*-imidazole, and 2-methylpyrimidine.

These compounds were analyzed for their binding energy to inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH, PDB code: 1JR1), the enzyme inhibited by mycophenolic acid. Given their free binding energies ranging from -9,5 to -8,7 kcal/mol, compared to -7,8 kcal/mol calculated for the reference compound, an attempt was made to synthesize them.

According to the optimized dehydration protocol, it was possible to obtain 18 compounds (**A1-A18**), with yields ranging from 43 to 100%. Notably, most of the derivatives do not require chromatographical purification methods, while merely the washing step of the obtained precipitates with cold solvents is needed. These derivatives are easily identified by NMR and MS methods and show high purity (over 95%).

Subsequently, cytotoxicity and antiproliferative properties of given amides are discussed, concerning T-Jurkat and PBMC cells. All of the analyzed compounds present lowered cytotoxicity towards healthy cells (PBMC) in relation to mycophenolic acid, while one of them, **A2**, is approximately as active as reference (EC_{50} values are 0,85 and 0,49 μ M, respectively), in T-Jurkat cells medium. Additionally, the GMP test has proven that amides act similarly to mycophenolic acid by inhibiting IMPDH.

These studies allowed for the accentuation of benzo[d]oxazole derivatives as ones with the highest potential in achieving antiproliferative properties with concomitantly reduced toxicity towards healthy cells.

The part concerning ester derivatives is based on an assumption that the incorporation of an autonomously antioxidative compound into the structural core of mycophenolic acid enriches its antioxidative properties. These studies comprise both organic syntheses and biological activity evaluation *in vitro*.

One can obtain a series of ester conjugates of mycophenolic acid (**MP1-MP9**, **P1-P7**), based on naturally occurring phenolics, such as raspberry ketone or guaiacol, employing Steglich esterification reaction protocol, with yields ranging between 12 and 55%. Although it is essential to perform chromatographical purification methods, there is no need to introduce a protective group onto free phenolic moiety in the mycophenolic acid core. The structure and purity of analyzed compounds were confirmed using NMR, HPLC, and HR-MS techniques.

All of these conjugates were then studied under DPPH test conditions and some of them exhibited the highest antioxidative potential, particularly **P7** (IC_{50} = 0,124 mM), **P4** (IC_{50} = 0,308 mM), and **MP9** (IC_{50} = 0,373 mM), which exceeded values obtained for referential mycophenolic acid (IC_{50} = 15,733 mM), mofetil mycophenolate (IC_{50} = 18,962 mM), as well as vitamin C (IC_{50} = 0,545 mM). The remaining conjugates presented moderate scavenging activity towards the DPPH radical.

On this basis, the cytotoxic profile of the most promising compounds was acquired towards the AsPC-1 cell line, which is associated with pancreatic cancer, particularly dependent on reactive oxygen species. The results give out all derivatives to be in the same order of

magnitude of cytotoxicity as references ($IC_{50} = 1,740 \mu M$ and $2,029 \mu M$), though two orders weaker than gemcitabine ($IC_{50} = 0,025 \mu M$).

In the next step, the bioactivity of ester derivatives of mycophenolic acid against T-Jurkat cells and PBMCs was measured. Almost half of them were more cytotoxic towards the healthy cells model than the reference compounds. All of them are less potent against T-Jurkat cells, typically bearing IC_{50} values one order of magnitude greater than references. Performed experiments also emphasize EC_{50} values to be greater than that achieved by mycophenolic acid for 12 out of 16 compounds towards PBMCs and 14 out of 16 against T-Jurkat cells. None of them overcame the results attained for mofetil mycophenolate in both types of experiments.

Even though given esters were meant to be potent antioxidants, their basic immunosuppressive activity, which is a result of the presence of mycophenolic acid structural core, is still observed. The GMP test results, obtained for selected conjugates, demonstrated that these compounds serve as IMPDH inhibitors, similar to mycophenolic acid and mofetil mycophenolate.

The last part of the analyzed compounds comprises bioisosteres of mycophenolic acid. By bioisosteric replacement, in this case, I understand the transformation of carboxylic acid moiety into its: 1,3,4-oxadiazole (6 examples), 1,2,4-oxadiazole (6 examples) or non-cyclic (3 examples) counterparts. Within the latter subclass, well-described hydroxamic acid is placed, as well as the primary amide or hydrazide of mycophenolic acid, and all of them serve as internal references. Structural modifications were introduced to attain a new molecular target for compounds bearing mycophenolic acid structural core, with a concomitant window of opportunity for basic immunosuppressive properties preservation. Nitrogen and oxygen atoms play a pivotal role in this study, as their significance in bioisosteric replacement was demonstrated by previous experiments conducted on **A2**.

With the aim of finding a new molecular target, reverse docking analysis was performed. Its results highlighted histone deacetylase 6 (HDAC6) and IMPDH2 as proteins with which designed ligands interact in a well-fitting manner. In the process of computational studies basic physicochemical parameters and biological features of these compounds were also assessed (with the SwissADME tool).

Twelve cyclic derivatives of mycophenolic acid were obtained, employing a dehydrative cyclization protocol. Yields of these transformations range between 16 and 87% for 1,3,4-oxadiazoles, and 22 to 44% for 1,2,4-oxadiazoles. Those achieved for non-cyclic variants, under typical dehydrative conditions, are equal to 33, 66 and 92%. The structure and purity of analyzed compounds were confirmed using NMR, HPLC and HR-MS techniques.

These bioisosteres were later on analyzed using screening tests over a wide span of various cancer cell lines. The highest cytotoxic potential is observed for **MPA-CO-NH-OH**, **134OX_3-Py**, and **124OX_Fur**, although, collected CC_{50} values are 2-3 times higher in order of magnitude than references. In general, non-cyclic bioisosteres turned out to be more cytotoxic than their cyclic counterparts. It can be associated with the superior ability of pharmaceutically



active mycophenolic acid to be released in the cell culture medium for non-complexed, linear bioisosteres.

These derivatives are currently being studied concerning their enzymatic inhibitory properties (HDAC6) at the Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, as well as antiproliferative features against T-Jurkat and PBMCs at the Medical University of Gdańsk. The outcomes of these experiments would verify HDAC6-based computational studies and establish the influence of introduced bioisosteric replacement on essential antiproliferative activity.

In this study, 49 derivatives of mycophenolic acid were successfully synthesized and preliminarily evaluated in vitro. This research serves as an attempt to identify potent lead molecules with potential immunosuppressive properties similar to those of mycophenolic acid. Their prospective utility was further analyzed through computational studies. Although none of the conjugates exhibited superior antiproliferative activity compared to mycophenolic acid, some demonstrated reduced cytotoxicity toward a healthy cell model, which could be considered a driving factor behind the further probable reduction of adverse effects.

Wykaz oznaczeń i skrótów	22
1. Wstęp	25
2. Kwas mykofenolowy (MPA)	28
2.1. Informacje ogólne	28
2.2. Metody otrzymywania	28
2.2.1. Synteza totalna	29
2.2.1.1. Metoda A. Covarrubias-Zuniga (2003).....	30
2.2.1.2. Metoda A. Barretta (2013).....	32
2.2.1.3. Metoda D. Churchilla (2018).....	34
2.2.2. Biologiczne metody otrzymywania.....	35
2.3. Mechanizm działania.....	36
2.3.1. Ogólny mechanizm działania	37
2.3.2. Zależność struktura-aktywność w aktywności immunosupresyjnej.....	40
2.3.3. Izoformy enzymu IMPDH.....	41
2.4. Właściwości biologiczne	41
2.4.1. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa	42
2.4.1.1. Właściwości przeciwbakteryjne	42
2.4.1.2. Właściwości przeciwgrzybowe	42
2.4.1.3. Właściwości przeciwwirusowe	43
2.4.2. Właściwości przeciwnowotworowe	43
2.4.3. Mykofenolan mofetylu jako modyfikator stresu oksydacyjnego	44
2.5. Zastosowanie kliniczne	45
2.5.1. Mykofenolan sodu (MPS)	46
2.5.2. Mykofenolan mofetylu (MMF)	46
2.5.3. Metabolizm leków opartych na MPA.....	47
2.5.4. Skutki uboczne	48
2.5.5. Kwas mykofenolowy a inne immunosupresanty	50
2.5.6. Kwas mykofenolowy w chorobach autoimmunologicznych.....	51
2.6. Wybrane pochodne o właściwościach biologicznych	52
2.6.1. Nukleotydy adeninowe związane z rdzeniem kwasu mykofenolowego	52
2.6.2. Anilidy kwasu mykofenolowego jako inhibitory CpIMPDPH i HsIMPDPH.....	53
2.6.3. Aminokwasowe pochodne kwasu mykofenolowego	54
2.6.4. Pochodne kwasu mykofenolowego z motywem strukturalnym kwasu hydroksamowego	55
2.6.5. Koniugat kwas mykofenolowy-kwas chinowy	56
2.6.6. Grzyby występujące w morzu jako źródło penicykwasów strukturalnie powiązanych z MPA	57
2.6.7. Estrowe i siliolowe pochodne kwasu mykofenolowego w kostniakomięsaku.....	58
3. Fenolowe związki pochodzenia naturalnego.....	59
3.1. Wstęp	59
3.2. Zależność struktura-aktywność a właściwości przeciwutleniające.....	59
3.2.1. Dominujące mechanizmy w aktywności przeciwutleniającej.....	60
3.2.2. Podstawowy podział antyoksydantów ze względu na motyw strukturalny	60
3.3. Chemiczne metody określania potencjału przeciwutleniającego	63
3.3.1. Test DPPH.....	63
3.3.2. Test ABTS	64
3.3.3. Test FRAP	65
3.3.4. Test CUPRAC	66
3.3.5. Test ORAC	67
3.3.6. Test TRAP	68
3.4. Enzymatyczne metody określania właściwości przeciwutleniających.....	69
3.4.1. Analiza aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD)	70
3.4.2. Analiza aktywności peroksydazy glutationowej (GPx)	71

3.4.3. Analiza aktywności katalazy (CAT)	72
3.4.4. Analiza aktywności oksydazy askrobinianowej	73
3.5. Aktywność biologiczna, występowanie i otrzymywanie wybranych związków fenolowych.....	74
3.5.1. Metoksyłowane fenole	75
3.5.1.1. Gwajakol	75
3.5.1.2. Syringol.....	75
3.5.1.3. Aldehyd syringowy	76
3.5.1.4. Wanilina	77
3.5.1.5. Dehydrozingeron.....	77
3.5.1.6. Zingeron.....	78
3.5.1.7. Kwas ferulowy	79
3.5.1.8. Eugenol i izoeugenol	80
3.5.2. Związki fenolowe.....	81
3.5.2.1. Sezamol	81
3.5.2.2. Tymol	81
3.5.2.3. Bakuchiol.....	82
3.5.2.4. Kwasy kumarowe	83
3.5.2.5. 4-Hydroksybenzaldehyd	84
3.5.2.6. Dehydroframbinon	84
3.5.2.7. Keton malinowy.....	85
4. Heterocykliczne motywy strukturalne.....	87
4.1. Wstęp.....	87
4.2. Metody syntezy i omówienie mechanizmów tworzenia.....	87
4.2.1. Tiazole	87
4.2.2. Benzotiazole	92
4.2.3. Benzoksazole.....	97
4.2.4. Benzimidzole	103
4.2.5. Pirymidyny	108
4.2.6. 1,2,4-Oksadiazole	114
4.2.7. 1,3,4-Oksadiazole	120
4.3. Wybrane właściwości biologiczne układów heterocyklicznych.....	125
4.3.1. Tiazole	125
4.3.2. Benzotiazole	127
4.3.3. Benzoksazole.....	128
4.3.4. Benzimidazole.....	129
4.3.5. Pirymidyny	131
4.3.6. 1,2,4-Oksadiazole	132
4.3.7. 1,3,4-Oksadiazole	133
5. Deacetylazy histonowe (HDACs).....	135
5.1. Informacje ogólne.....	135
5.2. Podział HDACs.....	136
5.3. Ogólny mechanizm działania HDACs	137
5.4. Zestawienie informacji o HDACs.....	139
5.5. Dualna inhibicja HDAC6-Hsp90	139
5.6. Inhibitory HDACs.....	140
5.6.1. Trichostatyna A (TSA).....	141
5.6.2. Worynostat (SAHA).....	142
5.6.3. Panobinostat.....	143
6. Dyskusja wyników.....	144
6.1. Uzasadnienie podjęcia tematu	144
6.2. Amidowe pochodne MPA.....	148
6.2.1. Dokowanie molekularne.....	148



6.2.2. Synteza.....	151
6.2.2.1. Amidy zbudowane z rdzenia MPA i amin heteroaromatycznych	151
6.2.2.2. Amidy zbudowane z rdzenia MPA i amin aromatycznych lub alifatycznych	154
6.2.2.3. Inne syntezy	155
6.2.3. Badania biologiczne.....	161
6.2.3.1. Aktywność cytotoksyczna w odniesieniu do linii komórek T-Jurkat oraz PBMCs	161
6.2.3.2. Aktywność antyproliferacyjna w odniesieniu do linii komórek T-Jurkat oraz PBMCs	163
6.2.3.3. Analiza apoptozy komórkowej na PMBCs	166
6.2.3.4. Test GMP	168
6.2.4. Podsumowanie	170
6.3. Estrowe pochodne MPA	171
6.3.1. Synteza.....	171
6.3.1.1. Estry zbudowane z rdzenia MPA oraz komponentu fenolowego.....	171
6.3.1.2. Synteza wybranych komponentów fenolowych.....	174
6.3.2. Test DPPH.....	178
6.3.3. Badania biologiczne.....	179
6.3.3.1. Aktywność cytotoksyczna w odniesieniu do linii komórek AsPC-1.....	180
6.3.3.2. Aktywność cytotoksyczna w odniesieniu do linii komórek T-Jurkat oraz PMBCs	181
6.3.3.3. Aktywność antyproliferacyjna w odniesieniu do linii komórek T-Jurkat oraz PMBCs	183
6.3.3.4. Wskaźnik Selektowności (SI)	185
6.3.3.5. Test GMP	187
6.3.4. Podsumowanie	188
6.4. Bioizosteryczne pochodne MPA	188
6.4.1. Odwrotne dokowanie	188
6.4.2. Dokowanie molekularne	194
6.4.2.1. HDAC6	195
6.4.2.2. IMPDH2	198
6.4.3. Komputerowe szacowanie właściwości fizykochemicznych i biologicznych	200
6.4.3.1. Parametry bazowe	200
6.4.3.2. Rozpuszczalność	202
6.4.3.3. Właściwości biologiczne	204
6.4.4. Synteza.....	206
6.4.4.1. Hydrazydy.....	206
6.4.4.2. Amidoksymy	207
6.4.4.3. Pochodne bioizosteryczne MPA oparte na rdzeniu 1,3,4-oksadiazolu	208
6.4.4.4. Pochodne bioizosteryczne MPA oparte na rdzeniu 1,2,4-oksadiazolu	212
6.4.4.5. Niecykliczne bioizostery MPA	214
6.4.4.6. Inne	216
6.4.5. Badania biologiczne.....	219
6.4.5.1. Profilowanie na szeregu linii komórek nowotworowych.....	220
6.4.5.2. Aktywność biologiczna bioizosterów w odniesieniu do linii komórek T-Jurkat oraz PBMC	223
6.4.5.3. Test enzymatyczny HDAC6.....	223
6.4.6. Podsumowanie	223
6.5. Podsumowanie	225
6.5.1. Omówienie wyników	225
6.5.2. Dotychczasowe osiągnięcia naukowe	230
6.5.2.1. Publikacje	230
6.5.2.2. Publikacje spoza tematyki pracy doktorskiej	230
6.5.2.3. Planowana aktywność publikacyjna związana z pracą dokorską	231
6.5.2.4. Zaangażowanie w projekty.....	232



6.5.2.5. Udział w stażach naukowych	232
6.5.2.6. Udział w konferencjach	232
6.5.2.7. Działalność i osiągnięcia dodatkowe	232
7. Część eksperymentalna	234
7.1. Amidowe pochodne MPA	234
7.1.1. Dokowanie molekularne	234
Przygotowanie ligandów	234
Przygotowanie białka	234
Dokowanie molekularne	234
7.1.2. Synteza	234
Informacje ogólne	234
Dane eksperymentalne zebrane dla MPA	235
Metoda A — synteza pochodnych MPA z wykorzystaniem amin heteroaromatycznych	236
Metoda B — synteza pochodnych MPA z wykorzystaniem amin alifatycznych lub aromatycznych	236
Zestawienie właściwości otrzymanych pochodnych amidowych (A1-A18)	237
Inne syntezy	247
7.1.3. Badania biologiczne	254
Materiały badawcze	254
Pożywka	254
Przygotowanie pochodnych MPA do badań	254
Izolacja PBMCs	254
Test cytotoksyczności <i>in vitro</i> z barwnikiem XTT	255
Test proliferacji <i>in vitro</i> na bazie barwnika VPD450	255
Analiza apoptozy komórkowej	256
Test GMP	256
Analiza statystyczna	256
7.2. Estrowe pochodne MPA	257
7.2.1. Synteza	257
Informacje ogólne	257
Dane eksperymentalne zebrane dla MPA	257
Dane eksperymentalne zebrane dla MMF	258
Ogólna metoda syntezy pochodnych estrowych MPA	258
Zestawienie właściwości pochodnych metoksyloowanych fenoli (MP1-MP9)	259
Zestawienie pochodnych fenoli (P1-P7)	264
Inne procedury	269
7.2.2. Aktywność antyoksydacyjna (test DPPH)	274
Materiały badawcze	274
Metodologia	274
Analiza statystyczna	274
7.2.3. Badania biologiczne	275
Linia komórek AsPC-1	275
Linia komórek T-Jurkat i PBMCs	275
7.3. Bioizosteryczne pochodne MPA	277
7.3.1. Odwrotne dokowanie	277
Przygotowanie ligandów	277
Odwrotne dokowanie	277
Analiza danych	278
7.3.2. Dokowanie molekularne	279
HDAC6	279
IMDPH II	280
7.3.3. Komputerowe szacowanie właściwości fizykochemicznych i biologicznych (SwissADME)	281



7.3.4. Synteza.....	281
Informacje ogólne.....	281
Metoda syntezy hydrazydów	282
Zestawienie właściwości hydrazydów	283
Metoda syntezy amidoksymów	284
Zestawienie właściwości amidoksymów (<i>N</i> ¹ -hydroksylowanych karboksyimidoamidów)	285
Metoda syntezy pochodnych bioizosterycznych	286
Zestawienie właściwości pochodnych 1,3,4-oksadiazolu (134OX)	287
Zestawienie właściwości pochodnych 1,2,4-oksadiazolu (124OX)	291
Metoda syntezy kwasu hydroksamowego MPA (MPA-CO-NH-OH)	294
Zestawienie właściwości kwasu hydroksamowego MPA (MPA-CO-NH-OH).....	295
Bezpośrednia metoda syntezy hydrazidu MPA (MPA-CO-NH-NH ₂).....	295
Niepośrednia metoda syntezy hydrazidu MPA (MPA-CO-NH-NH ₂).....	296
Zestawienie właściwości chronionego hydrazidu MPA (MPA-CO-NH-NHBoc)	296
Zestawienie właściwości hydrazidu MPA (MPA-CO-NH-NH ₂)	297
Metoda syntezy pierwszorzędowego amidu MPA (MPA-CO-NH ₂)	298
Zestawienie właściwości pierwszorzędowego amidu MPA (MPA-CO-NH ₂)	298
Inne syntezy	299
7.3.5. Badania biologiczne.....	303
Badania przesiewowe na serii linii komórek nowotworowych	303
Literatura	305
Wykaz rysunków	317
Wykaz schematów.....	320
Wykaz tabel.....	322
Załącznik A. Widma ¹ H i ¹³ C NMR wybranych związków.....	323
Załącznik B. Chromatogramy wysokosprawnej chromatografii cieczowej dla wybranych związków (HPLC)	344
Załącznik C. Widma mas wysokiej rozdzielczości dla wybranych związków (HR-MS)	355
Załącznik D. Cele badawcze	363

Wykaz oznaczeń i skrótów

[H]	— warunki redukujące
[O]	— warunki utleniające
1,10-phen	— 1,10-fenantrolina
1,4-D	— 1,4-dioksan
124OX	— pochodne 1,2,4-oksadiazolu
134OX	— pochodne 1,2,4-oksadiazolu
4-OH-TEMPO	— rodnik 4-hydroksy-2,2,6,6-tetrametylopiperydyn- <i>N</i> -oksylowy
Ac	— grupa acetylowa
AcOEt	— octan etylu
AcOH	— kwas octowy
ADSL	— adenylosukcynaza
ADSS	— syntaza adenylosukcynowa
AMP	— monofosforan adenozyiny
Ar	— argon (obecność gazu obojętnego)
AsPC-1	— linia komórek raka trzustki
BP	— temperatura wrzenia
bpy	— 2,2'-bipirydył
Caco-2	— ludzkie komórki gruczolakoraka jelita grubego
Capan-1	— ludzkie komórki gruczolakoraka trzustki
CC ₅₀	— 50% stężenie cytotoksyczne
CDI	— 1,1'-karbonyldiimidazol
d	— dzień (czas trwania reakcji)
DABCO	— 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan
dba	— dibenzylidenoaceton
DBU	— 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en
DCC	— <i>N,N'</i> -dicykloheksylokarbodiimid
DIPEA	— <i>N,N</i> -diizopropylometyloamina
DMAP	— 4-dimetyloaminopirydyna
DMF	— <i>N,N</i> -dimetyloformamid
DMSO	— dimetylosulfotlenek
DND-41	— linia komórek ostrej białaczki limfoblastycznej
DPQ	— 3,3',5,5'-tetra- <i>t</i> -butylodifenochinon
EC ₅₀	— 50% stężenie efektywne
EDCI	— chlorowodorek 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu
EDG	— podstawnik elektronodonorowy
EtOH	— etanol
EWG	— podstawnik elektronoakceptorowy
GMP	— monofosforan guanozyiny
GMPS	— syntaza monofosforanu guanozyiny



HATs	— enzymy z grupy acetylotransferaz histonowych
HCT-116	— linia komórek ludzkiego raka jelita grubego
HDAC6	— deacetylaza histonowa 6
HDACs	— enzymy z grupy deacetylaz histonowych
HL-60	— linia komórek ostrej białaczki promielocytowej
HOBt·H ₂ O	— monohydrat 1-hydroksybenzotriazolu
HO-NH ₃ Cl	— chlorowodorek hydroksyloaminy
HT-29	— komórki ludzkiego gruczolakoraka jelita grubego
IC ₅₀	— 50% stężenie hamujące
IMP	— monofosforan inozyny
IMPDH	— dehydrogenaza monofosforanu inozyny
IS	— wewnętrzny współczynnik selektywności (biochemia)
K562	— linia komórek białaczki
LiHMDS	— heksametylodisilazyd litu
LN-229	— linia komórek glejaka wielopostaciowego
MA	— kwas Meldruma, 2,2-dimetylo-1,3-dioksano-4,6-dion
MeCN	— acetonitryl
MesCl	— chlorek mesylu, chlorek kwasu metanosulfonowego
MG-63	— linia komórek kostniakomięsaka
MIC	— minimalne stężenie hamujące
MMF	— mykofenolan mofetylu
MNNG	— linia komórek kostniakomięsaka
MNNG/HOS	— transformowana linia komórek kostniakomięsaka
MPA	— kwas mykofenolowy
MW	— mikrofale
NAD ⁺	— dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (forma utleniona)
NADH	— dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (forma zredukowana)
NBS	— <i>N</i> -bromosukcynoimid
NCI-H460	— linia komórek wielkokomórkowego raka płuc
NHC	— karbeny <i>N</i> -heterocykliczne
NIS	— <i>N</i> -jodosukcynoimid
O.N.	— przez noc (o prowadzeniu reakcji)
P.T.	— transfer protonu, przeniesienie protonu
Pano	— panobinostat
PBMCs	— jednojądrzaste komórki krwi obwodowej
PTSA	— kwas <i>p</i> -toluenosulfonowy
Pv	— grupa piwaloilowa, grupa 2,2-dimetylopropanoilowa
PvCl	— chlorek piwaloilu, chlorek kwasu 2,2-dimetylopropanowego
Py	— pirydyna
RNS	— reaktywne formy azotu

ROS	— reaktywne formy tlenu
RT	— temperatura pokojowa
S ₈	— siarka ośmiocząłowa
SI	— współczynnik selektywności (biochemia)
T3P	— cykliczny bezwodnika kwasu propanofosfonowego
TBDMS	— grupa <i>t</i> -butylodimetylosililowa
TBHP	— wodoronadtlenek <i>t</i> -butylu
TBTU	— tetrafluoroboran 2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametylouroniowy
TEA	— trietyloamina
TEMPO	— rodnik 2,2,6,6-tetrametylopiperydyn- <i>N</i> -oksyłowy
TEMPOH	— <i>N</i> -hydrokso-2,2,6,6-tetrametylopiperydyna
TFA	— kwas trifluorooctowy
THF	— tetrahydrofuran
T-Jurkat	— linia komórek białaczki limfocytowej
Tos	— grupa 4-metylobenzenosulfonowa
vis	— światło widzialne
XMP	— monofosforan ksantozyny
XPhos	— dicykloheksylo[2',4',6'-tris(propan-2-yl)[1,1'-bifenylo]-2-yl]fosfan
Y	— wydajność procentowa (reakcji)
Z-138	— linia komórek ostrej białaczki limfoblastycznej

1. Wstęp

Przeszczepianie narządów odgrywa kluczową rolę w medycynie akademickiej na całym świecie i stało się podstawową metodą leczenia, ratującą i przedłużającą życie w różnych stanach klinicznych. Nerki, serce, wątroba, płuca i trzustka należą do najważniejszych organów przeszczepianych rutynowo, ale istnieje także wiele innych układów, które nie przyciągają takiej uwagi opinii publicznej, a są nimi: jelito cienkie, skóra, więzadła, kości i rogówka. Transplantację tych ostatnich wykorzystuje się w celu zapewnienia tymczasowej lub trwałej ulgi w różnych schorzeniach. W ogólnym ujęciu, transplantacja ratuje, przedłuża i podnosi jakość życia. Dla przykładu, udowodniono, że przeszczepienie nerki zapewnia większą przeżywalność niż hemodializa, czemu towarzyszy wyraźna poprawa dobrostanu pacjenta.

Przeszczep jest jedną z najbardziej złożonych procedur medycznych, jakie człowiek jest w stanie wykonać, a podkreśla to wiele kwestii, nie tylko związanych z aspektami technicznymi. Należą do nich: dopasowanie immunologiczne, kwestie etyczne, religijne i kulturowe oraz sposób zarządzania i transportu. Nie bez znaczenia pozostaje także problematyka określenia momentu śmierci pnia mózgu, która stanowi jeden z najbardziej kontrowersyjnych i trudnych aspektów etycznych w medycynie, na który właśnie wpływają odmienne perspektywy kulturowe i religijne, co jest tak istotne przy pozyskiwaniu organów do przeszczepu [1].

Odrzucenie przeszczepu narządów litych pozostaje poważnym wyzwaniem w transplantologii, pomimo postępu w terapiach immunosupresyjnych. Ostre odrzucenie alloprzeszczepu, stanowiące istotną barierę dla jego długoterminowego zachowania, nie tylko zwiększa ryzyko stanu zwanego przewlekłym odrzuceniem, ale także znacznie skraca jego żywotność. Chociaż leki immunosupresyjne skutecznie zminimalizowały częstość występowania wczesnej utraty przeszczepu, z powodu ostrego odrzucenia, nie są one jednak skuteczne w leczeniu przewlekłego odrzucania i wprowadziły nowe zagrożenia wtórne, takie jak ciężkie infekcje i nowotwory. Proces odrzucania obejmuje skomplikowane interakcje pomiędzy swoistą i nieswoistą odpowiedzią immunologiczną, przy czym kluczową rolę odgrywają w nich limfocyty T biorcy. Poprzez zjawisko allo-rozpoznawania, komórki T identyfikują antygeny pochodzące od dawcy, co prowadzi do ich aktywacji, proliferacji i różnicowania, tworząc komórki efektorowe, które migrują do przeszczepu i powodują uszkodzenie tkanki. Co więcej, limfocyty T CD4, podgrupa limfocytów T, ułatwiają limfocytom szpikozależnym (limfocytom B) wytwarzanie alloprzeciwciał potęgując odpowiedź immunologiczną przeciwko przeszczepowi. Mechanizmy te podkreślają złożoność procesu odrzucania przeszczepu i ciągłą potrzebę udoskonalenia strategii terapeutycznych [2].

Stosowanie terapii immunosupresyjnej znacząco zwiększa ryzyko rozwoju nowotworów złośliwych, w tym chłoniaków nieziarniczych oraz nowotworów płuc, wątroby i nerek. Inne nowotwory złośliwe, takie jak nowotwory jelita grubego, pęcherza moczowego, tarczycy, skóry oraz nowotwory przewodu pokarmowego (trzustka, przełyk, przewód żółciowy i jelito cienkie), a także nowotwory hematologiczne (ostre nowotwory złośliwe, przewlekła białaczka szpikowa), również obserwuje się ze znaczną częstością. Uważa się, że przyczyny zwiększonego ryzyka

nowotworu są wieloczynnikowe i obejmują reaktywację i proliferację wirusów onkogennych oraz upośledzony system nadzoru immunologicznego z powodu długotrwałej immunosupresji [3].

Udoskonalanie terapii immunosupresyjnych będzie miało kluczowe znaczenie dla przezwyciężenia ograniczeń obecnie stosowanych strategii klinicznych. Postępy te powinny koncentrować się na ograniczeniu znaczących skutków ubocznych związanych z istniejącymi lekami immunosupresyjnymi. Można to osiągnąć poprzez rozwój nowych, bardziej selektywnych leków, lepiej tolerowanych przez pacjentów, a także ciągłą optymalizację istniejących protokołów leczenia. Takie ulepszenia mają na celu zapewnienie skuteczniejszej immunosupresji przy jednoczesnej minimalizacji działań niepożądanych, co ostatecznie prowadzi do lepszego długoterminowego przeżycia przeszczepu.

Głównym wyzwaniem w przypadku obecnych terapii jest nadmierna immunosupresja i toksyczność polekowa, które przyczyniają się do przewlekłej dysfunkcji przeszczepu i podwyższają ryzyko wystąpienia zdarzenia sercowo-naczyniowego u wielu pacjentów poddawanych leczeniu podtrzymującemu. Dodatkowo, działania niepożądane związane z tymi lekami często prowadzą do nieprzestrzegania zaleceń przez pacjenta, zwiększając ryzyko ostrego odrzucenia i powstania przeciwciał przeciwko ludzkiemu antygenowi leukocytowemu (HLA), które wiodą organizm do samozwalczania organu po transplantacji. Co ważne, obecne protokoły immunosupresyjne wykazują ograniczoną skuteczność w zapobieganiu przewlekłemu odrzuceniu za pośrednictwem przeciwciał. Stąd, ograniczenie skutków ubocznych związanych z lekami i usprawnienie zapobiegania rozwojowi przeciwciał HLA mają kluczowe znaczenie w osiąganiu lepszych, długoterminowych wyników u pacjentów po przeszczepach [4].

Poniżej zaprezentowano zestaw zagadnień odnoszących się do znanego z zastosowań klinicznych związku, jakim jest kwas mykofenolowy, który jako immunosupresant wywiera szereg poważnych skutków ubocznych u pacjentów po przeszczepie organów, a także leczonych z powodu wystąpienia niektórych chorób autoimmunologicznych [5]. W opracowaniu tym uwaga koncentrowana jest na przekształceniach strukturalnych omawianej cząsteczki, w obrębie terminalnej grupy karboksylowej, które doprowadzą do zmienionej farmakokinetyki i tym samym modyfikacji objawów niepożądanych. Strategia ta zakłada wykorzystanie badań obliczeniowych, syntezy oraz oceny biologicznej.

Dodatkowym celem badań jest poszukiwanie innych aktywności biologicznych **MPA**, szczególnie w kontekście procesów karcynogenezy. Jednym z podejść jest wprowadzenie naturalnych motywów fenolowych, znanych ze swoich właściwości antyoksydacyjnych, do struktury **MPA**. Choć działanie antyoksydacyjne nie zawsze przynosi jednoznacznie pozytywne skutki [6], takie modyfikacje mogą prowadzić do nowych potencjalnych zastosowań terapeutycznych.

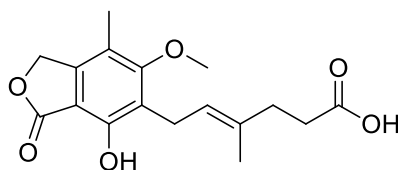
Drugą z nich jest próba wykorzystania zjawiska podstawienia bioizosterycznego w osiąganiu celu epigenetycznego jakim jest enzym z grupy deacetylaz histonowych — HDAC6. Inhibicja HDAC6, jako potencjalnego celu molekularnego stanowi obiecującą ścieżkę w poszukiwaniu nowych strategii terapeutycznych. Badanie interakcji projektowanych

bioizosterów z HDAC6 może nie tylko potwierdzić skuteczność zastosowanej metodologii, ale również wskazać nowe klasy enzymów jako cele terapeutyczne.

Dążenie do opracowania nowych analogów kwasu mykofenolowego przyczynia się do postępu w rozwoju skutecznych leków, w tym immunosupresyjnych i przeciwnowotworowych, charakteryzujących się ograniczonymi skutkami ubocznymi. Niniejsza praca w całości poświęcona jest tej tematyce i stanowi zaledwie wstęp do zrozumienia złożoności problematyki odrzutu organów po przeszczepie i mechanizmów zaangażowanych w procesy nowotworzenia.

2. Kwas mykofenolowy (MPA)

2.1. Informacje ogólne



kwas mykofenolowy
(MPA)

Rysunek 1. Wzór strukturalny kwasu mykofenolowego (MPA)

MPA (nazwa systematyczna: kwas (E)-6-(4-hydroksy-6-metoksy-7-metylo-3-okso-1,3-dihydroizobenzofuran-5-yl)-4-metyloheks-4-enowy) to związek organiczny przynależący do klasy mykotoksyn, a także meroterpenów (**Rysunek 1**). W swej strukturze posiada układ ftalidowy podstawiony długim łańcuchem bocznym pochodzenia izoprenoidowego. Jest to związek wielofunkcyjny, zbudowany z kilku grup funkcyjnych takich jak: wolna grupa karboksylowa, wolna grupa fenolowa, ugrupowanie metoksykowe, a także pierścień laktonowy. Jako związek aromatyczny, który został podstawiony w każdej dostępnej pozycji pierścienia benzenowego, ma znacznie uproszone widmo protonowe magnetycznego rezonansu jądrowego, bez sygnałów z zakresu charakterystycznego dla protonów aromatycznych, co czyni próby jego prostej funkcjonalizacji niezwykle prostymi w interpretacji tą techniką. Powyżej przedstawiony jest jego wzór strukturalny.

Po raz pierwszy został wyizolowany przez włoskiego lekarza Bartolomeo Gosio w 1893 roku z grzybów z rodziny *Penicillium* (najpewniej gatunku *brevicompactum*) w czasie jego badań nad etiologią pelagry. Związek ten można uznać za pierwszy wyizolowany i oczyszczony antybiotyk. Największy przełom w rozumieniu właściwości **MPA** przyniosły dopiero lata 90. XX wieku, gdy związek ten okazał się mieć właściwości immunosupresyjne. Wcześniej jednak, miał on szereg różnych zastosowań i był badany pod kątem właściwości antybiotycznych, między innymi przeciwko gronkowcowi złocistemu. Obecnie funkcjonuje kilka związków chemicznych będącymi pochodnymi **MPA**, które są stosowane klinicznie w profilaktyce odrzutu organów po przeszczepie. Ich zastosowanie związane jest ze słabą rozpuszczalnością i tym samym — niską biodostępnością **MPA**, zatem stanowią odpowiedź na jego pierwotne, niedoskonałe właściwości fizykochemiczne [7].

2.2. Metody otrzymywania

Otrzymywanie **MPA** to zagadnienie niezwykle ważne z punktu widzenia pozyskiwania leków stosowanych w profilaktyce odrzutu organów po przeszczepie. Synteza tak złożonego związku wielofunkcyjnego jest praktycznie nieopłacalna, wychodząc z bardzo prostych substratów, jednak stanowi istotny przegląd metod i technik stosowanych w chemii organicznej. W praktyce, związek ten obecnie pochodzi z przemysłowych procesów fermentacji, korzystających z grzybów gatunku *Penicillium brevicompactum*, które poza większą

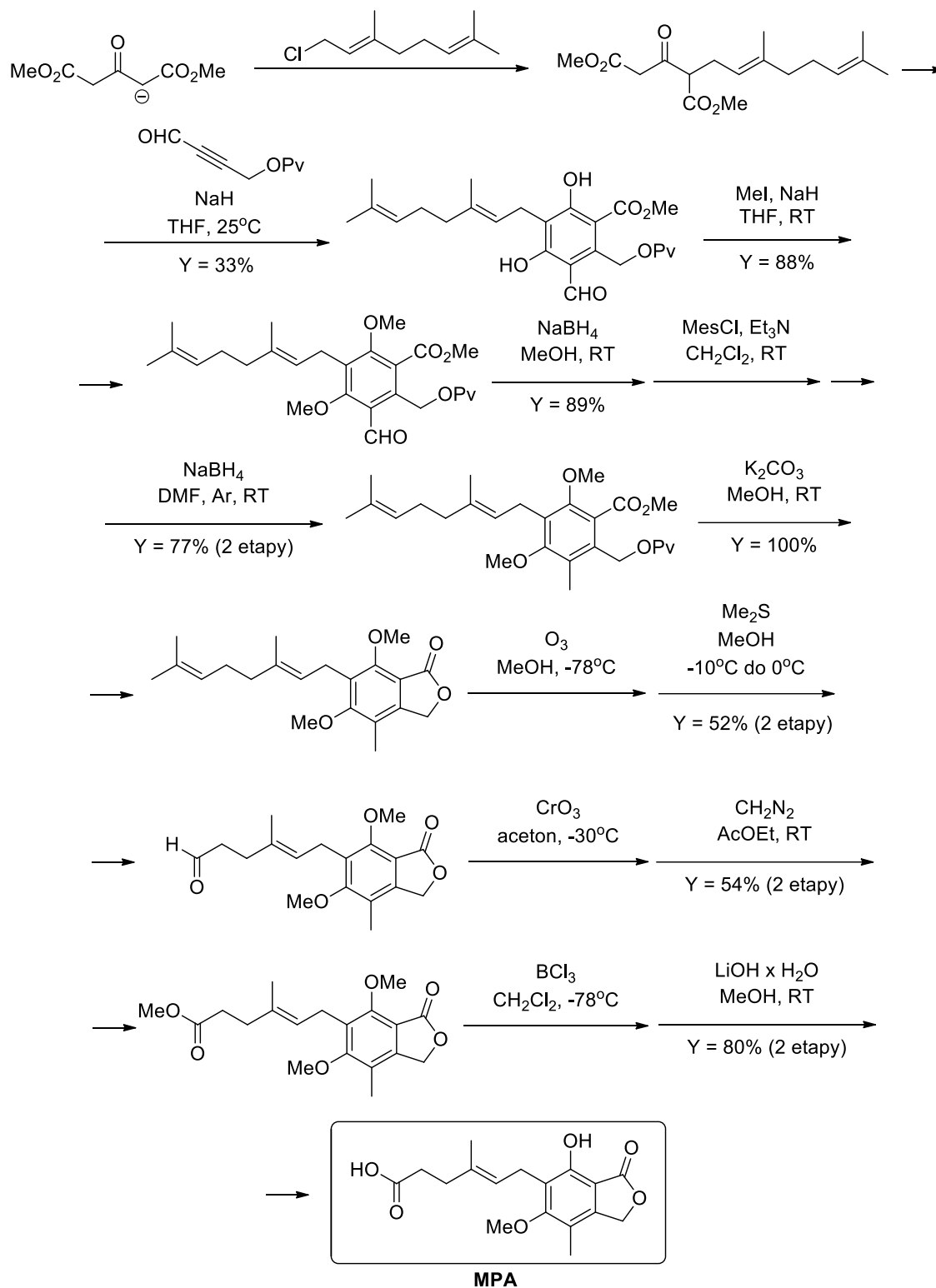
efektywnością charakteryzują się mniej negatywnym oddziaływaniem na środowisko. W tym podrozdziale znajduje się kilka przykładów metod syntezy totalnej **MPA**, a także krótki opis oparty o techniki bioinżynieryjne.

2.2.1. Synteza totalna

Synteza totalna to poddziedzina chemii organicznej, związana z próbą syntezy związków, o zwykle bardzo skomplikowanej strukturze, spotykanych w naturze. Choć jest to silnie nakładochłonna aktywność naukowa, dostarcza wielu istotnych wniosków o potencjalnych mechanizmach (bio)syntezy, a także rozwija metodologię pracy ze związkami wielofunkcyjnymi. Największym autorytetem związanym z tą dziedziną jest niewątpliwie R. B. Woodward, który za swe dokonania z zakresu syntezy organicznej (między innymi synteza chininy, cholesterolu, czy chlorofilu) został uhonorowany Nagrodą Nobla w roku 1965.

Pierwsza synteza totalna **MPA** została odnotowana w roku 1969 przez zespół A. Bircha, a prace nad udoskonaleniem i modyfikacją jej trwają do dziś. Metody te stanowią kompendium wiedzy o chemii organicznej, gdyż korzystają zarówno z historycznych, jak i nowoczesnych technik. W niniejszym punkcie rozdziału zostały przedstawione trzy najnowsze metody syntezy **MPA**, z przedstawieniem ich w formie graficznej oraz zgrubnym omówieniem poszczególnych etapów. Dla porządku, wyliczona została wydajność całkowita tych przemian, aby móc przyjąć jakiś punkt odniesienia.

2.2.1.1. Metoda A. Covarrubias-Zuniga (2003)

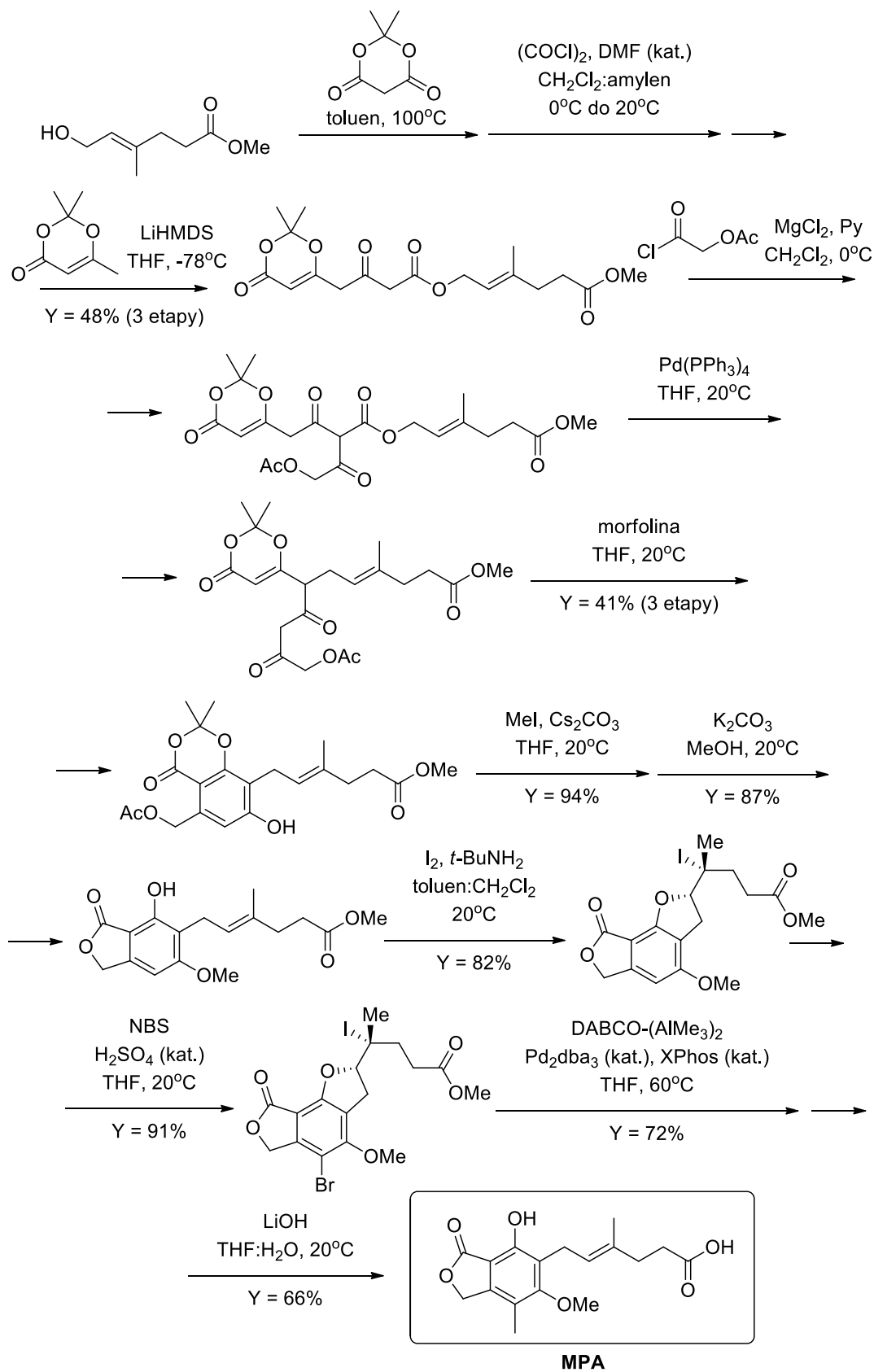


Schemat 1. Synteza totalna **MPA** opracowana przez zespół A. Covarrubias-Zuniga (2003)

Zaprezentowana powyżej (**Schemat 1**) metoda syntezy totalnej **MPA** charakteryzuje się wykorzystaniem stosunkowo łatwo dostępnych substratów, takich jak: chlorek geranylu, czy 3-oksopentano-1,5-dionian dimetylu. Reagenty te, po przeprowadzeniu alkilowania ekwiwalentu

karbonylowego, ulegają reakcji z alkynalem, tworząc związek aromatyczny, pochodną rezorcyny, w jednym kroku, z wysoką regioselektywnością. Wolne grupy fenolowe ulegają następnie alkilowaniu z wykorzystaniem jodku metylu. Wprowadzona wraz ekwiwalentem alkynowym grupa formylowa redukowana jest następnie do metylowej, korzystając z jej konwersji w alkohol typu benzyłowego, transformacji powstałego związku w ester kwasu metanosulfonowego i substytucję nukleofilową anionem wodorkowym, dostarczonym wraz z borowodorkiem sodu. Zamknięcie drugiego pierścienia — laktonowego — możliwe jest dzięki hydrolizie grup estrowych pozostających w układzie i wewnątrzcząsteczkową cyklizację, jaka obserwowana jest w wyniku ich interakcji. Łańcuch boczny skracany jest następnie z wykorzystaniem reakcji ozonolizy. Powstały aldehyd transformuje się następnie w ester metylowy na drodze: utleniania odczynnikami Jonesa i metylowania z wykorzystaniem diazometanu, bez izolacji produktu pośredniego. Selektywne rozszczepienie eteru przy pomocy trichloru boru i późniejsza hydroliza zasadowa, prowadzą do pozyskania produktu końcowego — **MPA** [8-9]. Wydajność całkowita tego wariantu syntezy totalnej **MPA**, choć nie uwzględnia pierwszego etapu alkilowania z wykorzystaniem chlorku geranylu, wynosi 4,47%.

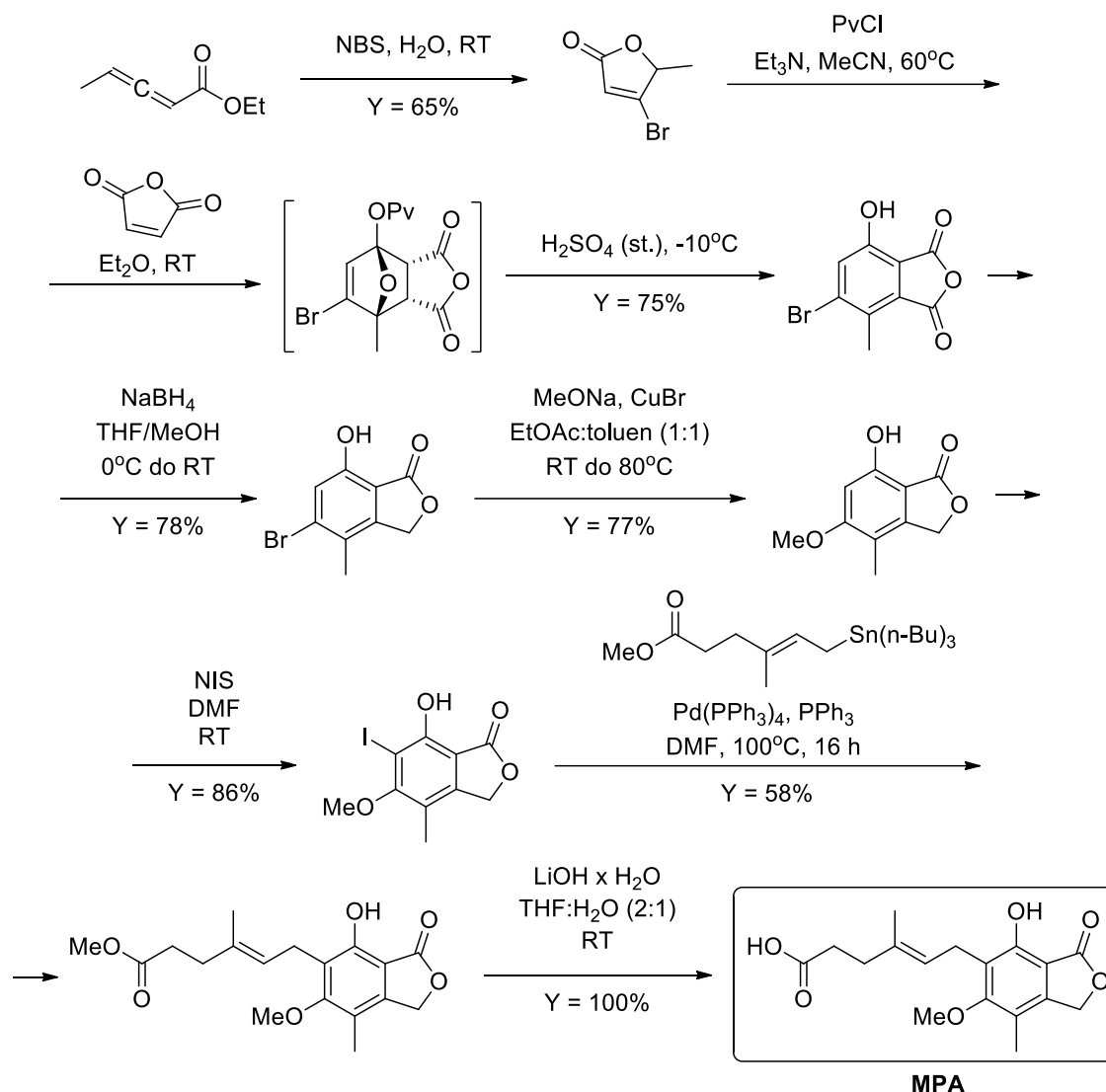
2.2.1.2. Metoda A. Barretta (2013)



Schemat 2. Synteza totalna **MPA** opracowana przez zespół A. Barretta (2013)

Niniejsza metoda (**Schemat 2**), opracowana przez zespół A. Baretta, bazująca na podejściu biomimetycznym (przypominającym w swym zamyśle drogę biosyntezy cząsteczek zachodzącą w organizmach żywych, np. grzybach), rozpoczyna się od *O*-acylowania dostępnego handlowo alkoholu allilowego kwasem Meldruma. Powstały na tym etapie półester kwasu malonowego transformowany jest w odpowiedni chlorek kwasowy. Ulega on następnie substytucji nukleofilowej w układzie acylowym, gdzie rolę nukleofila pełni karboanion 2,2,6-trimetylo-4*H*-1,3-dioksyn-4-onu, zbliżonego strukturą do kwasu Meldruma, wtórnie dostarczającego do cząsteczki wolnej grupy fenolowej oraz grupy karboksylowej składającej się na lakton (układ ftalidowy) w **MPA**. We fragmencie ketoestru dochodzi następnie do kondensacji Claisena z chlorkiem kwasu 2-acetoksyoctowego. Powstały związek ulega później reakcji dekarboksylacji katalizowanej związkiem palladu(0), gdzie dłuższy fragment alkenylowy, pochodzący od alkoholu allilowego, migruje do motywu 2,2,6-trimetylo-4*H*-1,3-dioksyn-4-onu. Morfolina katalizuje w dalszej kolejności odwadniającą reakcję cyklizacji do pochodnej rezorcynolu. Kolejno: metylowanie wolnej grupy fenolowej oraz hydroliza układu 1,3-dioksyn-4-onu, a także grupy acetoksylowej, i laktonizacja, prowadzą do powstania cząsteczki demetylowanego mykofenolanu metylu. Ze względu na trudność w uzyskaniu jodoarenu i koncepcyjne wykorzystanie go w reakcji Stillego, badacze zastosowali metodologię jodowania wiązania podwójnego w łańcuchu bocznym, która zachodzi z jednoczesną cyklizacją do chiralnego eteru. Układ taki, poddany działaniu NBS w środowisku kwasu siarkowego(VI) tworzy następnie bromoaren. Ten ostatni zaś, poddany działaniu adduktu DABCO-(AlMe₃)₂, ulega metylowaniu w pierścieniu aromatycznym, lecz także wiązanie podwójne w łańcuchu bocznym ulega odtworzeniu (z rozszczepieniem eteru chiralnego). Powstały mykofenolan metylu poddany jest następnie hydrolizie do pożądanego produktu końcowego [10, 11]. Wydajność całkowita tej syntezy totalnej wynosi 5,71%.

2.2.1.3. Metoda D. Churchilla (2018)



Schemat 3. Synteza totalna **MPA** opracowana przez zespół D. Churchilla (2018)

Synteza totalna **MPA** opracowana przez zespół D. Churchilla (**Schemat 3**) to metoda charakteryzująca się prostotą, w kontekście zredukowanej liczby etapów, a także brakiem konieczności zastosowania zabezpieczenia wolnej grupy fenolowej. Rozpoczyna się od dostępnego w handlu związku typu allenylowego, który pod wpływem NBS tworzy pochodną furan-2-onu. Jest to przemiana, w której intermediat — bromohydryna, ulega cyklizacji. W przytoczonych warunkach, furan-2-on, ulega enolizacji, jego grupa hydroksylowa zabezpieczeniu z wykorzystaniem chlorku piwaloilu, co prowadzi do wytworzenia układu furanowego, skłonnego do reakcji Dielsa-Aldera z bezwodnikiem maleinowym. Powstały związek bicykliczny poddany reakcji z kwasem siarkowym(VI) ulega odwadniającej aromatyzacji do podstawionego bezwodnika ftalowego. Jego selektywna redukcja z wykorzystaniem borowodorku sodu prowadzi do powstania istotnego elementu struktury **MPA** — ftalidu (izobenzofuran-1(3*H*)-on). Obecny w układzie podstawnik halogenkowy ulega następnie podstawieniu anionem metanolanowym, w warunkach katalizy bromkiem miedzi(I).

Wprowadzenie atomu jodu w jedyną wolną pozycję układu aromatycznego doprowadza do powstania odpowiedniej jodopochodnej aromatycznej. Ta zaś, w warunkach reakcji Stillego, pod wpływem związku cy노organicznego i katalizy związkami palladu, ulega sprzęgnięciu do estru metylowego **MPA**. Jego hydroliza zasadowa prowadzi do pożądanego produktu końcowego [10, 12]. Wydajność tej syntezy totalnej wynosi 14,60%.

2.2.2. Biologiczne metody otrzymywania

Ze względu na to, że **MPA** oraz jego proleki stosowane są na szeroką skalę w praktyce klinicznej, konieczne było opracowanie wysokowydajnej i efektywnej syntezy. Choć najnowsze doniesienia literaturowe wskazują na 14,60% wydajności całkowitej dla jego syntezy totalnej, nie jest to wartość zadowalająca, pozwalająca na wysycenie potrzeb przemysłu farmaceutycznego, a koszt reagentów niemal uniemożliwia przeniesienie syntezy ze skali laboratoryjnej na wielkoskalową. Naprzeciw wysokiemu zapotrzebowaniu wychodzi metoda biotechnologiczna, w której odpowiednio zaprojektowane organizmy produkują tę cząsteczkę w sposób przyjazny środowisku i o niższym nakładzie finansowym.

Biosynteza **MPA** obserwowana w komórkach grzybów, szczególnie z gatunku *Penicillium brevicompactum*, obejmuje szlak wykorzystujący acetylo-CoA i malonylo-CoA, jako elementy budujące układ ftalidowy, kierowany przez enzym — syntazę poliketydową (PKS) znany jako MpaC. Szlak ten obejmuje szereg reakcji tworzących szkielet tetraketydowo-poliketydowy, który ulega metylowaniu i prenylowaniu (istotne dla ukonstytuowania łańcucha bocznego), wtórnie osiągając strukturę **MPA**. Szlak ten podkreśla integrację biosyntezy poliketydów i terpenów, składającą się na bioaktywną cząsteczkę **MPA** [13].

W patencie, którego ochrona już wygasła, opisano metodę fermentacyjną wytwarzania **MPA** przy użyciu zmutowanych szczepów grzybów *Penicillium brevicompactum*. W pierwszym etapie, szczep rodzicielski, zdolny do wytwarzania **MPA**, poddaje się ekspozycji na mutageny, takie jak *N*-metylo-*N'*-nitro-*N*-nitrozoguanidyna lub promieniowanie ultrafioletowe, w celu wytworzenia mutantów odpornych na określone czynniki hamujące. Do pożywki hodowlanej dodaje się klofibrat, związek toksyczny dla pierwotnego szczepu, umożliwiając wzrost i tworzenie kolonii jedynie opornym mutantom. Niektóre z nich uodparnia się dodatkowo na inne związki chemiczne, takie jak chlorki alkilotrimetyloamoniowe, co dodatkowo zwiększa wydajność produkcji **MPA**. Ma to na celu wyselekcjonowanie wysoce odpornych szczepów, zdolnych do wysokowydajnej produkcji **MPA**.

Po selekcji, oporne mutanty grzybów *Penicillium* hoduje się w aerobowym środowisku fermentacyjnym, w specjalnie opracowanej pożywce odżywczej, która wspiera wzrost komórek i syntezę **MPA**. Pożywka bogata w glukozę, aminokwasy i sole nieorganiczne jest zoptymalizowana pod kątem rozwoju grzybów i efektywnej akumulacji **MPA** w okresie fermentacji trwającym od 6 do 14 dni. Po tym czasie, związek ekstrahuje się z pożywki hodowlanej za pomocą klasycznych technik rozdzielania, na przykład: chromatografia jonowymienna, zapewniając ekonomicznie uzasadnioną wydajność otrzymywania **MPA**, wysycając zapotrzebowanie przemysłu farmaceutycznego [14].

W literaturze można także znaleźć metodę fermentacji na fazie stałej (ang. *solid state fermentation*, SSF) z użyciem *Penicillium brevicompactum* w bioreaktorze z wypełnieniem, wykazując przewagę tej metody nad fermentacją w zanurzeniu (ang. *submerged fermentation*, SmF). W SSF jako wsad zastosowano kaszę jęczmienną (która okazała się w trakcie optymalizacji procesu lepsza niż otręby pszenne, owies, czy ryż), uzyskując znacznie wyższe stężenia **MPA** w porównaniu do SmF. Optymalne warunki dla SSF obejmowały wilgotność względną równą 70%, inkubację w temperaturze 26°C i stężenie materiału mikrobiologicznego (inokulum) równe 6%. Stężenie **MPA** osiągnięte w przypadku SSF (1219 mg/L) było około 20 razy wyższe niż w SmF. Zastosowanie substratów w fazie stałej zminimalizowało również problemy, takie jak represja kataboliczna i wysokie zapotrzebowanie na wodę, które są powszechne w fermentacjach w fazie ciekłej.

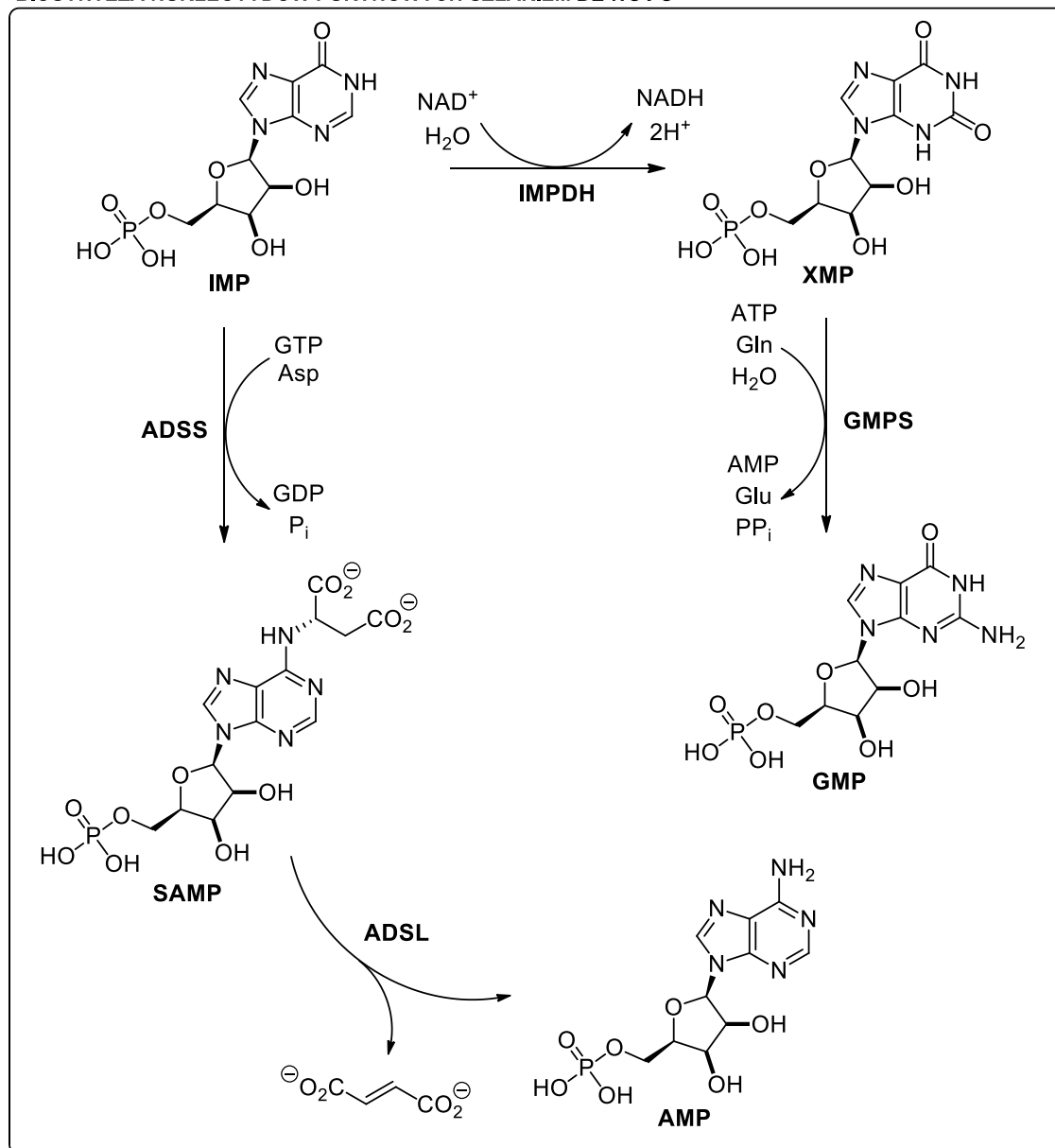
Zastosowanie bioreaktora z wypełnieniem umożliwiło lepszą dystrybucję tlenu i stabilne warunki środowiskowe, co skutkowało szczytową produkcją **MPA** wynoszącą 6882 mg/kg po 168 godzinach. Potwierdziło to potencjał aplikacyjny metody w większej skali produkcyjnej oraz skalowalność procesu SSF w syntezie **MPA**. Stanowi to obiecującą, wydajną i opłacalną alternatywę wobec SmF w produkcji wielkoskalowej, oferując także zmniejszone wymagania co do sterylności prowadzonego procesu, tak istotną dla SmF [15].

2.3. Mechanizm działania

W niniejszym podrozdziale przedstawiony został ogólny mechanizm działania **MPA** (oraz wtórnie — jego proleków), to jest: inhibicja enzymu IMPDH, załokowany w kontekście syntezy nukleotydów purynowych drogą *de novo*. Zaprezentowana została zależność struktura-aktywność dla cząsteczki **MPA** w odniesieniu do jego podstawowych właściwości immunosupresyjnych. Omówione zostały także dwie podstawowe izoformy enzymu IMPDH, ze wskazaniem typowego miejsca występowania i podkreśleniem potencjału wynikającego z projektowania leków selektywnie hamujących dany izozym. Pozwoli to na uwidocznienie elementów struktury **MPA** kluczowych dla jego właściwości antyproliferacyjnych.

2.3.1. Ogólny mechanizm działania

BIOSYNTeza NUKLEOTYDÓW PURYNOWYCH SZLAKIEM *DE NOVO*

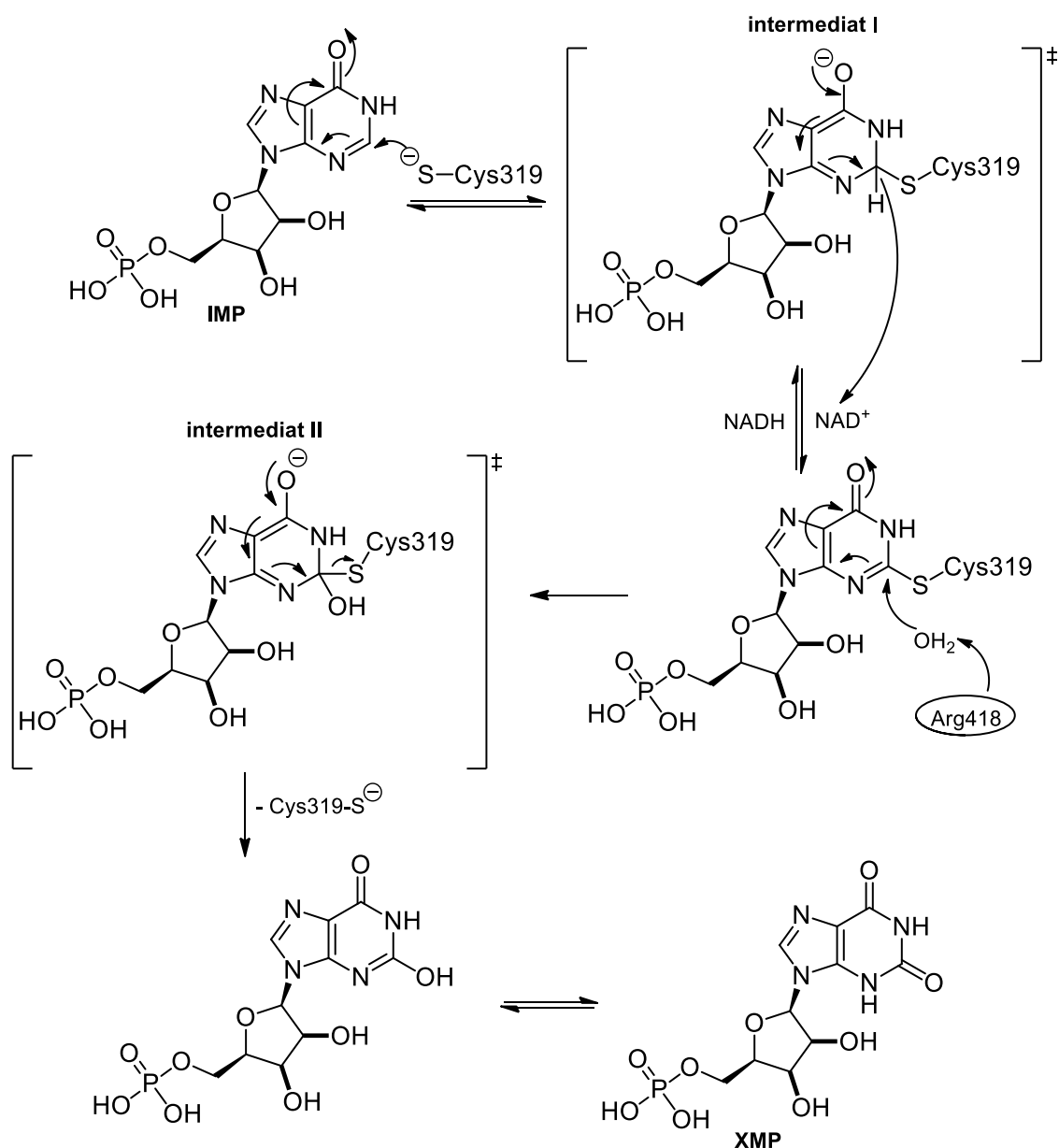


Schemat 4. Biosynteza nukleotydów purynowych szlakiem *de novo*

IMPDH (ang. *inosine-5'-monophosphate dehydrogenase*) — dehydrogenaza monofosforanu inozyny; enzym z grupy oksydoreduktaz, odpowiedzialny za transformację IMP (monofosforanu inozyny) do XMP (monofosforanu ksantyny) przy udziale NAD^+ (formy utlenionej dinukleotydu nikotynamidoadeninowego) oraz wody. Transformacja ta jest etapem pośrednim w syntezie nukleotydów guanylowych szlakiem *de novo*, na które ogromne zapotrzebowanie ma szybko wzrastająca komórka. Pomimo możliwego wykorzystania szlaku odzysku (ang. *salvage pathway*) do syntezy nukleotydów guanylowych, nie pokrywa on zapotrzebowania dynamicznie proliferujących komórek, co podkreśla jak istotny jest to enzym, szczególnie dla komórek raka, czy zainfekowanych wirusem. Biosynteza nukleotydów purynowych pełni ważną rolę w proliferacji limfocytów. Te ostatnie, np. limfocyty T i B, intensywnie się namnażają w przebiegu chorób



autoimmunologicznych, dlatego hamowanie IMPDH jest tak istotną strategią w terapiach immunosupresyjnych. Inhibicja tego enzymu może doprowadzić do przekierowania biosyntezy nukleotydów purynowych w kierunku nukleotydów adenylowych, a te ostatnie, w nadmiarze mogą hamować wtórne reakcje biochemiczne odpowiedzialne za poprawne wzrastanie komórki. Wywołanie takiej nierównowagi ma znacznie poważniejsze skutki w funkcjonowaniu komórki niż zwyczajny brak jednego z nukleotydów. **MPA** jest antykompetycyjnym (ang. *anti-competitive*, *uncompetitive*) inhibitorem IMPDH. Oznacza to, że związek ten wiąże się jedynie z przejściowym kompleksem substrat-enzym, a nie jak w przypadku inhibicji niekompetycyjnej (ang. *non-competitive*) — z enzymem niezależnie od obecności substratu [7]. Ścieżka syntezy nukleotydów purynowych przedstawiona jest powyżej (**Schemat 4**).

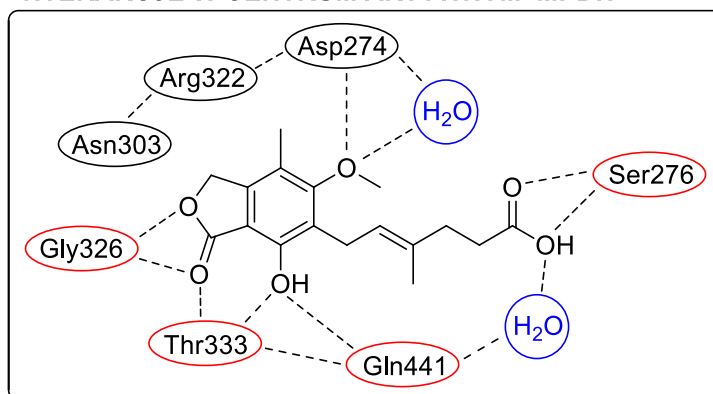


Schemat 5. Mechanizm transformacji IMP w XMP katalizowanej IMPDH

Transformacja, w której uczestniczy IMPDH, czyli przemiana IMP do XMP, biegnie przez dwa etapy: (1) przeniesienie anionu wodorkowego z IMP do NAD^+ (utlenianie) z wytworzeniem intermediatu oraz (2) następcza jego redukcja. Enzym w trakcie tych przemian dokonuje istotnych zmian konformacyjnych, z wariantu otwartego na zamknięty. Przemiany te są możliwe dzięki: migracji powstałego NADH z miejsca aktywnego i później — ruch podstruktury białka, która zbudowana jest z diady katalitycznej Arg418-Tyr419, zdolnej do katalizowania hydrolizy intermediatu II, również w miejscu aktywnym proteiny, z wytworzeniem produktu końcowego.

Mechanizm transformacji jest możliwy dzięki wykorzystaniu elementów struktury białka. Podjednostka Arg418 ma kluczowe znaczenie w aktywacji wody jako nukleofila na etapie hydrolizy, zaś Thr321 pomaga aktywować katalityczną cysteinę (Cys319) podczas etapu utleniania. Co istotne, mechanizm ten obejmuje odwracalne otwieranie i zamykanie miejsca aktywnego, a ta elastyczność konformacyjna ma kluczowe znaczenie dla zdolności enzymu do zakończenia obu reakcji. Co więcej, kationy jednododatnie, takie jak potas, pomagają w stabilizacji tych przejść konformacyjnych, dopełniając konwersję IMP do XMP [7]. Mechanizm tej transformacji przedstawiony jest powyżej (**Schemat 5**).

INTERAKCJE W CENTRUM AKTYWNYM IMPDH

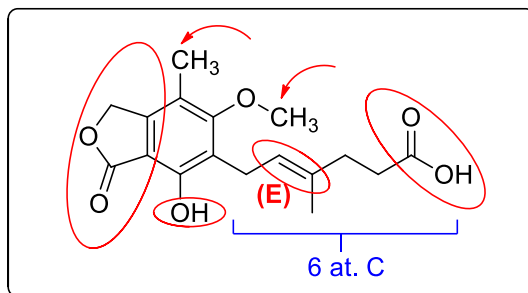


Rysunek 2. Oddziaływania niekwalencyjne w miejscu aktywnym enzymu IMPDH, w którym umieszczona została cząsteczka **MPA**

MPA jako silnym inhibitor IMPDH wiąże się z domeną nikotynamidową miejsca aktywnego i wychwytuje intermediat procesu transformacji IMP do XMP. Niemożność zajęcia hydrolizy produktu przejściowego, hamuje wytwarzanie nukleotydów guanylowych, niezbędnych do proliferacji komórek. Na podstawie analizy kryształu **MPA**-intermediat stwierdzono, że pomiędzy **MPA** a enzymem, a także wodą konstytucyjną, tworzą się liczne oddziaływania niekwalencyjne, w tym Van der Waalsa i wiązania wodorowe. Do najważniejszych oddziaływań należą: (a) wiązanie wodorowe pomiędzy atomami tlenu grupy karboksylowej laktonu z jednostką Gly326, (b) oddziaływanie pomiędzy wolną grupą fenolową i atomem tlenu grupy karbonylowej laktonu z Thr333, (c) wiązanie wodorowe pomiędzy grupą fenolową i cząsteczką wody z Gln441, (d) oddziaływanie Ser276 z grupą karboksylową **MPA**. Reszta interakcji pomiędzy elementami struktury **MPA** a podjednostkami aminokwasowymi enzymu odpowiada za stabilizację kompleksu (**Rysunek 2**) [7, 16].

2.3.2. Zależność struktura-aktywność w aktywności immunosupresyjnej

PODSUMOWANIE SAR DLA MPA



Rysunek 3. Zależność struktura-aktywność dla cząsteczki **MPA**

Struktura **MPA** może być modyfikowana na wiele różnych sposobów, jednak większość pochodnych odnotowanych w literaturze, które w wyniku transformacji biochemicznej nie uwalniały wolnej cząsteczki **MPA**, prezentowały obniżoną aktywność lub jej całkowity zanik. Należy dodać, iż odnosi się do podstawowych właściwości immunosupresyjnych **MPA**, a nie do innych, bazujących na odmiennych mechanizmach molekularnych.

Można wyróżnić kilka kluczowych elementów zależności struktura-aktywność (ang. *structure-activity relationship*, SAR), określonych w oparciu o modele zwierzęce: chłoniakomiesaka (ang. *lymphosarcoma*) mysiego oraz w odniesieniu do fibroblastów mysich. Do zachowania aktywności konieczna jest obecność wolnego ugrupowania karboksylowego w łańcuchu bocznym, a jej wymiana na układ tetrazolowy, amid pierwszorzędowy, czy grupę nitylową prowadzi do związków nieaktywnych.

Ponadto, uwodornienie wiązania podwójnego pomiędzy atomami węgla 2' i 3' w łańcuchu bocznym, doprowadziło do 15-krotnego spadku aktywności w stosunku do **MPA**, wskazując na istotność tego wiązania nienasyconego. W natywnej strukturze **MPA**, wiązanie to określone jest izomerią (*E*), a wszelkie zmiany, to jest: zastąpienie go wiązaniem podwójnym o izomerii (*Z*), wymiana na układ alkinyłowy, bądź allenylowy, a także cyklopropylowy, doprowadziły do znaczącej redukcji bioaktywności.

Do pełnej aktywności **MPA**, koniecznym jest, by grupa fenolowa w pozycji 7 pozostała niepodstawiona lub wprowadzone ugrupowanie ulegało lizie w ustroju. Podmiana wolnej grupy fenolowej na tiofenolową, modyfikacje w ramach układu laktonowego, czy zmiana długości łańcucha bocznego, drastycznie obniżają podstawową aktywność **MPA**. Podstawienie bioizosteryczne pierścienia laktonowego na odpowiedni *N*-glutarimid, także nie pozwoliło na zachowanie bazowej bioaktywności.

Podstawnik metylowy w pozycji C4 oraz metoksyłowy, C5, także odgrywa istotną rolę w aktywności **MPA**. Usunięcie tego pierwszego lub wydłużenie łańcucha węglowego w grupie metoksyłowej, lub transformowanie jej w wolną grupę fenolową, także dały związki o niskiej aktywności, około 4-15 razy mniejszej niż wzorcowy **MPA** [17].

Zakonserwowanie struktury **MPA** konieczne jest do osiągnięcia właściwości immunosupresyjnych tej cząsteczki. Jakakolwiek funkcjonalizacja możliwa jest jedynie poprzez wprowadzenie grup labilnych, które rozpadając się, wydzielają wolny **MPA**. Do takich zmian

należy transformowanie **MPA** w estry, amidy, czy też ich mniej stabilne bioizostery, choć istnieją przesłanki związane z uwalnianiem wolnych kwasów, pod wpływem działania cytochromów, z bardziej stabilnej struktury 1,3,4-oksadiazolu [18]. Na początku punktu rozdziału zamieszczona jest grafika (**Rysunek 3**) podsumowująca elementy struktury **MPA** istotne dla jego bioaktywności.

2.3.3. Izoformy enzymu IMPDH

Ludzie, a także wiele innych organizmów ssaczych, posiadają dwa geny IMPDH kodujące dwa izozymy: IMPDH1 oraz IMPDH2. Chociaż *hIMPDH1* (*h* oznacza ludzki wariant) występuje głównie w siatkówce, śledzionie i spoczynkowych komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej, obie izoformy ulegają ekspresji w różnym stopniu w większości tkanek. Z punktu widzenia istotności IMPDH, przeprowadzone zostały testy na modelu mysim, w których wykazano, że *knockout mIMPDH1* (strategia związana z inaktywacją genów, stosowana w celu określenia pełnionej przez niego funkcji) spowodował jedynie łagodną retinopatię, zaś *mIMPDH2* — śmierć w trakcie rozwoju embrionalnego. Zazwyczaj, ekspresja enzymu *hIMPDH1* utrzymana jest na niskim poziomie, podczas gdy *hIMPDH2* wzrasta podczas proliferacji i transformacji komórek, choć obserwowane są wyjątki od tej zależności.

Ponadto, inhibicja IMPDH, prowadząc do zmniejszenia się rezerwuaru nukleotydów guanylowych, podwyższa intensywność zachodzenia transkrypcji w niektórych typach komórek. Co ważne, w sytuacji, gdy limfocyty są aktywne, zarówno poziom mRNA przenoszącego informację o *hIMPDH1*, jak i *hIMPDH2* jest podwyższony, a to jest istotne z punktu widzenia używania inhibitorów IMPDH w terapiach immunosupresyjnych. Ogólnie przyjmuje się, że *hIMPDH2* jest dobrym celem molekularnym w projektowaniu terapii przeciwnowotworowych, wskazując na konieczność nacelowania nowych inhibitorów na tę izoformę, choć w literaturze można się również natknąć na takie opracowania, które wskazują, iż hamowanie samego *hIMPDH1* jest wystarczające do inhibicji procesu angiogenezy, tym samym wskazując na niejednoznaczność w tym zagadnieniu i konieczność przeprowadzenia dokładniejszych badań biologicznych.

Podstawowe warianty *hIMPDH1* i *hIMPDH2* składają się z 514 reszt aminokwasowych, wykazując aż 84% podobieństwo, i są one niemal nierozróżnialne pod względem właściwości kinetycznych. *hIMPDH1* można spotkać również w dwóch formach wydłużonych, w których białka te zawierają dodatkowe sekwencje aminokwasowe. Konieczne jest jednak dalsze, dogłębne badanie nad tymi izozymami, aby opracować specyficzne ich inhibitory, które mogłyby posłużyć w terapiach przeciwnowotworowych i immunosupresyjnych [19].

2.4. Właściwości biologiczne

Wraz z odkryciem **MPA** w grzybach, związek ten kojarzony był z właściwościami antybiotycznymi. Choć dopiero po ponad 100 latach od odkrycia znalazł swoje przeznaczenie w immunosupresji, jego zbiór zastosowań jest dość szeroki. Na szczególną uwagę zasługują własności przeciwwirusowe oraz przeciwnowotworowe, oparte często o modyfikowanie odpowiedzi układu immunologicznego, spójne z właściwościami immunosupresyjnymi.

2.4.1. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa

W tym punkcie rozdziału zaprezentowane są pokrótce właściwości przeciwdrobnoustrojowe **MPA**. Choć związek ten ma pewne właściwości przeciwbakteryjne, przeciwgrzybowe i przeciwwirusowe, nie jest on stosowany w praktyce klinicznej w zwalczaniu chorób powodowanych przez te mikroby. Jego główna bioaktywność oparta jest na potencjale immunosupresyjnym, choć przesłanki płynące z badań *in vitro* w obecności wybranych mikroorganizmów, budzą pewne nadzieje w osiąganiu efektów synergistycznych w prowadzonych terapiach zapobiegających odrzutom przeszczepów. Literatura dostarcza najwięcej przesłanek o właściwościach przeciwwirusowych **MPA**, wskazując potencjalny kierunek rozwoju tego tematu w oparciu o ten rodzaj drobnoustrojów.

2.4.1.1. Właściwości przeciwbakteryjne

Aktywność przeciwbakteryjna **MPA** była mierzona w odniesieniu do różnych szczepów bakterii. Wartości MIC jakie zostały zmierzone mieszczą się w granicach 31,25-500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Najlepszą aktywność zaobserwowano wobec gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*) oraz gronkowca skórno (Staphylococcus epidermidis), zaś pozostałe szczepy bakterii (np. *Escherichia coli*, *Schigella flexneri*) były na niego niewrażliwe [20]. Związek ten nie ma dobrze udokumentowanych właściwości przeciwbakteryjnych w literaturze.

2.4.1.2. Właściwości przeciwgrzybowe

Jedno z badań związanych z aktywnością przeciwgrzybową **MPA** zakładało pomiar wobec wybranych szczepów grzybów, w dwóch wariantach pH oraz z zastosowaniem różnych wymiarów populacji komórek grzyba do medium pomiarowego. W klasycznych warunkach pomiaru (bez dodatkowego dostosowywania pH), w odniesieniu do nystatyny, aktywność przeciwgrzybowa, wyrażona w postaci MIC mieszczącego się w graniach 3,9-31,2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, była znacząca wobec grzybów takich jak: bielnik biały (*Candida albicans*), czy też *Candida tropicalis*, zaś niska bioaktywność była obserwowana dla *Saccharomyces cerevisiae* i *Candida guilliermondi*. W tych samych warunkach pomiaru, współczynnik MIC dla nystatyny mieścił się w przedziale 0,24-7,81 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. W odniesieniu do badań w różnych pH, rozwój niektórych szczepów bielnika białego był hamowany na poziomie 6,3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ przy pH = 5,2, zaś przy pH = 7,3 nawet stężenia **MPA** równe 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ nie spowodowało zahamowania namnażania komórek grzyba. W odniesieniu do wielkości populacji grzyba — współczynnik MIC dla **MPA** w testach *in vitro* dla nitkopodstawkówki wodnej (*Cryptococcus neoformans*) wzrósł 16-krotnie, gdy wielkość populacji grzyba wzrosła z 10^7 do 10^8 komórek/mL.

W ramach tego samego badania przeprowadzono testy na modelu zwierzęcym — na śwince morskiej, która została zainfekowana grzybem *Trichophyton asteroides*. Był to test *in vitro*, gdyż zmieniona chorobowo skóra została ściągnięta ze zwierząt, a następnie zbadana poza organizmem żywym. Badania te dowiodły właściwości grzybobójczych **MPA**. Wykazano to na podstawie inkubowania fragmentów zainfekowanej skóry przez 7 dni, gdzie 77,4% próbek po tym

czasie nadal posiadała żywe komórki tego patogenu. Warto dodać, że stosowane stężenia tej substancji nie powodowały śmierci komórek skóry [20].

2.4.1.3. Właściwości przeciwwirusowe

W oparciu o przesłanki literaturowe wskazujące na skuteczność **MPA** w walce z: koronawirusem Bliskowschodniego zespołu oddechowego (MERS-CoV), ludzkim koronawirusem (HCoV-OC43 i HCoV-NL63) oraz mysim hepatowirusem (MHV), a także wirusem Denga (DENV), sugeruje się, że związek ten może wykazywać właściwości przeciwwirusowe przeciwko drugiemu koronawirusowi ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (SARS-CoV-2), którego pandemia miała miejsca w latach 2019-2022. Badania te przeprowadzono w oparciu o linię komórek VeroE6/TMPRSS2, które są wyjątkowo wrażliwe na SARS-CoV-2 i generują w interakcji z nim efekt cytotatyczny (narzędzie w badaniach nad wirusami, dostarczające informacji o replikacji wirusa i jego wpływie na komórki zdrowe). W komórkach VeroE6/TMPRSS2, które zostały zainfekowane wirusem SARS-CoV-2, wirus replikując się powoduje zniszczenie komórek i oderwanie się ich od powierzchni płytki hodowlanej, co prowadzi do utraty integralności monowarstwy. Płytki hodowlane są następnie poddawane barwieniu fioletem krystalicznym, gdzie barwieniu ulegają komórki żywe, przyczepione do płytki. W przypadku aktywności przeciwwirusowej związku wybarwienie fioletem krystalicznym będzie wyraźnie widoczne.

Określone dla tego pomiaru stężenia efektywne (EC_{50}) oraz cytotoksyczne (CC_{50}) wskazują na wysoką efektywność **MPA** i amidowego związku o nazwie IMD-0354, w warunkach komórkowych, które wynoszą kolejno 0,87 i 1,74 μM oraz powyżej 128 i 64 μM . Te ostatnie wartości prezentują niską cytotoksyczność badanych związków wobec zdrowych komórek, co wskazuje na jego potencjał aplikacyjny w walce z SARS-CoV-2. Są to najbardziej obiecujące wyniki osiągnięte dla 14 badanych pochodnych. Konieczne jest jednak przeprowadzenie bardziej dogłębnych badań, w tym takich, które określiłyby mechanizm działania przeciwwirusowego [21].

2.4.2. Właściwości przeciwnowotworowe

W literaturze da się odnaleźć badania *in vivo* wskazujące na to, że **MPA** w istotny sposób redukuje wielkość sztucznie wywołanego guza na modelu szczurzym kostniakomięsaka [22]. Na podstawie tych przesłanek, związek ten został przebadany w odniesieniu do innych leków stosowanych w praktyce klinicznej oraz badaniach podstawowych, a szczególnie do rybawiryny, teriflunomidu, azatiopryny i digoksyny, w kontekście poszukiwania nowych terapii zwalczających tę chorobę nowotworową. Ponowne wykorzystanie znanych leków to element tak zwanego zmieniania przeznaczenia leku (ang. *repurposing*), czyli strategii polegającej na znajdowaniu nowych celów molekularnych dla starych leków, których profil bezpieczeństwa (biologiczny, farmakologiczny i kliniczny) jest doskonale znany. Ma to na celu uprawdopodobnienie znalezienia nowych zastosowań znanych substancji przy jednoczesnym ominięciu kosztownych procedur projektowania i oceny biologicznej.

W niniejszym opracowaniu, wcześniej wymienione leki, a w tym **MPA**, zostały zbadane na szeregu linii komórek ludzkiego kostniakomięsaka o symbolach: MNNG/HOS, U2OS, SaOS-2, MG-63, 143B. Pośród tych wyników, **MPA** okazał się mieć najwyższą zdolność do hamowania proliferacji, wyrażoną poprzez współczynnik IC_{50} na poziomie 0,46-7,3 μM , gdzie pozostałe cząsteczki miały tę wartość o kilka rzędów wielkości większą. Dodatkowo, wartość ta mieści się w zakresie stężenia terapeutycznego **MPA**, co świadczy o tym, że lek może być skuteczny w stężeniach, które są bezpieczne dla pacjentów. Związek ten ma także zdolność do hamowania tworzenia kolonii komórek (**MPA** hamuje przetrwanie komórek w ujęciu długoterminowym), indukuje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie S i wywołuje apoptozę w komórkach kostniakomięsaka. Inny wycinek badania, odnoszący się do inwazyjności komórek raka, wykazał, że **MPA** hamuje migrację komórek kostniakomięsaka.

Opracowanie to zawierało także badania *in vivo* przeprowadzone na modelu mysim ze sztucznie wywołanym kostniakomięsakiem (143B), w odniesieniu do proleku **MPA** — mykofenolanu mofetylu, **MMF**. Dzielne dawki **MMF** znacząco hamowały wzrost guza o 57,4% i zmniejszały liczbę przerzutów do płuc u leczonych myszy. Wyniki te podkreślają potencjał **MPA/MMF** jako nowej metody leczenia kostniakomięsaka, w dawkach równoważnych poziomom nietoksycznym u ludzi, wykazującym obiecujące działanie przeciwnowotworowe i przeciwrzutowe.

Badanie to stanowi powrót do pierwotnej wersji eksperymentu [22], jednak poszerzonego o szereg linii komórek kostniakomięsaka, w odniesieniu do wielu lat badań i zastosowań klinicznych **MMF**. Konieczne jest jednak przeprowadzenie dodatkowych badań klinicznych potwierdzających skuteczność **MPA/MMF** jako alternatywnego środka do zwalczania kostniakomięsaka [23].

2.4.3. Mykofenolan mofetylu jako modyfikator stresu oksydacyjnego

Problemy jelitowo-żołądkowe to częsta przypadłość pacjentów stosujących terapię immunosupresyjną po przeszczepie narządu, a szczególnie w kontekście długoterminowym. Często stosowanymi lekami w profilaktyce odrzutu organu po transplantacji są mykofenolan mofetylu (ang. *mycophenolate mofetil*, **MMF**) oraz takrolimus (ang. *tacrolimus*, TAC) i ich zastosowanie również kojarzone jest ze zwiększoną gastrotoksycznością. W omawianym badaniu, sprawdzany był efekt cytotoksyczny obu leków, samodzielnie oraz w zestawieniu, na wybranej linii komórek nowotworowych, tu: ludzkiego raka okrężnicy, HCT116, a także jego wpływ na produkcję reaktywnych form tlenu i na potencjał błonowy mitochondrium. Wynika z nich, że oba związki, samodzielnie, hamują proliferację komórek HCT116, wzmagają produkcję wolnych rodników i peroksydację lipidów, a także indukują uszkodzenie DNA i obniżają potencjał błony mitochondrium. W zestawieniu zaś, obserwowany jest wzrost cytotoksyczności wobec HCT116 wraz ze zwiększeniem udziału TAC przy wysokich stężeniach **MMF**, zredukowany jest stres oksydacyjny wraz z dodatkiem niewielkiego stężenia TAC do wysokiej dawki **MMF** (obserwowane w teście fluorescencyjnym), a także można odnotować podobny trend w przypadku peroksydacji lipidów (badanie stężenia aldehydu malonowego). Poziom

uszkodzenia DNA przy niewielkim dodatku TAC do wysokiej dawki **MMF** jest niższy niż, gdy każdy z tych leków występuje samodzielnie, a wspólne stosowanie TAC i **MMF** powoduje podwyższenie potencjału błony mitochondrium (określone na podstawie testu fluorescencyjnego), w odniesieniu do samodzielnie stosowanych dawek tych leków, co świadczy o poprawie funkcjonowania membrany.

Powyższe badania sugerują, że TAC i **MMF** mogą pełnić dwojaką rolę, działając zarówno jako promotory stresu oksydacyjnego, jak i jako przeciwutleniacze, w zależności od ich proporcji. Pogłębia to zrozumienie toksycznego działania TAC i **MMF**, pojedynczo i w terapii skojarzonej, podkreślając znaczącą rolę stresu oksydacyjnego w indukowaniu śmierci komórek w komórkach HCT116, a także interesującą perspektywę zastosowania leków opartych na **MPA**, jako modyfikatorów komórkowych procesów redoks [24]. Obecność tego badania w podrozdziale poświęconemu właściwościom biologicznym **MPA** wynika stąd, że opisywane są tu nowe doniesienia, w warunkach badań podstawowych, odnoszące się do sprawdzonych i szeroko stosowanych w praktyce klinicznej leków. Jest to element strategii zmieniania przeznaczenia leku opisywany już wcześniej.

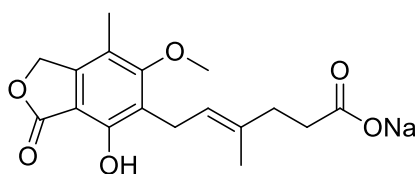
2.5. Zastosowanie kliniczne

Mykofenolan sodu (ang. *mycophenolate sodium*, **MPS**) i **MMF** są prolekami **MPA**, silnego środka immunosupresyjnego szeroko stosowanego po przeszczepie narządów, zwłaszcza nerek. **MPA** jest metabolizowany do: nieaktywnego glukuronidu fenylowego (MPAG) i farmakologicznie aktywnego glukuronidu typu acylowego (AcMPAG). Wdrożenie **MPS**, jak i **MMF** jest odpowiedzią na słabe wchłanianie i rozpuszczalność **MPA** w formie wolnego kwasu. **MMF** ulega hydrolizie w żołądku do wolnego **MPA**, natomiast **MPS** wchłania się w jelicie cienkim. Pomimo różnej kinetyki wchłaniania, oba proleki skutecznie zapobiegają proliferacji limfocytów poprzez hamowanie kluczowego dla niej enzymu — IMPDH.

Farmakokinetyka **MPA** różni się znacznie u poszczególnych osób, na co wpływają takie czynniki, jak: czynność nerek, jednoczesne podawanie z innymi lekami oraz czas po przeszczepie. **MMF** zapewnia wyższą biodostępność (około 93%) w porównaniu z **MPS** (około 72%), chociaż oba są skuteczne w przypadku stosowania wspólnie z inhibitorami kalcyneuryny. Zaleca się monitorowanie poziomu **MPA**, szczególnie we wczesnym okresie po przeszczepie, ponieważ zmieniające się poziomy **MPA** mogą prowadzić do odrzucenia go lub wtórnej toksyczności [25].

W ciągu pierwszych 2 miesięcy po przeszczepie mogą następować swoiste fluktuacje w ilości wolnego **MPA** we krwi ze względu na zwiększone ryzyko wystąpienia: hypoalbuminemii, czy niewydolności nerek, a także konieczność wprowadzenia do leczenia innych immunosupresantów, czy antybiotyków lub leków przeciwwirusowych. Obciążenie wątroby i nerek wpływa bezpośrednio na stopień związania **MPA** z białkami osocza, a więc na jego biotransformację. MPAG może ulegać odspzęganiu w jelicie grubym przez bakterie, dzięki czemu **MPA** w postaci wolnej jest w stanie powrócić do krążenia wrotnego. Powoduje to swoistą toksyczność dla układu pokarmowego [26].

2.5.1. Mykofenolan sodu (**MPS**)

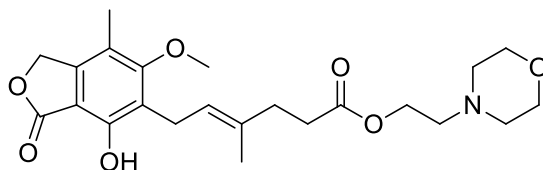


Rysunek 4. Wzór strukturalny mykofenolanu sodu (**MPS**)

MPS (Rysunek 4) to jedna z form **MPA** stosowana klinicznie w profilaktyce odrzutu organów po przeszczepie, a szczególnie po transplantacji nerki. Działa według tego samego mechanizmu molekularnego co wszystkie formy zawierające **MPA**. Jest szczególnie skuteczna w terapiach wielolekowych z wykorzystaniem inhibitorów kalcyneuryny, takich jak: cyklosporyna A, czy glikokortykosteroidów. Szczególnym typem **MPS** jest jego forma powlekana warstwą zabezpieczającą przed działaniem soku żołądkowego (ang. *enteric-coated mycophenolate sodium*, **EC-MPS**). W związku z tym, że częstym powikłaniem związanym ze stosowaniem drugiej formy **MPA** — jego estrowej pochodnej, **MMF** — są istotne problemy żołądkowe, **EC-MPS** stanowi wartościową alternatywę. Jej uwalnianie następuje dopiero w jelicie cienkim, z pominięciem aktywności żołądkowej. Taka strategia zmniejsza podrażnienie górnego odcinka przewodu pokarmowego, tym samym poprawiając dobrostan pacjentów i skuteczność terapii. Badania kliniczne III fazy wykazały, że **EC-MPS** jest tak samo skuteczny jak **MMF** w zapobieganiu ostremu odrzuceniu narządu u biorców przeszczepu nerki, przy porównywalnej skuteczności, w połączeniu z cyklosporyną A i kortykosteroidami.

Z profilu farmakokinetycznego wynika, że **EC-MPS** wchłania się z opóźnieniem, jego stężenie maksymalne osiągane jest w czasie wynoszącym od 2,0 do 2,5 godziny, a jego odpowiednik, **MMF** — od 0,9 do 1,3 godziny. Pole pod krzywą wchłaniania (ang. *area under curve*, **AUC**), które jest istotnym parametrem określającym wyeksponowanie cząsteczki i stopień jego usuwania z organizmu, jest podobne do szerzej stosowanego w praktyce klinicznej **MMF**. **EC-MPS** charakteryzuje się biodostępnością na poziomie 72%, a większość podanej dawki jest wydalana z moczem w postaci nieaktywnego metabolitu, **MPAG**. Pacjenci, którzy przeszli z **MMF** na **EC-MPS**, zgłaszali poprawę jakości życia, ze względu na zminimalizowanie objawów ze strony przewodu pokarmowego, co przemawia za jego stosowaniem jako dobrze tolerowanej alternatywy dla długotrwałej terapii immunosupresyjnej [25, 27].

2.5.2. Mykofenolan mofetylu (**MMF**)



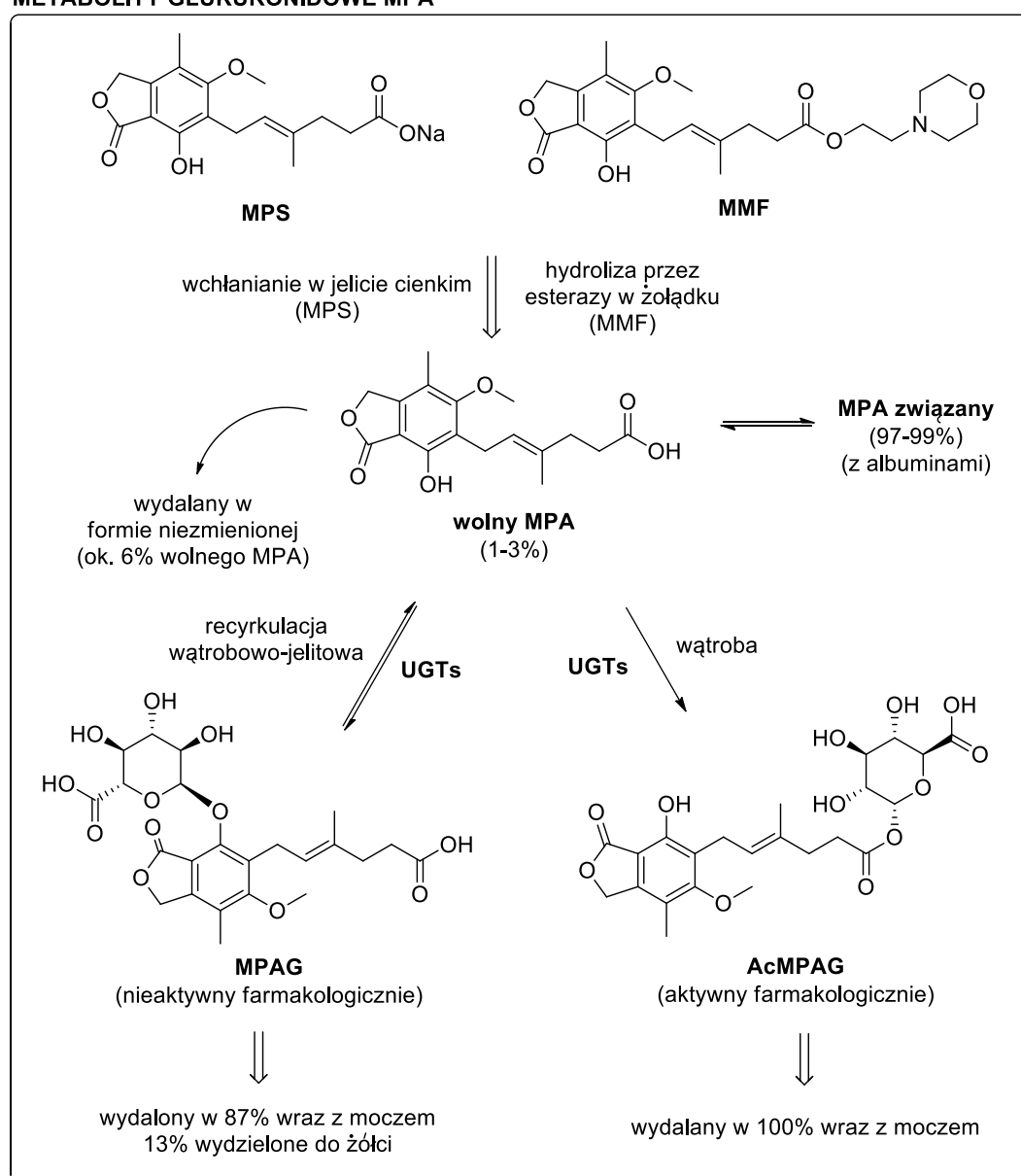
Rysunek 5. Wzór strukturalny mykofenolanu mofetylu (**MMF**)

MMF (Rysunek 5) był pierwszą zatwierdzoną formą opartą o **MPA**. Jego głównym zastosowaniem jest zapobieganie ostrym epizodom odrzucenia nerki po przeszczepie.

W porównaniu z azatiopryną (AZA), **MMF** znacząco zmniejsza ryzyko odrzutu, szczególnie w pierwszym roku po transplantacji. Dodatkowo, długotrwałe stosowanie **MMF** zmniejsza ryzyko późnych epizodów odrzutu organu, poprawiając długoterminową funkcję przeszczepionego narządu. Łączenie **MMF** z TAC zwiększa skuteczność terapii w porównaniu z innymi schematami leczenia immunosupresyjnego. Terapia oparta o **MMF** znacząco zmniejsza potrzebę podawania przeciwciał antylimfocytowych w przypadku odrzucenia przeszczepu i redukuje ryzyko jego utraty. Stosowanie **MMF** wiąże się jednak z pewnymi skutkami ubocznymi, zwłaszcza zaburzeniami żołądkowo-jelitowymi, a także zwiększonym ryzykiem infekcji oportunistycznych [27].

2.5.3. Metabolizm leków opartych na **MPA**

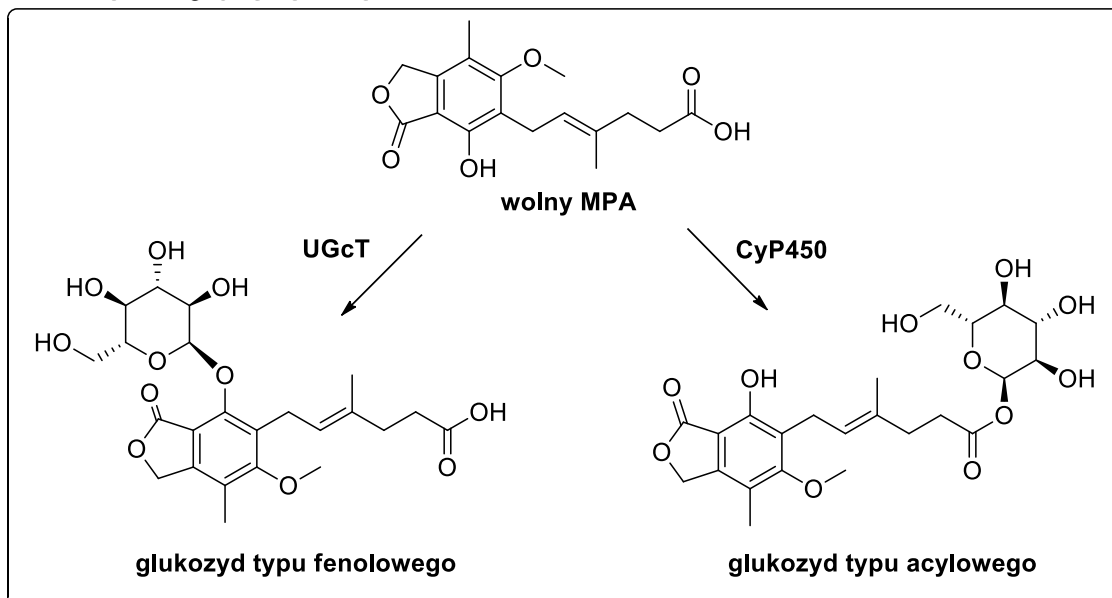
METABOLITY GLUKURONIDOWE MPA



Schemat 6. Zestawienie glukuronidów **MPA** oraz ich losy farmakologiczne

Metabolizm **MPA** jest złożony i obejmuje kilka enzymów, zwłaszcza z klasy urydyno-glukuronylotransferaz (UGTs), które odpowiedzialne są za glukuronidację **MPA** do jego głównego, nieaktywnego farmakologicznie metabolitu — fenolowego glukuronidu **MPA** (MPAG). Jednakże niektóre z nich, takie jak glukuronid typu acylowego (AcMPAG), mogą przyczyniać się do toksyczności leku i powodować działania niepożądane, zwłaszcza te, związane z zaburzeniami żołądkowo-jelitowymi i leukopenią. Warto nadmienić, iż zmienność genetyczna wśród pacjentów może wpływać na aktywność enzymu, prowadząc do różnic w ekspozycji na lek i działań niepożądanych, co podkreśla potrzebę spersonalizowanego monitorowania terapeutycznego. Dodatkowo, MPAG ulega krążeniu jelitowo-wątrobowemu (ang. *enterohepatic circulation*), co oznacza, że metabolit ten jest wraz z żółcią ponownie wydzielany do jelita. Enzymy tam obecne, β -glukuronidazy, usuwają cząsteczkę kwasu glukuronowego, uwalniając **MPA** w jelicie. Powoduje to drugie maksimum stężenia **MPA** we krwi, a także odpowiedzialne jest za gastrotoksyczność tego leku. Podstawowe informacje na temat glukuronidów **MPA** zostały przedstawione na powyższym schemacie (**Schemat 6**).

METABOLITY o-GLUKOZYDOWE MPA



Schemat 7. Zestawienie glukozydów **MPA**

Poza produktami glukuronidacji, możliwe jest także wykrycie glukozydowych metabolitów **MPA** powstałych na drodze sprzęgania, gdzie glukozyd typu fenolowego powstaje w wyniku aktywności urydylo-glukozylotransferaz (UGTs), zaś glukozyd typu acylowego — aktywności cytochromu P450. Są one jednak obecne w śladowych ilościach i nie wiąże się ich z istotną aktywnością immunosupresyjną [28-30]. Informacje na temat glukozydów **MPA** zostały przedstawione na powyższym schemacie (**Schemat 7**).

2.5.4. Skutki uboczne

MMF oraz jego aktywna forma — **MPA**, znane są z wywoływania szeregu skutków ubocznych u pacjentów przyjmujących te preparaty. Najpowszechniejsze związane są ze złym

funkcjonowaniem układu trawienia, w tym: mdłościami, wymiotami, biegunką i bólem brzucha. Inne, częste symptomy to: bóle i zawroty głowy, dreszcze i problemy z zasypianiem. Pacjenci przyjmujący preparaty oparte na **MPA**, doświadczają również problemów skórnych, takich jak: trądzik, wysypka, czy wypadanie włosów, a także: bólu stawów, wahań ciśnienia oraz zaburzeń nastroju (depresja, lęk).

Wcześniej wymienione skutki uboczne nie są jednak najbardziej dotkliwe, jednak niewątpliwie wpływają na dobrostan pacjenta w czasie terapii. Poważniejsze działania niepożądane obejmują mielotoksyczność (aktywność polegająca na uszkodzeniu komórek szpiku kostnego), co wtórnie prowadzi do zmniejszenia liczby krwinek, zwiększając ryzyko infekcji i krwawienia. Obserwowane jest również uszkodzenie nerek, manifestujące się poprzez atypowy kolor i objętość moczu. W ogólnym ujęciu, funkcje nerek i wątroby są upośledzone, zmniejszona jest liczba krwinek białych, czerwonych oraz płytek krwi, co może prowadzić do niewydolności nerek i anemii.

Ze względu na immunosupresyjny charakter leków opartych na **MPA**, pacjenci doświadczają zakażeń oportunistycznych, szczególnie: skóry, płuc i dróg moczowych. Osoby przyjmujące **MPA (MMF)** powinny unikać kontaktu z osobami przechodzącymi ospę wietrzną czy półpasiec, ponieważ mogą być bardziej podatne na ciężki przebieg tych chorób. Długotrwałe stosowanie może prowadzić do wystąpienia zmian nowotworowych, zwłaszcza skóry, dlatego konieczne jest ograniczenie nadmiernej ekspozycji na słońce. Z obniżoną aktywnością układu odpornościowego wiąże się również zachowywanie szczególnej ostrożności w spożywaniu żywności niepasteryzowanej (szczególnie produktów mlecznych), a także konieczność dokładnego mycia pokarmu, aby zminimalizować ryzyko zakażenia. Ponadto, pacjenci powinni unikać także żywych szczepionek.

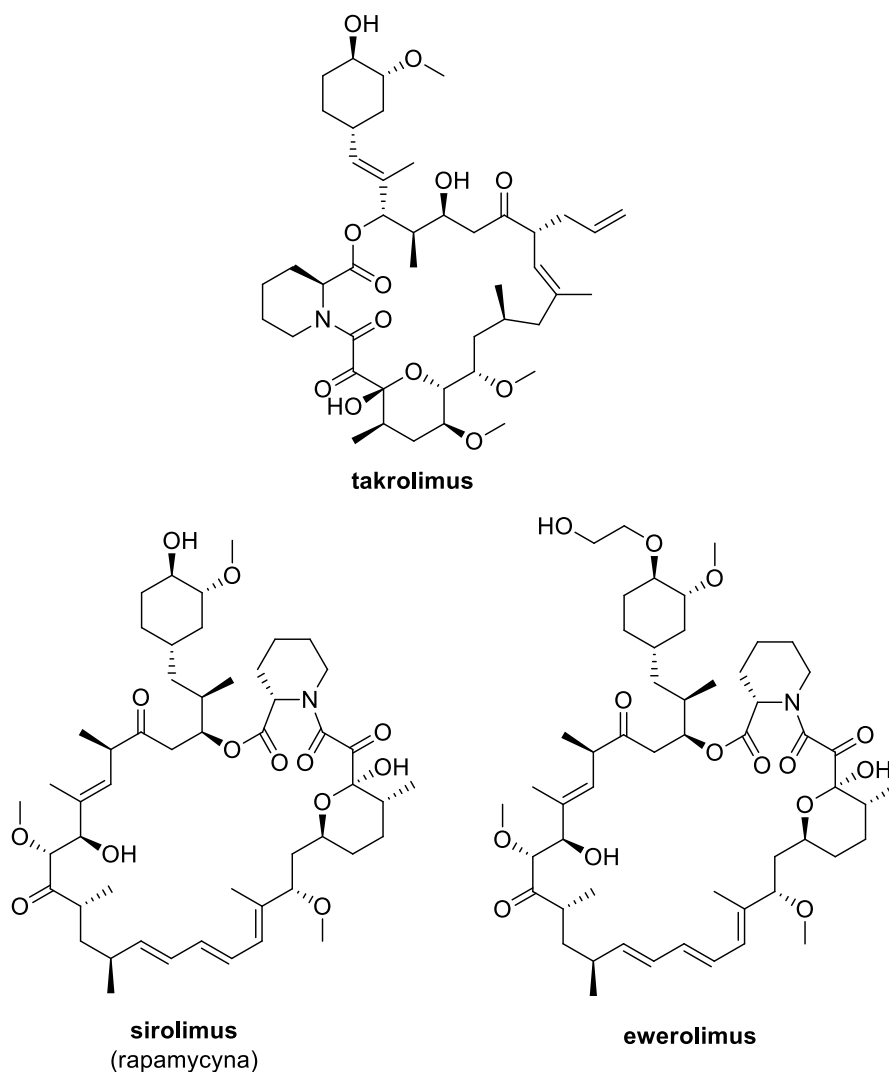
MPA i MMF wpływają również na płodność i przebieg ciąży. Stosowanie tych leków może prowadzić do wad wrodzonych płodu i poronień. Kobiety w wieku rozrodczym powinny stosować leki antykoncepcyjne w trakcie terapii z wykorzystaniem **MMF**, a także na sześć tygodni po jej zakończeniu. W przypadku mężczyzn, terapia znacząco wpływa na spermatogenezę i na jakość nasienia, stąd wskazana jest wstrzemięźliwość seksualna w okresie kuracji. Ponadto, pacjenci powinni unikać oddawania krwi lub nasienia przez pewien czas po zaprzestaniu stosowania **MMF**. Regularne badania krwi są niezbędne dla zapewnienia bezpieczeństwa terapii [31, 32].

Choć niektóre przesłanki literaturowe wskazywały na możliwość wystąpienia nowotworów krwi w trakcie terapii **MPA**, metaanaliza przeprowadzona w odniesieniu do innych immunosupresantów (np. azatiopryna, inhibitory mTOR) wykazała, że ekspozycja na **MPA** wiąże się z niższym ryzykiem zachowania na raka, o 34% niższym w odniesieniu do azatiopryny oraz o porównywalnym dla inhibitorów mTOR. Działanie ochronne **MPA** było najbardziej widoczne w przypadku raka skóry i chorób limfoproliferacyjnych, szczególnie u biorców przeszczepów nerek i serca. Zaobserwowano również silniejszą korelację między stosowaniem **MPA** a zmniejszonym ryzykiem raka w porównaniu z randomizowanymi badaniami kontrolnymi, w badaniach na pacjentach. Wyniki tego opracowania sugerują, że **MPA** może być

bezpieczniejszą opcją w odniesieniu do zachowania na raka, szczególnie w porównaniu z azatiopryną [33].

2.5.5. Kwas mykofenolowy a inne immunosupresanty

MPA w porównaniu z innymi immunosupresantami prezentuje wiele zalet pod względem skuteczności działania, jak i profilu bezpieczeństwa. Jako lek wprowadzony na rynek w 1995 roku, odegrał kluczową rolę w redukcji wystąpienia ostrego odrzucenia przeszczepu, nawet o 50%. Często jest on stosowany z innymi immunosupresantami, np. takrolimusem i cyklosporyną A, nierzadko w wariacie z niewielką dawką tego pierwszego (taka kombinacja redukuje ryzyko wystąpienia zaburzenia pracy nerek). Ze względu na większą zachorowalność na raka płaskonabłonkowego, jaka wiąże się z podażą takrolimusa u biorców przeszczepów, **MPA** jest preferowaną opcją w długotrwałych schematach leczenia immunosupresyjnego. Ponadto, ze względu na spadek ceny **MPA** w niektórych krajach (np. Czarnogóra), nawet o 300% w ciągu ostatniej dekady, może to dodatkowo wspierać jego szerokie zastosowanie kliniczne.



Rysunek 6. Wzory strukturalne wybranych antybiotyków makrolidowych stosowanych w terapiach immunosupresyjnych

W odniesieniu do leków alternatywnych, warto przytoczyć przykład takrolimusa, który choć jest bardziej skuteczny niż **MPA**, gdyż zapewnia większą ochronę przed ostrym odrzutem organu po przeszczepie, wykazuje właściwości nefrotoksyczne i zwiększa ryzyko zachorowania na cukrzycę. Innymi pochodnymi takrolimusa, z grupy antybiotyków makrolidowych, są sirolimus oraz ewerolimus, które są szczególnie cenne w przypadku terapii immunosupresyjnych u pacjentów z zaburzoną pracą nerek. Pomimo ich znacznej skuteczności, wysoki koszt produkcji ogranicza ich powszechne stosowanie. Wzory strukturalne pochodnych makrolidowych zostały przedstawione powyżej (**Rysunek 6**).

W ogólnym ujęciu, **MPA** wyróżnia się synergia efektywności, profilu bezpieczeństwa i opłacalności, co czyni go głównym składnikiem terapii immunosupresyjnych u pacjentów po przeszczepie organów [34].

2.5.6. Kwas mykofenolowy w chorobach autoimmunologicznych

MMF może mieć pewne zastosowanie w leczeniu różnych chorób autoimmunologicznych skóry o podłożu zapalnym. Badania kliniczne wskazują na jego skuteczność w schorzeniach takich jak: pęcherzyca zwykła (ang. *pemphigus vulgaris*), pemfigoid pęcherzowy (ang. *bullous pemphigoid*), piodermia zgorzelinowa (ang. *pyoderma gangrenosum*), łuszczyca (ang. *psoriasis*) i wyprysk potnicowy (ang. *dyshidrotic eczema*). Wielu z badanych uprzednio pacjentów było opornych na leczenie konwencjonalnymi lekami, takimi jak prednizon, azatiopryna, metotreksat i cyklosporyna A, lub doświadczyło ich poważnych skutków ubocznych. **MMF** podawany w dawkach od 500 mg do 1250 mg, dwa razy na dobę, był dobrze tolerowany i prowadził do znacznej poprawy w tych opornych na leczenie przypadkach, co czyni go obiecującą opcją leczenia złożonych schorzeń dermatologicznych [35].

MPA wykazał istotny potencjał kliniczny w leczeniu toczenia rumieniowatego układowego (ang. *systemic lupus erythematosus*, SLE), zwłaszcza jego podtypu — toczniowego zapalenia nerek (ang. *lupus nephritis*, LN). Mechanizm działania, w tym schorzeniu, wykracza poza hamowanie limfocytów T i B. **MPA** celuje tutaj także w plazmocytoidalne komórki dendrytyczne (ang. *plasmacytoid dendritic cells*, pDC), które odgrywają kluczową rolę w patogenezie SLE ze względu na nadmierne wytwarzanie interferonów (ang. *interferons*, IFNs) typu I. **MPA** skutecznie hamuje wytwarzanie IFN- α przez pDC. Działanie to pomaga przerwać błędne koło autoimmunizacji obserwowane w SLE, gdzie aktywacja pDC prowadzi do kaskady odpowiedzi immunologicznych napędzających chorobę. Odkrycie to podkreśla potencjał **MPA** w leczeniu SLE, według schematu wykraczającego poza tradycyjne zastosowanie tego leku [36].

Wykazano, że **MMF** jest nieskuteczny w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów (ang. *rheumatoid arthritis*, RA), zwłaszcza u pacjentów z zaawansowanymi, opornymi na leczenie postaciami choroby. Na podstawie eksperymentów placebo udowodniono, że **MMF** nie wykazuje znaczącej poprawy wyników leczenia. Podawany w ilości 1 g, dwa razy dziennie, nie wywołał istotnej odpowiedzi biologicznej, tak samo jak w przypadku eksperymentu placebo. Ponadto, kuracja **MMF** skutkowała dużą częstością występowania działań niepożądanych, aż u 51,6% pacjentów, co było porównywalne z częstością obserwowaną w przypadku cyklosporyny A.

Chociaż **MMF** był ogólnie dobrze tolerowany i powodował mniej specyficznych działań niepożądanych niż cyklosporyna A (takich jak nadciśnienie i skurcze mięśni), jego brak znaczącej skuteczności doprowadził do przedwczesnego zakończenia badania. Związek ten nie jest zatem uważany za rzeczywistą opcję leczenia RA [37].

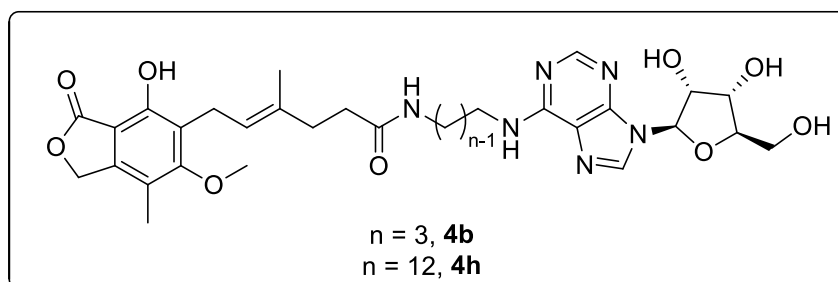
2.6. Wybrane pochodne o właściwościach biologicznych

Ze względu na ciężkie skutki uboczne wynikające ze stosowania leków opartych o **MPA**, poszukiwanie nowych pochodnych wydaje się być zasadne. Zgodnie z zależnością struktura-aktywność, modyfikacje strukturalne **MPA** nie mogą obejmować znacznych zmian w obrębie tej cząsteczki, w praktyce ograniczając się do transformacji grupy karboksylowej w jej prosty odpowiednik bioizosteryczny. Taka praktyka pozwoli na potencjalne odtworzenie pierwotnej struktury **MPA** w czasie metabolizmu nowej klasy pochodnych, czyniąc takie cząsteczki prolekami. Ma to na celu zmianę profilu farmakokinetycznego **MPA** z zachowaniem jego podstawowych właściwości immunosupresyjnych. Wykroczenie poza to założenie, to jest: bardziej dogłębne zmiany strukturalne, może spowodować znaczną redukcję tych własności, jednak stanowi przyczynek pod projektowanie pochodnych o zgoła odmiennych bioaktywnościach, zgodnie z przedstawioną wcześniej metodologią — *repurposing*.

Poniżej przedstawiono siedem rodzajów pochodnych **MPA**, w znacznej mierze odnoszących się do niewielkich zmian strukturalnych. Wspomniane zostały pochodne amidowe, lecz także ich odpowiednik bioizosteryczny — kwas hydroksamowy, a także pochodne estrowo-sililowe. Jako pewne odstępstwo można traktować penicykwasy izolowane z grzybów morskich, oparte o rdzeń kwasu mykofenolowego. Prezentowane poniżej wyniki badań odnoszą się do określania właściwości antybiotycznych, immunosupresyjnych oraz przeciwnowotworowych nowych klas pochodnych **MPA**.

2.6.1. Nukleotydy adeninowe związane z rdzeniem kwasu mykofenolowego

POCHODNE ADENOZYN



Rysunek 7. Wzór strukturalny pochodnych adenozynowych **MPA**

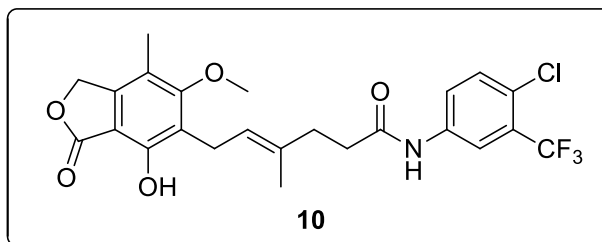
Poprzez tę klasę pochodnych rozumie się **MPA** połączony z rdzeniem adenozynewym za pomocą łącznika alkilowego o zróżnicowanej długości (**Rysunek 7**). W pierwszym etapie, chlorowany prekursor adenozyiny, ulega substytucji nukleofilowej w układzie aromatycznym, z wykorzystaniem łącznika diaminowego. Następnie, możliwe jest dobudowanie rdzenia **MPA** do uzyskanego koniugatu N^6 -(ω -aminoalkilo)adenozydowego przy pomocy klasycznych warunków

reakcji kondensacji, przeznaczonych do otrzymywania amidów. Dzięki motywowi strukturalnemu adenozyiny oraz kwasu mykofenolowego, związki te podejrzewane były o aktywność immunosupresyjną i stąd wynikły pomiary ich aktywności wobec linii komórek T-Jurkat, w odniesieniu do PBMCs pochodzących od zdrowych dawców.

Uzyskana została seria 16 pochodnych, w których jedna z nich (**4b**) charakteryzowała się wysokim współczynnikiem selektywności (tu: stosunek IC_{50} do EC_{50}), świadcząc o niskiej cytotoksyczności i o wysokiej efektywności w warunkach komórkowych, co stanowi dobre przesłanki pod projektowanie nowych immunosupresantów. Wartość ta, 827, przewyższa wielokrotnie tą uzyskaną dla **MPA**, 128, czy adenozyiny, 1,5, w badaniach prowadzonych na linii komórek T-Jurkat. Choć pochodna **4h** zaprezentowała współczynnik EC_{50} na poziomie 0,26 μM (dla **MPA** jest to 12,16 μM), wyniku tego nie powinno się analizować samodzielnie, na podstawie samej efektywności, gdyż celem funkcjonalizacji **MPA** jest uzyskanie pochodnych o niższej cytotoksyczności, najlepiej wobec zdrowych dawców. Choć badania biologiczne przeprowadzono dla zbioru homologicznego łączników diaminowych, o stale wzrastającej liczbie atomów węgla, nie jest możliwe określenie jednoznacznej zależności struktura-aktywność [38].

2.6.2. Anilidy kwasu mykofenolowego jako inhibitory *CpIMPDH* i *HsIMPDH*

POCHODNE ANILIDOWE



Rysunek 8. Wzór strukturalny pochodnej anilidowej **MPA**

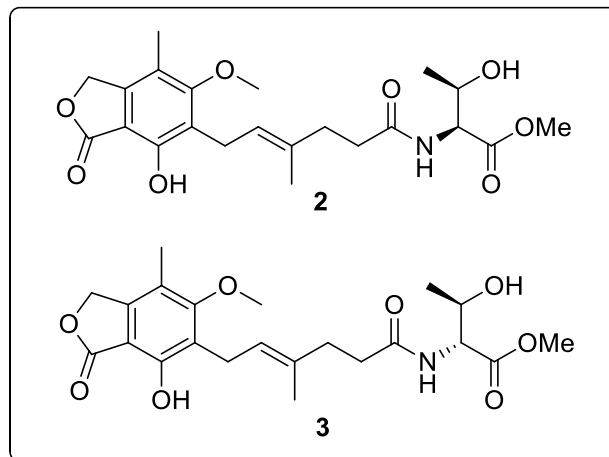
W celu poszerzenia zakresu stosowania **MPA** w terapiach antybiotycznych, badany był wpływ tego związku na inhibicję prokariotycznego IMPDH. Choć jest on dobrze poznany i silnym inhibitorem ludzkiego IMPDH (*HsIMPDH*), to enzym ten spotykany w organizmach beżądrowców zdaje się być mniej wrażliwy na działanie tej cząsteczki. Wynika to z różnic strukturalnych w odpowiednich domenach tej proteiny (np. pętli wiążącej NAD). Organizmem modelowym do badania tego wpływu był *Cryptosporidium parvum*, czyli gatunek pierwotniaka powodującego kryptosporydiozę u ludzi, którego wariant enzymu nazywa się *CpIMPDH*, w odróżnieniu od ludzkiego — *HsIMPDH* (*Homo sapiens*).

Pośród 17 pochodnych, 10 stanowi klasyczne pochodne amidowe **MPA**, zaś 7 z nich zawiera w swej strukturze modyfikacje łańcucha alkilowego **MPA**. Pochodna **10** (Rysunek 8) zaprezentowała najsilniejszą inhibicję *CpIMPDH* ($K_i = 0,016 \mu M$), przy jednoczesnym hamowaniu aktywności *HsIMPDH* ($K_i = 0,23 \mu M$). Wiele z uzyskanych pochodnych wykazywało dobre właściwości hamujące oba rodzaje tego enzymu. Potencjalną aktywność przeciwprzywrotniakową anilidów można wiązać z obecnością fragmentu oddziałującego z podjednostką tyrozynową, a interakcja ta występowała we wcześniej notowanych, selektywnych inhibitorach *CpIMPDH*.

Wcześniejsze badania połączone z oceną dokowania molekularnego podkreśliły, że selektywność ligandów wobec pierwotniakowego IMPDH zależy od: (1) interakcji typu π - π w miejscu wiązania i (2) braku interakcji z Ser276 w domenie NAD HsIMPDH [39].

2.6.3. Aminokwasowe pochodne kwasu mykofenolowego

POCHODNE AMINOKWASOWE

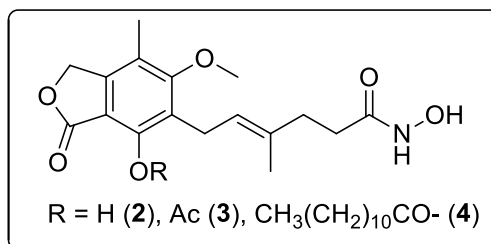


Rysunek 9. Wzory strukturalne pochodnych aminokwasowych **MPA**

Podłączanie aminokwasów, bądź peptydów, do substancji pierwotnie bioaktywnej to metoda pozwalająca na modyfikowanie farmakokinetyki, a tym samym — biodostępności cząsteczek. Wybór substancji aminokwasowych jako czynników modyfikujących jest nieprzypadkowy, gdyż szczególnie ich warianty biogenne są szeroko rozpoznawane w ustroju i wtórnie nietoksyczne po ewentualnym uwolnieniu. Przyłączenie tetrapeptydu, jakim jest tuftsyna lub retotufsyna, to także element tej strategii, z tą różnicą, że obie te substancje mają dodatkowo udokumentowane właściwości immunomodulujące, co jest szczególnie ważne w walce z procesami karcynogenezy.

Wykonane zostały testy związane z aktywnością cytotoksyczną dla 11 pochodnych aminokwasowych **MPA** wobec trzech linii komórek nowotworowych: AbC1 (czerniak chemiczny), A375 (czerniak ludzki) i SHSY5Y (ludzki nerwiak). Jako związki odniesienia stosowano **MPA**, cisplatynę oraz dekarbazynę. **MPA** wykazał silne działanie cytotoksyczne, przy niższych wartościach współczynnika IC_{50} , w porównaniu z dakarbazyną w komórkach czerniaka i porównywalnej aktywności z cisplatyną w komórkach nerwiaka. Wśród pochodnych aminokwasowych, związki będące estrami metylowymi (**MPA**-Thr-OMe (**2**) i **MPA**-D-Thr-OMe (**3**); **Rysunek 9**) prezentują ogólnie lepszą aktywność niż te z wolnymi grupami karboksylowymi, prawdopodobnie ze względu na lepszą penetrację błony komórkowej. Ponadto, zauważono, że pochodne o konfiguracji względnej L charakteryzuje wyższa cytotoksyczność niż ich odpowiedniki D. Wynika stąd, że prosta modyfikacja struktury **MPA** może zmniejszyć jego toksyczność, zachowując lub poprawiając aktywność biologiczną, czyniąc ten związek potencjalnym kandydatem do dalszego rozwoju chemoterapeutyków stosowanym przeciwko czerniakowi i nerwiakowi [40].

KWASY HYDROKSAMOWE MPA

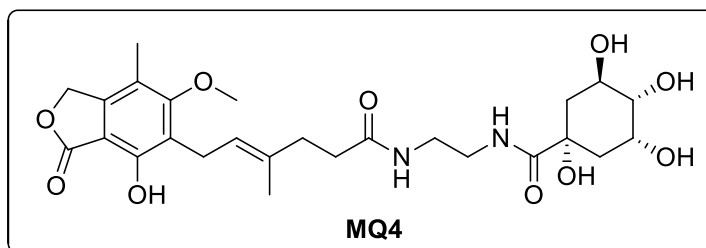


Rysunek 10. Wzór strukturalny pochodnych hydroksamowych **MPA**

W niniejszym punkcie rozdziału przedstawione zostały pochodne kwasu mykofenolowego, w którym funkcja karboksylowa uległa podstawieniu bioizosterycznemu do kwasu hydroksamowego, a także wolna grupa fenolowa została zacylowana (**Rysunek 10**). Ze względu na podobieństwo strukturalne do typowych inhibitorów deacetylaz histonowych, związki te były testowane pod kątem aktywności enzymatycznej. Dodatkowo, określona została cytotoksyczność nowej klasy pochodnych wobec komórek raka szyjki macicy (HeLa), gdyż zakłada się, iż hamowanie aktywności deacetylaz histonowych prowadzi do efektów przeciwnowotworowych (*vide* rozdział 5).

Uzyskanych zostało sześć pochodnych kwasów hydroksamowych, które poddano testowi enzymatycznemu. Wyniki wyrażone w formie współczynnika IC₅₀ prezentują się następująco: 1,0 μM dla MPHA (hydroksamowy kwas mykofenolowy; **2**), 0,9 μM dla 7-O-acetylowanego MPHA (**3**) oraz 0,5 μM dla 7-O-laurylowanego MPHA (**4**), a źródłem koktajlu enzymatycznego była frakcja pochodząca z komórek HeLa. Dzięki analizie western blottingowej, prowadzonej w odniesieniu do znanych i scharakteryzowanych inhibitorów deacetylaz histonowych, możliwe było wstępne określenie selektywności pochodnych wobec protein histonowych, bądź niehistonowych (ogólnie: substratów). Pochodne **2-4** indukują wyczerpujące acetylowanie α-tubuliny, w przeciwieństwie do worynostatu, który wpływa zarówno na białko histonowe (H3), jak i α-tubulinę. **MPA** nie ma wpływu na żadne z tych białek, co wskazuje na sukces w próbie odnalezienia nowego celu molekularnego dla nowych, prostych pochodnych tej substancji. Choć aktywność enzymatyczna tej grupy pochodnych nie była lepsza niż wzorca — worynostatu, aktywność komórkowa okazała się być zbliżona. Transformowanie **MPA** w jego odpowiednik hydroksamowy poskutkowało częściową utratą aktywności wobec IMPDH, co było zgodne ze znaną zależnością struktura-aktywność dla tej cząsteczki [41]. Ta grupa związków posłużyła mi za inspirację w poszukiwaniu nowych celów molekularnych dla pochodnych **MPA**, szczególnie opartych o zjawisko podstawienia bioizosterycznego w podrozdziale 6.4. Bioizosteryczne pochodne **MPA**.

KONIUGAT MPA-KWAS CHINOWY

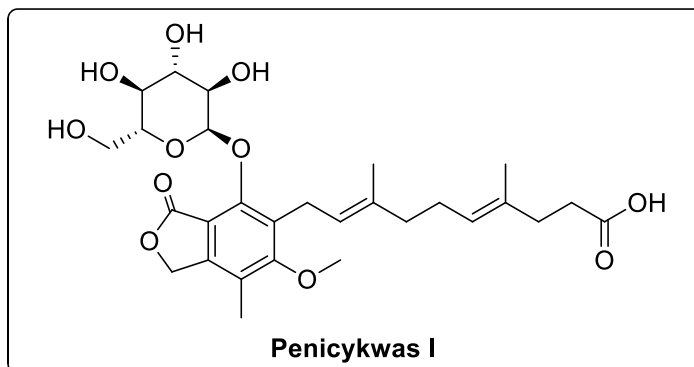


Rysunek 11. Wzór strukturalny koniugatu **MPA**-kwas chinowy

Kolejnym przykładem bioaktywnej pochodnej **MPA** jest jego koniugat z kwasem chinowym (MQ4), przedstawiony na **Rysunku 11**. Częsteczka ta została skonstruowana w oparciu o rdzenie wcześniej wymienionych kwasów, połączone łącznikiem etylenodiaminowym, przez wiązania amidowe. Główną ideą przyświecającą syntezie i badaniom biologicznym dla tej pochodnej było założenie, iż z racji, że kwas chinowy wykazuje samodzielnie właściwości przeciwzapalne (jest inhibitorem NFκB), może wtórnie modyfikować niektóre efekty uboczne **MPA** na drodze hamowania apoptozy. Warto dodać, iż sam kwas chinowy również jest słabo przyswajalny i ulega aromatyzacji przez bakterie jelitowe. Dodatkowo, istotnym czynnikiem była biodostępność cząsteczek — badacze założyli, że koniugat ten będzie mniej skłonny do ulegania glukuronidacji, a jest to proces odpowiadający za inaktywację **MPA** w ustroju. Dobór typu łącznika oparty był o stabilność powstałej cząsteczki, a dokładnie — podatności na hydrolizę. Ugrupowanie amidowe jest istotnie bardziej odporne na rozpad, niż odpowiednio estrowe, co zostało udowodnione na podstawie podatności na hydrolizę koniugatu estrowego **MPA**, w którym pochodna kwasu chinowego dobudowana jest do tej cząsteczki właśnie poprzez ten typ wiązanie [42, 43].

W efekcie, zaobserwowano nieznacznie obniżoną aktywność immunosupresyjną MQ4, w odniesieniu do **MPA**, choć z obniżoną cytotoksycznością wobec komórek beta wytwarzających insulinę. MQ4 zmniejsza poziom mediatorów apoptozy, takich jak kaspaza-3, co ilościowo odpowiada redukcji śmierci komórek beta trzustki. Jest to odbierane jako swego rodzaju kompromis, uzyskany w zamian za nieznacznie obniżone właściwości immunosupresyjnych. Co więcej, MQ4 poprawiał wydzielanie insuliny z komórek beta pod wpływem stymulacji glukozą, co czyni go potencjalnie lepszą opcją w zakresie zachowania funkcji układu po przeszczepie wysp trzustkowych [42].

PENICYKWASY

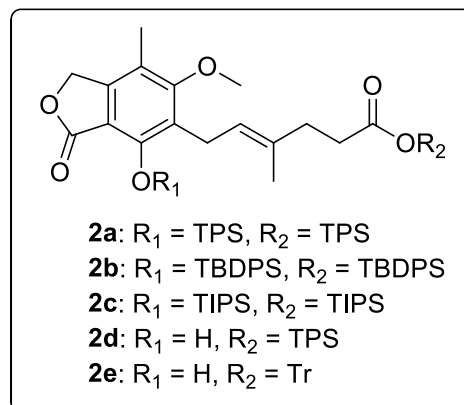


Rysunek 12. Wzór strukturalny penicykwasu I

Kolejny przykład dotyczy związków organicznych wyizolowanych z grzybów morskich z gatunku *Rhizopus oryzae*. Organizmy te, żyjące w słonych zbiornikach wodnych, w tym morzach i jeziorach, produkują cząsteczki z grupy penicykwasów. Choć występowanie tych metabolitów komórek grzybowych nie jest nowe, opisywane było już wcześniej w literaturze, to autorzy podkreślają, że w obliczu zjawiska lekooporności bakterii, każda próba znalezienia i wyizolowania substancji antybiotycznych, jest postępowaniem w tym zagadnieniu. Nietypowość tego przykładu (**Rysunek 12**) wynika z faktu, że koniugaty te nie zostały stworzone sztucznie, a także określona została ich odmienna aktywność — przeciwbakteryjna, a nie immunosupresyjna, jak w poprzednich klasach substancji. Bioaktywność tych związków była testowana wobec czterech różnych szczepów bakterii, w tym gatunków Gram-dodatnich i Gram-ujemnych.

Testy antybakteryjne wykazały aktywność od umiarkowanej do słabej, przy wartościach minimalnego stężenia hamującego (MIC) w zakresie od 62,5 do 250 µg/ml. Warto zauważyć, że penicykwas I wykazywał najsilniejszą spośród trzech odpowiedników aktywności przeciwko *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*, z wartościami MIC wynoszącymi 62,5 µg/ml. Choć wyniki tych badań nie były zadowalające i głównie opierały się na analizie strukturalnej izolowanych cząsteczek, jest to przykład pochodnych **MPA** pozyskiwanych drogą biosyntezy w komórkach grzybów [44]. Jest to w pewnym sensie uzupełnienie klasycznego spojrzenia na chemię medyczną, które bazuje na syntezie chemicznej projektowanych pochodnych.

SILIŁOWE/ESTROWE ANALOGI MPA



Rysunek 13. Wzór strukturalny pochodnych siliłowo-estrowych **MPA**

W niniejszym opracowaniu badacze otrzymali, a następnie zweryfikowali bioaktywność 16 pochodnych **MPA** zawierających, przeważnie, w swej budowie ugrupowanie siliłowe podstawione grupami alkilowymi lub/i aryłowymi, które powszechnie spotykane są w chemii organicznej jako grupy ochronne funkcji fenolowej lub karboksylowej (**Rysunek 13**). Badane były również proste pochodne estrowe (4 z 16), bez ugrupowania siliłowego, jednak ich skuteczność okazała się niska, stąd motywem przewodnim są pochodne zawierające krzem. Odpowiedź biologiczna była weryfikowana na szeregu linii komórek nowotworowych ludzkiego kostniakomięsaka (ang. *osteosarcoma*, OS) i mięsaka (ang. *sarcoma*): 143B, MNNG, U2OS, SaOS. Najbardziej aktywna pochodna w teście przesiewowym, **2d**, została następnie poddana testom na ludzkich komórkach kościotwórczych (osteoblastach), hFOB 1,19, testom enzymatycznym wobec dwóch izoform enzymu IMPDH, a także eksperymentom dokowania molekularnego wobec białek związanych z progresją kostniakomięsaka i pierwotnymi właściwościami immunosupresyjnymi **MPA**.

Autorzy wyróżniają pochodną trifenylosililową, **2d**, która była silniej cytotoksyczna i selektywna w stosunku do komórek nowotworowych OS niż **MPA**, co wyrażone było wartościami współczynnika IC₅₀ na tych 4 liniach komórek nowotworowych w przedziale 0,64-2,27 μM (0,64-4,00 μM dla **MPA**). Analog trytylowy, **2e**, również charakteryzował się istotną skutecznością w hamowaniu proliferacji komórek raka (IC₅₀ = 0,68–5,13 μM). Do aktywności przeciwnowotworowej **MPA**, w tych warunkach, konieczne jest występowanie wolnej grupy fenolowej, zaś spora zawada steryczna jaką posiada grupa trytylowa lub trifenylosililowa, jako strukturalne motywy lipofilne, odgrywają istotną rolę w cytotoksyczności tych substancji. Dodatkowo, pochodna **2d**, podobnie jak **MPA**, demonstruje zależną od stężenia aktywność przeciwko linii komórek hFOB 1,19. Pochodne te mogą stanowić dobry punkt wyjścia w poszukiwaniu nowych leków przeciwko OS, a także poszerzają spektrum bioaktywności analogów opartych na **MPA** o aktywność przeciwnowotworową [45].

3. Fenolowe związki pochodzenia naturalnego

3.1. Wstęp

Antyoksydanty odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu jakości żywności, przeciwdziałając procesom oksydacyjnym, które prowadzą do pogorszenia jej smaku, koloru czy wartości odżywczych. W związku z rosnącą świadomością konsumentów dotyczącą zdrowego stylu życia, związki te stają się coraz bardziej pożądane, zarówno w przemyśle spożywczym, jak i farmaceutycznym. Antyoksydanty, takie jak witamina C, E, karotenoidy czy polifenole, wykazują zdolność neutralizowania wolnych rodników i reaktywnych form tlenu (ROS), które są odpowiedzialne za szereg procesów chorobowych, w tym starzenie się, choroby serca czy nowotwory. Ponadto, ich dodatek do żywności pozwala na przedłużenie trwałości produktów, co ma istotne znaczenie w kontekście globalnych wyzwań związanych z redukcją marnotrawstwa żywności.

Współczesne badania nad antyoksydantami koncentrują się na ich wykorzystaniu w technologii żywności, w tym na innowacyjnych metodach ich inkorporacji do opakowań oraz jako dodatków funkcjonalnych do produktów spożywczych. Techniki takie jak mikroenkapsulacja pozwalają na skuteczniejsze wykorzystanie tych związków w celu ochrony przed utlenianiem lipidów i innych składników odżywczych w żywności. Co więcej, naturalne antyoksydanty pochodzące z roślin, takie jak ekstrakty z owoców czy warzyw, stają się alternatywą dla syntetycznych związków, które mogą wykazywać toksyczne działanie przy długotrwałym spożyciu. Dzięki swoim właściwościom ochronnym antyoksydanty nie tylko wpływają na jakość produktów spożywczych, ale także mogą przyczyniać się do poprawy zdrowia konsumentów, co czyni je kluczowym elementem nowoczesnej technologii żywności [46].

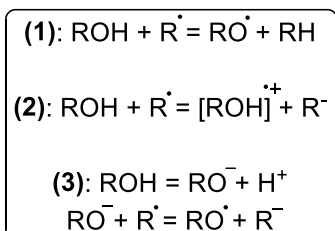
W związku z tym, że stres oksydacyjny jest lub może być patognomoniczny dla szeregu chorób autoimmunologicznych, w tym reumatoidalnego zapalenia stawów, istotne jest poszukiwanie nowych antyoksydantów lub weryfikowanie znanych już cząsteczek leków pod kątem hamowania procesów biegnących z udziałem ROS i tym samym modyfikowaniem przebiegu tych schorzeń. Choć nie zawsze można jednoznacznie określić, czy aktywność pro-oksydacyjna lub antyoksydacyjna jest korzystna dla ustroju, poszukiwanie nowych antyoksydantów stanowi wartość dodaną dla rozwoju zarówno chemii medycznej, jak i technologii żywności.

3.2. Zależność struktura-aktywność a właściwości przeciwutleniające

W niniejszym podrozdziale zostały zaprezentowane podstawowe informacje na temat mechanizmów, które można spotkać w aktywności przeciwutleniającej związków małowcząsteczkowych oraz przykład podziału tych związków na klasy, w oparciu o charakterystyczny motyw strukturalny. Zagadnienia te mają umożliwić proste rozpoznanie grup funkcyjnych, bądź układów wiązań, w celu zgrubnego określenia potencjału przeciwutleniającego analizowanych cząsteczek.

3.2.1. Dominujące mechanizmy w aktywności przeciwutleniającej

Wygaszanie reaktywnych form tlenu (ROS), bądź reaktywnych form azotu (RNS), może zachodzić poprzez dwa podstawowe mechanizmy: (1) rodnikowy transfer atomu wodoru (ang. *hydrogen atom transfer*, HAT) oraz (2) przeniesienie jednego elektronu (ang. *single electron transfer*, SET). Klasycznymi przykładami ROS są rodniki hydroksylowe, nadtlennkowe, ponadtlenkowe, tlen singletowy, nadtlenek wodoru, zaś do RNS należą: tlenek azotu(II) oraz rodnik nadtlendioazotynowy. Niekiedy, mechanizm ich dezaktywacji może mieć charakter mieszany (3), jak to ma miejsce w przypadku flawonoidów, i zależy również od warunków otoczenia (budowa cząsteczki, temperatura, rozpuszczalnik). Możliwe jest także stworzenie trwałego kompleksu antyoksydant-rodnik. Uważa się, że choć w mechanizmie zmiatania rodników powstają często nowe formy rodnikowe, są one zdecydowanie mniej reaktywne niż te obserwowane na wejściu [47]. Na poniższym rysunku (**Rysunek 14**) przedstawiono poszczególne warianty mechanistyczne na podstawie reakcji z ROH.



Rysunek 14. Podstawowe mechanizmy zmiatania wolnych rodników

3.2.2. Podstawowy podział antyoksydantów ze względu na motyw strukturalny

Istnieje pięć podstawowych grup antyoksydantów małocząsteczkowych. Są to pochodne zawierające grupę OH, NH, SH, bądź układ izoprenowy. Ponadto, wyróżnia się związki będące kombinacją wszystkich wcześniej wymienionych klas, często są to wielofunkcyjne cząsteczki pochodzenia naturalnego.

Związki zawierające grupę OH przynależą do najszerzej rozpowszechnionej klasy antyoksydantów. Nie są to jednak samodzielnie występujące grupy hydroksylowe spotykane w prostych alkoholach alifatycznych, a cząsteczki, w których ugrupowanie to związane jest bezpośrednio z systemem sprzężonych wiązań wielokrotnych. Jako przykłady wymienia się: fenole, kwas askorbinowy (witamina C), tokoferole (związki z grupy witamin E), a także polifenole. Działają według każdego z przytoczonych wcześniej mechanizmów, choć możliwe jest również tworzenie przez nie kompleksów z czynnikami prooksydacyjnymi, np. jonami metali.

Ugrupowanie NH, w kontekście aktywności przeciwutleniającej, ma podobną charakterystykę do tej przedstawionej dla grupy OH. Związki tego typu mają często: grupę aminową podłączoną do układu aromatycznego lub stanowią element pierścienia heteroaromatycznego, a także działają według tego samego typu mechanizmów. Klasycznymi przykładami związków przynależących do tej grupy są: aniliny (aminy aromatyczne), melatonina (pochodna indolu), bilirubina (pochodna pirołu), iminy, hydrazony oraz betalainy (pochodne typu enaminowego).



Ugrupowanie SH, zwane tiolowym, jest szczególnie istotne z punktu widzenia ochrony organizmów żywych przed ROS. Wiele tioli ulega procesowi autooksydacji z wytworzeniem disulfidów a przemiana ta często biegnie przy udziale rodników tiolowych. Ich wyjątkowa łatwość do tworzenia typu połączeń ma swoje odzwierciedlenie w zdolnościach przeciwutleniających tioli. Poza tym, motyw mostka disulfidowego jest niezwykle ważny z punktu widzenia stabilizacji i kształtowania makromolekuł białkowych. Najczęstszym typem mechanizmu spotykanym w aktywności grupy SH jest typ HAT, lecz związki te zdolne są również do tworzenia stabilnych chelatów z metalami ciężkimi odpowiedzialnymi za procesy utleniania. Istotnymi przykładami związków z tej grupy są: glutation (tripeptyd z wolną grupą SH), penicylamina (aminokwas niebiałkowy; produkt uboczny metabolizmu penicyliny), cysteamina (amina biogenna; produkt rozkładu cysteiny), kwas dehydroliponowy, czy *N*-acetylocysteina.

Układy wielokrotnie sprzężone oparte na strukturze izoprenu w sposób efektywny wygaszają aktywność tlenu singletowego oraz rodników nadtlenkowych. Wynika to z możliwości stabilizacji rodnika na całym układzie sprzężonych wiązań nienasyconych. Uważa się, że ich zdolność przeciwutleniająca oparta jest głównie na mechanizmie przeniesienia rodnika wodorowego (HAT). Klasycznymi przykładami związków z tej grupy są: karoten, ksantofile oraz retinoidy (pochodne witaminy A).

Istnieją również układy o silnie zróżnicowanej budowie, która stanowi kombinację kilku przedstawionych powyżej grup. Znanym przykładem kombinacji układu izoprenowego oraz struktury fenolowej jest koenzym Q10 (ubichinon), a właściwie jego forma zredukowana — ubichinol. Powstaje on w reakcjach katalizowanych cytochromami z koenzymu Q10 i jest zdolny do wygaszania aktywności ROS. Innym przykładem są fenolopropenoidy, w tym dehydrozingeron i kurkumina, hydroksylowane kwasy cynamonowe, na przykład kwas ferulowy czy *o*-kumarowy, a także związki takie jak izoeugenol. Aktywność przeciwutleniająca tych związków oparta jest o grupę OH oraz o możliwość delokalizacji rodnika z wykorzystaniem układu nienasyconego w łańcuchu bocznym. Jest to przykład niepełnej aktywności układu izoprenowego [47, 48].

Na poniższym rysunku (**Rysunek 15**) zaprezentowano przykłady wzorów strukturalnych wybranych przeciwutleniaczy z podziałem na wskazane klasy.

3.3. Chemiczne metody określania potencjału przeciwutleniającego

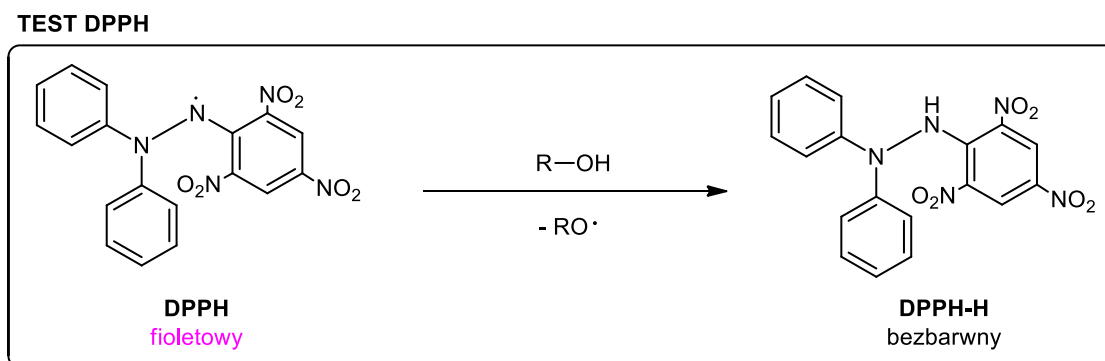
W niniejszym podrozdziale przedstawione zostały wybrane testy ilościowe aktywności przeciwutleniającej. Miarą tej aktywności jest wzrost, bądź spadek, intensywności zjawiska fizycznego, bądź reakcji chemicznej, dlatego techniki takie jak: spektrofotometria, fluorymetria oraz fotometria, mają tu zastosowanie. Zmierzona: absorbancja, intensywność fluorescencji oraz wydajność kwantowa chemiluminescencji, przekładają się w sposób ilościowy na właściwości antyoksydacyjne.

Techniki te można podzielić na: (1) oparte na transferze jednego elektronu (SET) oraz (2) HAT. Choć ich efekty są takie same, to jest — badany przeciwutleniacz ulega utlenieniu, mechanizm oraz kinetyka tych przemian jest odmienna.

Przedstawione poniżej informacje mają za zadanie przybliżyć czytelnikowi chemiczne metody określania właściwości przeciwutleniających. Często są one wykorzystywane w badaniach wstępnych przy opracowywaniu nowych klas przeciwutleniaczy. Zaprezentowano je w formie: krótkiej notatki na temat podstaw chemicznych i fizycznych testu, schematu prezentującego chemiczną podstawę działania, a także komentarza poszerzającego wiedzę o danej technice.

3.3.1. Test DPPH

Metoda ta bierze swą nazwę od rodnika 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylowego (ang. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical*, rodnik DPPH). Związek ten jest trwały w stanie wolnym, a zawdzięcza to przesłanianiu sąsiadującymi z nim grupami nitrowymi i pierścieniami aromatycznymi, bardziej, niż samą możliwością stabilizacji rodnika w ramach układu sprzężonych wiązań podwójnych. Podstawą działania tego testu jest utrata intensywnej fioletowej barwy roztworu rodnika DPPH pod wpływem zmiataczy rodników, takich jak związki fenolowe. Barwa ulega zmianie z fioletowej na żółtą (bezbarwną), a maksimum absorpcji rodnika DPPH obserwowane jest przy długości fali równej 517 nm. Im silniejsze są właściwości przeciwutleniające cząsteczki, tym silniejsze odbarwienie jest obserwowane. Miarą siły przeciwutleniacza może być parametr IC_{50} , który im bardziej dąży do zera, tym silniejszy jest przeciwutleniacz. Poniżej przedstawiono reakcję leżącą u podstaw tej techniki (**Schemat 8**).



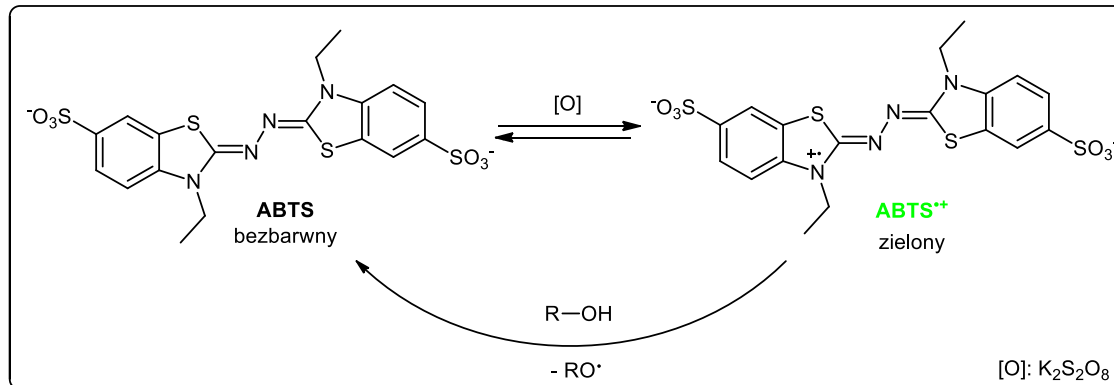
Schemat 8. Chemiczna podstawa działania testu DPPH

Test ten jest powszechnie używany w badaniach właściwości przeciwutleniających roztworów badanych związków, a także ekstraktów roślinnych. Stosowanymi w tej metodzie rozpuszczalnikami są metanol i etanol. Ze względu na niską rozpuszczalność DPPH w wodzie, możliwe jest zastosowanie jedynie 60% dodatku wody. Test ten charakteryzuje się: prostotą i niskonakładowością, powtarzalnością wyników, możliwością stosowania w temperaturze pokojowej i sporym potencjałem do zautomatyzowania. Nie obserwuje się istotnych wad w stosowaniu tego testu, co spójne jest z jego popularnością wśród badaczy [49].

3.3.2. Test ABTS

Metoda ta bierze swoją nazwę od 2,2'-azobis(3-etylobenzo[d]tiazolino-6-sulfonianu) amonu, zwanego również jako ABTS (ang. 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)). Związek ten, w swej formie natywnej, nie jest używany w tym teście i konieczne jest jego transformowanie w formę kationorodnika $ABTS^{+•}$. Możliwe jest to dzięki działaniu silnym środkiem utleniającym, np. nadsiarczanem potasu. Powstały kationorodnik jest barwny i stanowi podstawę tej metody kolorymetrycznej. Jego maksimum absorpcji określane jest przy długości fali równej 734 nm. W obecności zmiataczy rodników, obserwuje się odbarwienie roztworu $ABTS^{+•}$ z niebiesko-zielonej do bezbarwnej. Intensywność zjawiska odbarwienia zależna jest od czasu trwania reakcji (pomiaru), stężenia i inherentnych właściwości przeciwutleniających próbek. Poniżej zaprezentowano przemianę stanowiącą podstawę tej metody (**Schemat 9**).

TEST ABTS



Schemat 9. Chemiczna podstawa działania testu ABTS

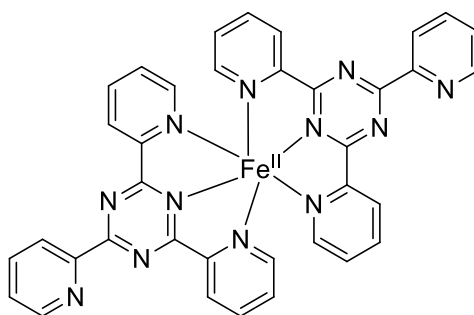
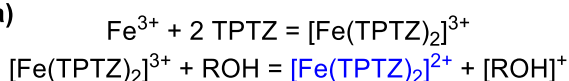
Do zalet tej techniki należą: prostota i niskonakładowość, możliwość przeprowadzania oznaczeń zarówno w warunkach lipofilnych, jak hydrofilowych, tolerancja na szeroki zakres wartości pH próbek. Za wady można uznać: możliwość zafałszowania wyniku w związku z obecnością silnego utleniacza w mieszaninie, reakcja z kationorodnikiem $ABTS^{+•}$ może przebiegać powoli, co wpływa negatywnie na odczyt wyników (problem określenia punktu końcowego), a także związek ten po utlenianiu jest niestabilny. Możliwe jest zastosowanie tego testu w wariancie odwróconym, to jest, gdy ABTS jest reduktorem. Ma to miejsce w układzie: ABTS/nadtlenek wodoru/peroksydaza. W tym wypadku wzrost intensywności zabarwienia jest miarą stężenia enzymu [49].

3.3.3. Test FRAP

Metoda ta swoją nazwę zawdzięcza określeniu angielskiemu — *ferric ion reducing antioxidant power* (FRAP), które tłumaczy się jako: jony żelaza zmniejszające właściwości przeciwutleniające. Test ten oparty jest o redukcję jonów żelaza(III) do żelaza(II) w obecności przeciwutleniacza (który sam ulega utlenieniu). Powstałe jony Fe^{2+} są następnie kompleksowane i tworzą połączenia barwne, a intensywność zabarwienia przekłada się na siłę przeciwutleniacza. Klasyczny test FRAP (a) zakłada użycie 2,4,6-tris(2-pirydylo)-s-triazyny (TPTZ), która w kontakcie z powstałymi jonami tworzy intensywnie niebieski kompleks ($\lambda = 593 \text{ nm}$). Najnowsze wersje testu (b) wykorzystują tworzenie błękitu Turnbulla (błękitu Pruskiego) jako podstawę oznaczenia. Sugeruje się, iż przeciwutleniacz może redukować wolne jony żelaza(III), jak i związane jony żelaza(III) w postaci anionu heksacyjanożelazianowego(III). W efekcie, powstaje ten sam związek barwny. Poniżej zaprezentowano przemiany obserwowane w tej metodzie, w wariantach (a) i (b) (Schemat 10).

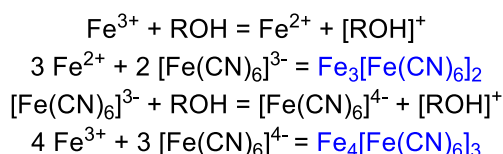
TEST FRAP

(a)



niebieski

(b)



Schemat 10. Podstawy chemiczne testu FRAP

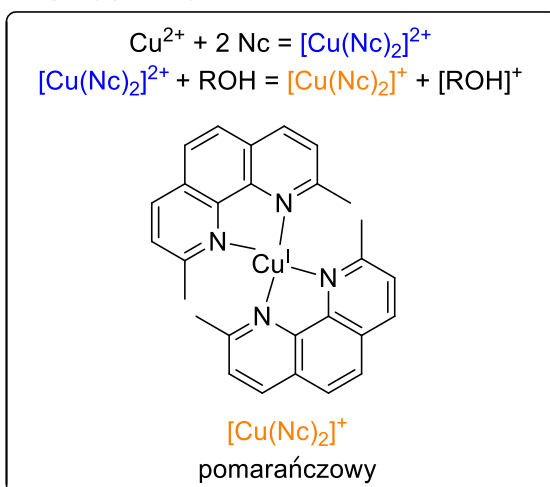
Test FRAP charakteryzuje się prostotą, szybkim wykonaniem i niskonakładowością. Nie wymaga zastosowania zaawansowanej aparatury. Jego wadą, w wariancie (b), jest silne wybarwienie naczynek pomiarowych przez błękit Turnbulla/błękit Pruski, co jednak może być ograniczone dzięki użyciu środków powierzchniowo czynnych. Ponadto, wyniki pomiarów mogą znacząco różnić się w zależności od czasu ich prowadzenia, gdyż reakcja ta zachodzi z różną

szybkością dla antyoksydantów o różnej budowie chemicznej. Jest to metoda, dzięki której scharakteryzowano potencjał przeciwutleniający wielu składników żywności, można więc uznać ją za dobrze scharakteryzowaną i odnośnikową. Istnieje możliwość wykorzystania technik elektrochemicznych (np. chronoamperometria (CA), woltamperometria cykliczna (CV)) w zamian za pomiary spektrofotometryczne [49]. Para jonów $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ jest elementem często wykorzystywanego w metodzie CV roztworu roboczego, stąd wykorzystanie tej techniki w teście FRAP jest uzasadnione.

3.3.4. Test CUPRAC

Nazwa tego testu pochodzi od angielskiego określenia: *cupric reducing antioxidative capacity* (CUPRAC), co tłumaczy się jako: zmniejszanie zdolności antyoksydacyjnych z wykorzystaniem związków miedzi. Oparty jest o reakcję skompleksowanych jonów miedzi(II) do miedzi(I), pod wpływem przeciwutleniacza (który ulega utlenieniu). W wyniku tej transformacji chemicznej obserwuje się efekt barwny, w którym następuje przejście barwy z niebieskiej na żółto-pomarańczową ($\lambda = 450 \text{ nm}$). Warto dodać, iż za utlenianie odpowiada kompleks miedzi(II), a nie wolne jony Cu^{2+} . Potencjał utleniający pary $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ w obecności neokuproiny (2,9-dimetylo-1,10-fenantrolina) wynosi 0,60 V, zaś dla pary wolnych jonów $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ — 0,17 V. Poniżej przedstawiono zapis reakcji leżącej u podstaw tego testu (**Schemat 11**).

TEST CUPRAC



Schemat 11. Podstawa działania testu CUPRAC

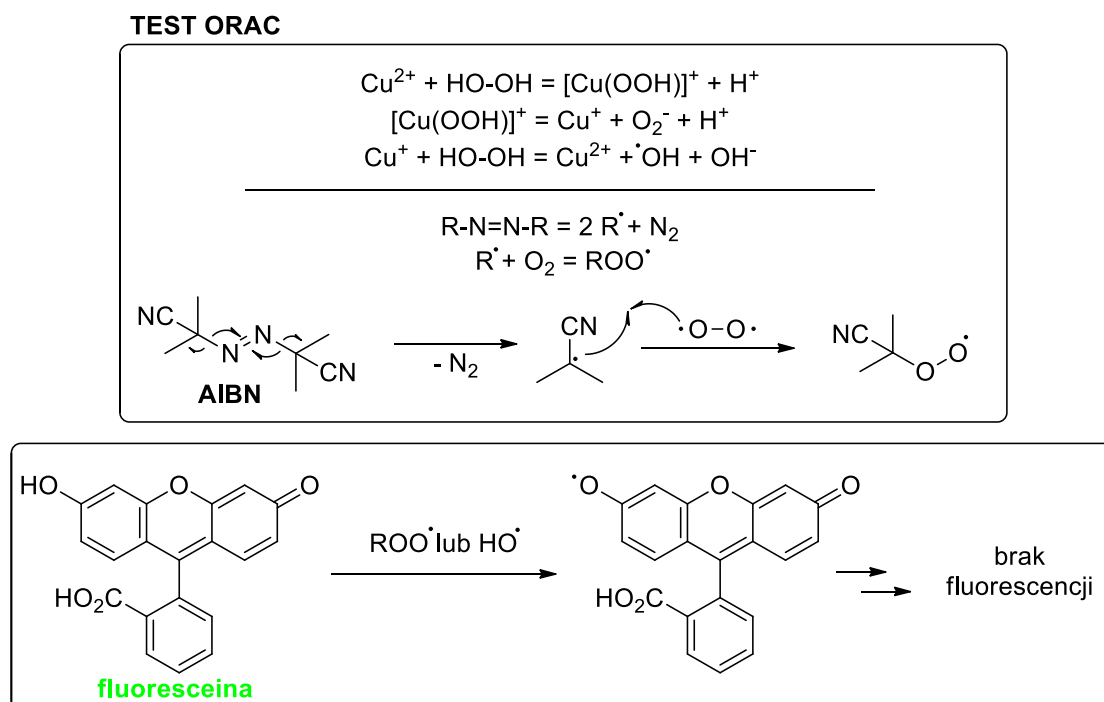
Test CUPRAC pozwala na zmierzenie własności antyoksydacyjnych substancji w pH równym 7,0, co jest osiąganym przez zastosowanie bufora złożonego z octanu amonu. Jest ono bliskie temu, obserwowanemu w warunkach fizjologicznych, to jest $\text{pH} = 7,4$, stąd test ten może mieć zastosowanie w oznaczaniu ilości antyoksydantów obecnych w ustroju. Dla wielu substancji, na przykład: kwasu rozmarynowego, galusanu epikatechiny, czy rutozydu, takie warunki są najbardziej optymalne do swobodnego transferu elektronów. W literaturze spotyka się inne ligandy stosowane do kompleksowania jonów miedzi. Jeden z nich — kwas 2,9-dimetylo-4,7-difenylo-1,10-fenantrolino-3,8-disulfonowy (BTS) — w obecności pary jonów $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$, ma



potencjał utleniający na poziomie 0,84 V, co może negatywnie wpływać na selektywność testu CUPRAC, gdyż przewyższa to wartość osiąganą dla klasycznych warunków. Ponadto, wysoce polarne grupy sulfonowe powodują, że cząsteczka jest silniej spolaryzowana, jej wypadkowy ładunek jest wyższy, co wpływa na wzrost ilości oddziaływań jon-dipol z wodą, a to przesuwając równowagę kompleksu w stronę substratów i może wpływać na łatwość zachodzenia procesów redoks [49].

3.3.5. Test ORAC

Nazwa tego testu odnosi się do angielskiego określenia *oxygen radical absorbance capacity* (ORAC), co w wolnym tłumaczeniu oznacza: zdolność do pochłaniania rodników opartych na atomie tlenu. Podstawą tej metody jest sztuczne generowanie rodników wodoronadtlenowych, $\text{HOO}\cdot$, które powstają w reakcji tlenu cząsteczkowego z inicjatorem reakcji rodnikowych (np. 2,2'-azobis(2-metylopropionitryl), AIBN, czy dichlorowodorek 2,2'-azobis(2-amidynopropanu), AAPH). Następnie, w obecności barwnika fluorescencyjnego, rodniki te ulegają rekombinacji do produktów nie wykazujących fluorescencji. W obecności przeciwutleniacza, wygaszanie zdolności fluorescencyjnych nie jest tak intensywne. Pomiaru intensywności tego zjawiska dokonuje się przy pomocy fluorymetru. Jest to metoda alternatywna wobec klasycznych metod spektrofotometrycznych. Istnieje wiele wariantów testu ORAC, w tym jego odpowiednik z rodnikiem wodorotlenowym. Metoda ta jest powszechnie używana do określania zdolności przeciwutleniających produktów spożywczych, wyrażonych w mikromolach Trolox (wzorcowy przeciwutleniacz) na 100 gramów produktu. Równania chemiczne stanowiące podstawę testu ORAC przedstawiono poniżej (**Schemat 12**).



Schemat 12. Podstawa działania testu ORAC



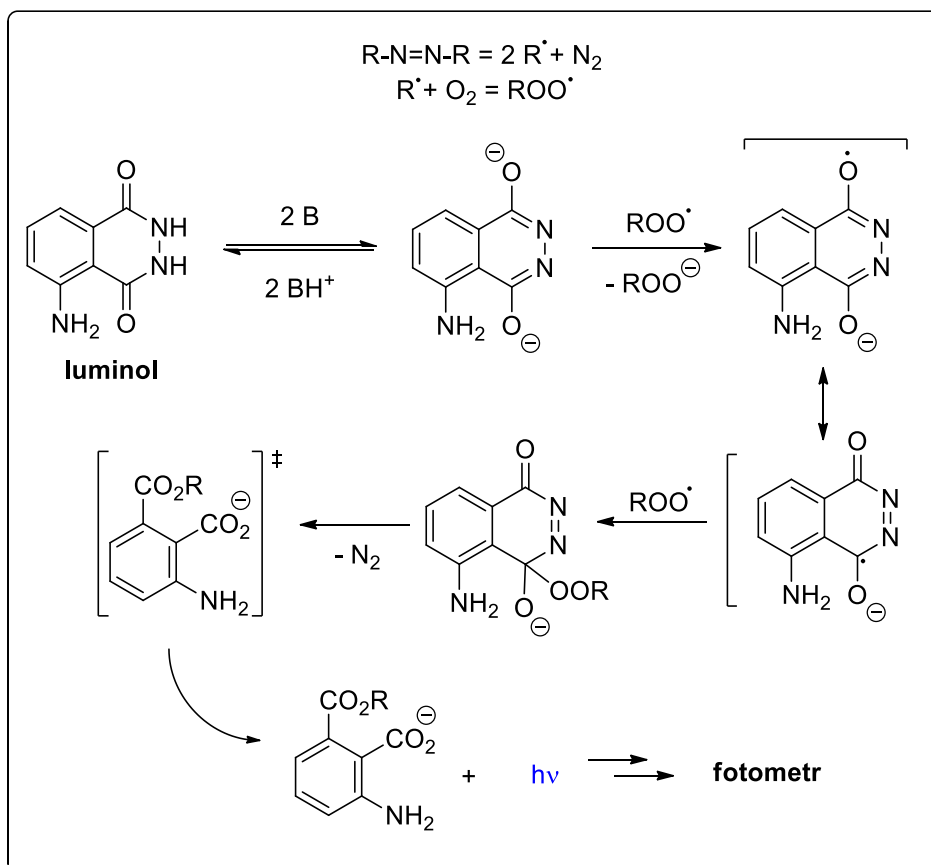
Metoda ta jest wrażliwa na zmianę temperatury, gdyż od niej zależy tworzenie rodników ponadtlenkowych. Biorąc pod uwagę, że inicjatory reakcji rodnikowych, np. AIBN, funkcjonują w oparciu o ich rozkład termiczny, czynnik temperaturowy powinien być bardzo ściśle kontrolowany. Możliwe jest badanie próbek zarówno lipofilnych, jak i hydrofilowych, jednak wymaga to zastosowania inicjatora o odpowiednim charakterze. W przeszłości, jako sondy fluorescencyjnej używano β -fikoerytryny, czyli czerwonego barwnika występującego w krasnorostach, jednak zrezygnowano z niej na rzecz fluoresceiny ze względu na to, że niejednakowo reaguje z różnymi przeciwutleniaczami oraz może ulegać fotowysyblaniu [49].

3.3.6. Test TRAP

Metoda ta zawdzięcza swoją nazwę określeniu w języku angielskim — *total reactive antioxidant potential* (TRAP) — co tłumaczy się jako: całkowity reaktywny potencjał przeciwutleniający. Podobnie jak wcześniej, w warunkach inicjatora reakcji rodnikowej, generowany jest rodnik ponadtlenkowy lub hydroksylowy. Na szczególną uwagę zasługuje wariant oparty o chemiluminescencję, gdzie wygenerowany rodnik reagując z luminolem wydziela kwant światła o określonej barwie. Wydajność kwantowa procesu chemiluminescencji stanowi podstawę do ilościowego określenia właściwości przeciwutleniających próbek. Im silniejszy antyoksydant, tym intensywność świecenia niższa. Do pomiaru tego zjawiska wykorzystuje się fotometr (ang. *luminometer*). Istnieją również warianty, w których ponownie wykorzystuje się zjawisko fluorescencji.

Zbiór reakcji prezentujących chemizm tego testu zaprezentowany jest na **Schemacie 13**.

TEST TRAP



Schemat 13. Reakcje leżące u podstaw testu TRAP

Ocena ilościowa testu TRAP może być związana z obliczeniem współczynnika TRAP i TAR. Ten pierwszy wiąże ze sobą liczbę moli związanych rodników ze stężeniem składników, w odniesieniu do liczby moli wzorca (Trolox). Określa się go dla dużych stężeń analizowanych antyoksydantów. W przypadku niskiego stężenia, gdy następuje niecałkowite przereagowanie z luminolem, określa się parametr TAR, który wiąże ze sobą stałe szybkości reakcji dla poszczególnych składników, ze stałą szybkości reagowania wzorca [49]. Ze względu na złożony charakter zjawiska chemiluminescencji, wysoką czułość na zmianę temperatury w kontekście tworzenia rodników nadtlenkowych, a także możliwość występowania efektu matrycy, modyfikującego wydajność kwantową procesu luminescencji, nie obserwuje się szerokiego zastosowania tego testu, a szczególnie dla złożonych mieszanin związków.

3.4. Enzymatyczne metody określania właściwości przeciwutleniających

Uzupełnieniem chemicznych metod określania właściwości przeciwutleniających są metody enzymatyczne. Bazują one na pierwotnej aktywności redoks enzymów z grupy dysmutaz, peroksydaz, oksydoreduktaz i oksydaz. Opierają się one zwykle na cyklach reakcji, w których generowane są reaktywne formy tlenu, wpływające na podstawową reakcję katalizowaną enzymem. W układzie współwystępuje antyoksydant, enzym, ROS oraz czynnik utrwalający odpowiedź układu na działanie ROS i przeciwutleniacza. Utrwalenie to może być osiągnięte

dzięki zastosowaniu metod kolorymetrycznych, fluorescencyjnych, chemiluminescencyjnych, a także spektroskopii w ultrafiolecie. W efekcie, uzyskuje się odpowiedź wyrażoną w ułamku inhibicji danego enzymu, bądź w formie współczynnika IC_{50} . Należy bardzo uważnie prześledzić cykl reakcji, aby zrozumieć, jak niska, bądź wysoka wartość odpowiedzi wpływa na właściwości redoks. Wysoki procent inhibicji enzymu oraz niska wartość stężenia IC_{50} dla proteiny generującej składniki pro-oksydacyjne, ma korzystne działanie z punktu widzenia właściwości przeciwutleniających. Czasem jednak zmierzona odpowiedź odnosi się do składników otoczenia lub sztucznie wygenerowanych reaktywnych form tlenu, dlatego tak istotne jest pełne zrozumienie mechanizmu działania stosowanych testów enzymatycznych.

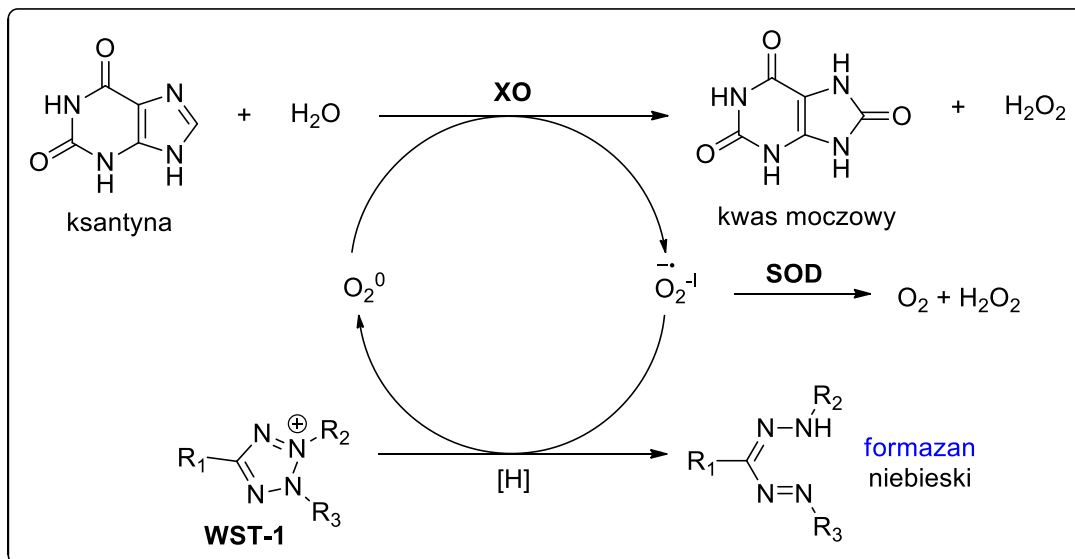
Opracowanie to składa się z: informacji ogólnych na temat enzymu, omówienia działania testu z praktycznego punktu widzenia, a także grafiki podsumowującej dwa poprzednie aspekty. Ma to na celu poszerzenie informacji o podstawowych, chemicznych testach antyoksydacyjnych, o te, prowadzone w obecności mieszanin wieloskładnikowych, naśladujących rzeczywiste warunki działania enzymów w ustroju.

3.4.1. Analiza aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD)

Dysmutaza ponadtlenkowa (ang. *superoxide dismutase*, SOD) to enzym powszechnie spotykany w przyrodzie. Jego aktywność polega na katalizowaniu reakcji dysproporcjonowania anionorodnika ponadtlenkowego do tlenu cząsteczkowego i nadtlenu wodoru. Dysmutaza ponadtlenkowa stanowi pierwszą linię obrony przed urazami wywołanymi przez reaktywne formy tlenu (ROS) i ma działanie przeciwzapalne. W organizmie człowieka anionorodnik ponadtlenkowy może powstawać jako produkt uboczny procesu oddychania w mitochondriach. W mleku krowim, w obecności oksydazy ksantynowej (ang. *xanthine oxidase*, XO), laktoperoksydazy i w wyniku fotoutleniania ryboflawiny, również mogą powstawać te cząsteczki. SOD stanowi w obu przypadkach naturalny mechanizm obrony przed stresem oksydacyjnym [50-52].

Testy enzymatyczne SOD są dostępne w handlu. Aktywność SOD określa się poprzez pomiar spadku liczby anionów ponadtlenkowych (generowanych przez XO). W związku z tym, że oddziałują one z obecnym w medium barwnikiem WST-1, który ma maksimum absorpcji przy 450 nm, spadek intensywności wybarwienia jest proporcjonalny do aktywności hamowania SOD. Inhibicja SOD może być określona w procentach hamowania lub w formie współczynnika IC_{50} , stosując jako standard enzym SOD. Im niższa wartość IC_{50} , tym silniejsze są właściwości przeciwutleniające danej substancji, ponieważ efektywnie neutralizuje ona anionorodniki ponadtlenkowe już przy niskich stężeniach. Poniżej przedstawiono schemat funkcjonowania testu enzymatycznego opartego o aktywność SOD (**Schemat 14**). W środkowym cyklu reakcji redoks dla tlenu cząsteczkowego podano stopień utlenienia cząsteczek, aby zrozumieć istotę zachodzących przemian [51, 52].

TEST ENZYMATYCZNY SOD



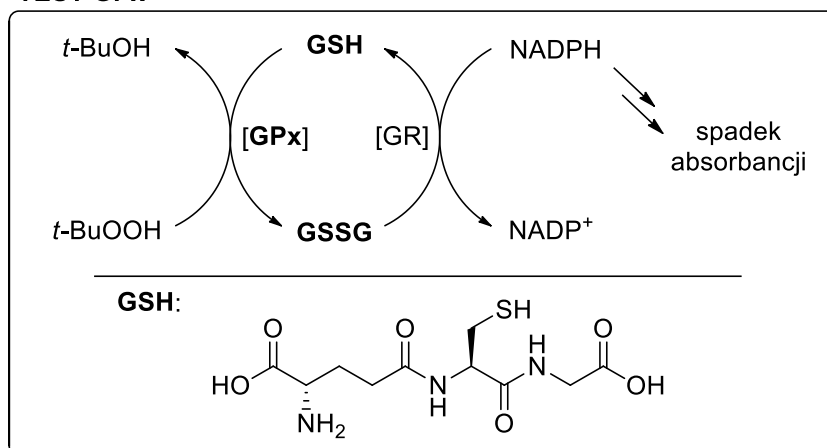
Schemat 14. Podstawy funkcjonowania testu enzymatycznego opartego o aktywność SOD [53]

3.4.2. Analiza aktywności peroksydazy glutationowej (GPx)

Peroksydaza glutationowa (ang. *glutathione peroxidase*, GPx) to enzym katalizujący przemianę glutationu (GSH) w disulfid glutationu (GSSG), która biegnie w obecności nadtlenu. Jest to kolejny przykład mechanizmu biochemicznego chroniącego komórki przed stresem oksydacyjnym. Enzym ten wiąże się szczególnie z procesem utleniania tłuszczów, gdyż jest on zdolny do rozkładu nadtlenu i wodoronadtlenków lipidów do alkoholi i wody. Występuje w równowadze z reduktazą glutationową (ang. *glutathione reductase*, GR), która odpowiedzialna jest za redukcję powstałego disulfidu glutationu, pod wpływem NADPH, do glutationu, odtwarzając zdolności antyoksydacyjne cyklu [54].

Testy enzymatyczne oparte na aktywności GPx są dostępne komercyjnie i składają się z następujących elementów: (1) cyklu reakcji redoks dla ROS, (2) cyklu przemian redoks GSH/GS-SG oraz (3) cyklu reakcji NADPH/NADP⁺. Aktywność GPx jest mierzona pośrednio poprzez zużycie NADPH, które jest używane do regeneracji GSH z GSSG przez reduktazę glutationową (GR). Zmniejszenie absorbancji NADPH (maksimum przy $\lambda = 340 \text{ nm}$), wynikające z tworzenia się NADP⁺, przekłada się pośrednio na aktywność enzymu GPx. Można zatem stwierdzić, że aktywności GPx i GR są wzajemnie uzupełniające. Transformacja GSH do GSSG inicjowana jest nadtlenukami, np. nadtlenukiem wodoru, wodoronadtlenkiem kumylu, wodoronadtlenkiem *t*-butylu. Im większy spadek absorbancji mieszaniny, tym większe zużycie NADPH, co odzwierciedla wyższą aktywność enzymatyczną GPx. Ta zaś oznacza pozytywny wpływ na redukcję nadtlenuków i ochronę komórek przed stresem oksydacyjnym w obecności badanych przeciwutleniaczy. Poniżej zaprezentowano cykle reakcji leżące u podstaw tego testu (Schemat 15) [54, 55].

TEST GPx



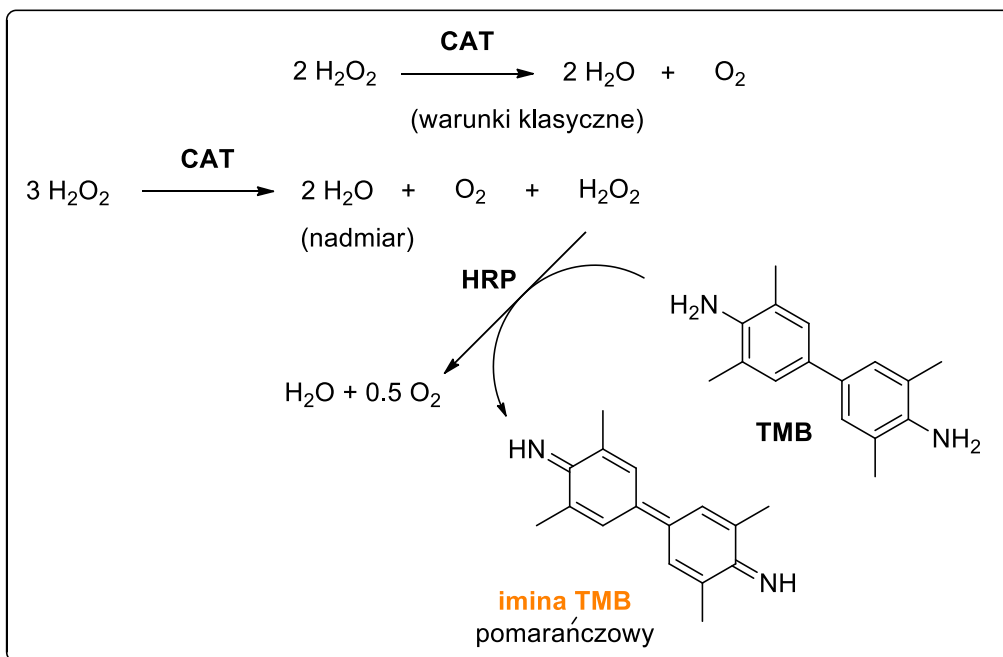
Schemat 15. Cykle reakcji leżące u podstaw testu GPx

3.4.3. Analiza aktywności katalazy (CAT)

Katalaza (ang. *catalase*, CAT) jest wszechobecnym enzymem o aktywności przeciwutleniającej który rozkłada nadtlenek wodoru do wody i tlenu. Niektóre patogeny wytwarza katalazę, aby bronić się przed nadtlenkiem wodoru, który jest powszechnie używany przez układ odpornościowy żywiciela, wliczając się w szeroko pojęte zjawisko stresu oksydacyjnego [56]. Nadtlenek wodoru jest jedną z najczęściej występujących reaktywnych form tlenu. Jest obecny w środowisku lub powstaje jako produkt uboczny metabolizmu tlenowego, tworzenia i dysproporcjonowania anionorodnika ponadtlenkowego lub jako produkt aktywności oksydaz. Zarówno nadmiar nadtlenku wodoru, jak i rodnik hydroksylowy będący produktem jego rozkładu, są szkodliwe dla większości składników komórek. Jego szybkie usunięcie jest niezwykle istotne dla wszystkich żyjących, zdrowych komórek prokariotycznych i eukariotycznych. Pełni on jednak istotną rolę w szlakach przekazywania sygnału, w aktywacji komórek odpornościowych, procesach zapalnych, proliferacji komórek i apoptozie [57].

Test CAT (Schemat 16) może być używany do oceny substancji o potencjalnych właściwościach przeciwutleniających, które mogą wpływać na aktywność katalazy. W praktyce, wygląda to następująco: (1) przygotowuje się próbkę przeciwutleniacza, enzymu CAT oraz bufora, następnie (2) dodaje się określoną ilość nadtlenku wodoru i próbkę inkubuje przez 30 minut, by potem (3) mieszaninę zadać układem barwnym, umożliwiającym ocenę nadmiaru/niedomiaru nadtlenku wodoru. Istnieje wiele substancji chromogenicznych (substancja zdolna do przekształcenia się w pigment lub barwnik), które można zastosować, jednak na szczególną uwagę zasługuje 3,3',5,5'-tetrametylobenzidyna. Związek ten pod wpływem nadtlenku wodoru i peroksydazy chrzanowej (ang. *horseradish peroxidase*, HRP) utlenia się do swojej barwnej formy iminowej (typu chinoidowego), która ma maksimum absorpcji przy długości fali równej 605 nm. Im mniej H_2O_2 pozostało po reakcji, tym mniej barwnej iminy powstaje, co jest odwrotnie proporcjonalne do aktywności katalazy. Antyoksydant należy dodać przed rozpoczęciem reakcji z H_2O_2 , aby prawidłowo ocenić jego zdolność do neutralizowania nadtlenku wodoru i wtórnie — jego wpływ na reakcję barwną w układzie HRP/TMB [57].

TEST CAT



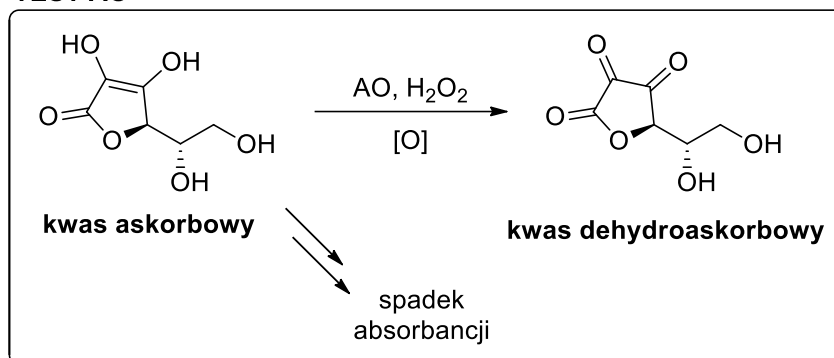
Schemat 16. Podstawy funkcjonowania testu enzymatycznego opartego na aktywności CAT

3.4.4. Analiza aktywności oksydazy askrobinianowej

Oksydaza *L*-askrobinianowa (ang. *L-ascorbate oxidase*, AO) to enzym odpowiedzialny za utlenianie kwasu askorbinowego do kwasu dehydroaskorbinowego (ang. *dehydroascorbic acid*, DHA), z jednoczesnym transferem czterech elektronów do cząsteczki tlenu i wytworzeniem cząsteczki wody. Enzym ten spotykany jest głównie w roślinach, grzybach i bakteriach, jednak może mieć on przełożenie na aktywność redoks witaminy C w organizmie człowieka [58]. Według autorów testu enzymatycznego dostępnego handlowo, AO zdolna jest do transformowania kwasu askorbinowego, w warunkach aerobowych, do DHA i nadtlenu wodoru, a ilość tego ostatniego może być oznaczona kolorymetrycznie [59].

Jeden z prostszych wariantów testu AO zakłada użycie nadtlenu wodoru w reakcji utleniania kwasu askorbinowego do DHA. W tej transformacji, witamina C ulega skonsumowaniu, co przekłada się na spadek absorbancji w okolicy maksimum absorpcji dla tego związku, to jest: $\lambda = 265\text{-}290 \text{ nm}$. Maksima absorpcji kwasu askorbinowego oraz DHA nie nakładają się [60]. Schemat działania testu opartego o aktywność AO jest przedstawiony poniżej (**Schemat 17**).

TEST AO



Schemat 17. Podstawy funkcjonowania testu opartego o aktywność AO

Metoda ta budzi wiele wątpliwości ze względu na: (1) ryzyko powstania większej liczby produktów utleniającej degradacji kwasu askorbinowego oraz DHA (np. kwas 2,3-diketogulonowy, kwas 4,5,5,6-tetrahydroksy-2,3-diketoheksanowy), które mogą wpływać na interpretację wyników, a także generować inne, prostsze produkty uboczne, również o właściwościach redoks [58], (2) silnie utleniające środowisko reakcji, które może powodować zniszczenie struktury antyoksydantów, (3) niejasną aktywność AO w odniesieniu do źródeł literaturowych i katalogów reklamowych producentów testów enzymatycznych [59, 60], (4) potencjalnie przeciwutleniający charakter DHA [58], pomimo jego nietrwałości w wodzie [61].

3.5. Aktywność biologiczna, występowanie i otrzymywanie wybranych związków fenolowych

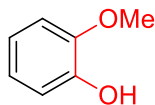
W niniejszym podrozdziale zaprezentowane zostały przykłady bioaktywności, występowania oraz otrzymywania wybranych związków fenolowych, w oparciu o ich podział na metoksylované fenole oraz związki fenolowe. Odseparowanie tych klas od siebie ma charakter czysto techniczny, wynikający z późniejszego opracowania wyników badań dla nowych, estrowych pochodnych kwasu mykofenolowego. Związki te często współwystępują w tkankach roślinnych, mają zbieżne, nierzadko przeciwutleniające i przeciwzapalne właściwości, a także podobne mechanizmy biosyntezy.

Opracowanie to składa się ze wskazania wzoru strukturalnego, nazw i właściwości biologicznych dla każdej pochodnej z osobna. Jedna z wybranych bioaktywności omówiona jest bardziej szczegółowo, zwykle w celu podkreślenia aktywności opartej o ROS. Następnie, prezentowane są rodzaje, bądź gatunki roślin, w których występują, a także metody ich syntezy i biosyntezy.

Zebranie tych informacji w jednym miejscu ma za zadanie przedstawić najistotniejsze z punktu widzenia chemii medycznej, informacje na temat tych związków naturalnych, a także stanowi dokładny przegląd literaturowy i przesłankę pod kontynuowanie wątku estrowych pochodnych kwasu mykofenolowego. Przykłady związane z zingeronem, kwasem ferulowym, bakuchiolem i ketonem malinowym zasługują na szczególną uwagę, gdyż związki te są intensywnie badane pod kątem właściwości nutraceutycznych i adaptogennych, co jest szczególnie ważne dla nowoczesnej diety i kosmetyki.

3.5.1. MetoksyLOWane fenole

3.5.1.1. Gwajakol

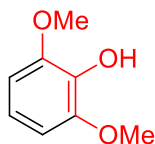


Rysunek 16. Wzór strukturalny gwajakolu

Gwajakol (2-metoksyfenol) (**Rysunek 16**) jest związkiem stosowanym w stomatologii i medycynie jako antyseptyk, środek znieczulający, czy wykrztuśny. Niektóre źródła podają, że wywołuje proliferację komórek, dzięki zdolności do zmiatania wolnych rodników, a te często są odpowiedzialne za degradację składników ustroju (np. utlenianie tłuszczów, białek, czy struktury DNA). Choć ta właściwość jest trudna do zmierzenia w warunkach *in vivo*, eksperymenty chemiczne potwierdziły zdolność gwajakolu do wydajnego zmiatania rodnika hydroksylowego (generowanego w reakcji Fentona), a także rodnika typu hydrazynylowego (obecny w teście DPPH) [62].

Istotnym, naturalnym źródłem pochodzenia gwajakolu jest żywica roślin z rodzaju gwajakowca (*Guaiacum* L.), skąd również jego nazwa. Ponadto, niektóre zwierzęta z gromady owadów (np. krocionóg szklarniowy, *Oxidus gracilis*) są zdolne do biosyntezy pochodnych fenolu, w tym gwajakolu. Związek ten kojarzony jest z zapachem palonego tytoniu i pieczonej żywności, jest więc produktem procesów ich pirolizy. Niekiedy używa się go do sztucznego nawaniania produktów przeznaczonych do użytku komercyjnego. Główną, przemysłową metodą jego pozyskiwania jest proces metylowania katecholu siarczanem(VI) dimetylu [63, 64].

3.5.1.2. Syringol



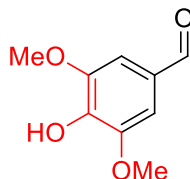
Rysunek 17. Wzór strukturalny syringolu

Syringol (2,6-dimetoksyfenol) (**Rysunek 17**) to związek wykazujący właściwości przeciwutleniające, bakteriostatyczne oraz grzybobójcze [65]. Przykładem reprezentującym te pierwsze jest badanie *in vivo* przeprowadzone na modelu szczurzym, które wykazało, że podaż syringolu w pożywieniu wywołuje zredukowanie poziomu kancerogennej *N*-nitrozomorfoliny we krwi, w treści żołądkowej, bądź zawartości dwunastnicy u tych zwierząt, nawet do 89%. Przedstawia to pewną możliwość zastosowania związków naturalnych typu fenolowego w minimalizowaniu produkcji toksycznych produktów obróbki termicznej konserwowanej żywności [66].

Wysokie stężenia metoksyfenoli, w tym syringolu, obserwuje się w żywicach, korze, bądź drewnie wielu gatunków drzew pospolitych, np. sosna, świerk, wierzba, a także niektórych gatunkach traw. Wynika to z degradacji złożonej struktury ligniny, czyli istotnego składnika

budulcowego drewna, do tych związków małącząsteczkowych, przez grzyby z rodziny boczniakowatych (np. bocznik mikołajkowy, *Pleurotus eryngii*), czy korownicowatych. Gazy odlotowe powstałe w wyniku spalania drewna buku, wierzby, bądź brzozy, także zawierają pewne ilości syryngolu, wykazując, że ten element roślin jest istotnym rezerwuarem metoksyLOWANYCH fenoli [65]. Jedną z możliwych, przemysłowych metod syntezy syryngolu jest dekarboksylacja i selektywne metylowanie kwasu galusowego z wykorzystaniem węgla dimetylu i katalizatora przeniesienia międzyfazowego [67].

3.5.1.3. Aldehyd syryngowy

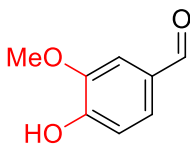


Rysunek 18. Wzór strukturalny aldehydu syryngowego

Aldehyd syryngowy (4-hydroksy-3,5-dimetoksybenzaldehyd), inaczej: syringaldehyd (**Rysunek 18**), to związek fenolowy wykazujący właściwości przeciwbakteryjne, przeciwgrzybowe i przeciwutleniające. Niektóre badania komórkowe *in vitro* wskazują również na jego aktywność przeciwzapalną, antynowotworową i przeciwcukrzycową [68]. Jako przykład właściwości przeciwrakowych można wskazać, iż spośród serii związków wyizolowanych z syropu klonowego, aldehyd syryngowy bardzo efektywnie hamuje rozwój komórek nowotworowych testowanych trzech z czterech linii komórkowych, to jest: HCT-116, Caco-2 i HT-29, na poziomie współczynnika IC_{50} mieszczącego się w przedziale 35-90 $\mu\text{g/mL}$ [69]. Ponadto, zastosowanie aldehydu syryngowego może zmniejszać stres oksydacyjny, zmiany zwyrodnieniowe i migrację komórek zapalnych w niedokrwionym rdzeniu kręgowym, co zostało udowodnione na modelu króliczym *in vivo* [70].

Źródłem aldehydu syryngowego w przyrodzie może być zmielone drewno klonowe (*Acer L.*), które poddane: obróbce chemicznej w obecności nitrobenzenu i wodorotlenku sodu, w podwyższonej temperaturze, następnie, zakwaszeniu i szeregu ekstrakcji z wykorzystaniem rozpuszczalnika organicznego, daje pożądany produkt [71]. Jedną z opatentowanych metod otrzymywania tego związku zakłada wykorzystanie syryngolu jako produktu wyjściowego. Jego O-allilowanie, poddanie przegrupowaniu Claisena, izomeryzacja grupy allilowej w 1-propenylową, i następcze utlenianie, np. tlenkiem miedzi(I), bądź nitrobenzenem, w środowisku zasadowym, pozwala na dogodną syntezę produktu [72].

3.5.1.4. Wanilina

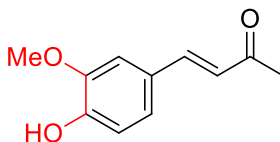


Rysunek 19. Wzór strukturalny waniliny

Wanilina (4-hidroksy-3-metoksybenzaldehyd) (**Rysunek 19**) jest silnie rozpowszechnionym w przemyśle perfumeryjnym i spożywczym środkiem aromatyzującym. Niektóre źródła donoszą, iż poza nadawaniem silnego smaku i zapachu, posiada on właściwości przeciwrakowe, przeciwutleniające i przeciwzapalne, czy neuroprotektoryjne. W urazach rdzenia kręgowego, badanych na modelu szczurzym, wanilina wywiera działanie neuroprotektoryjne, hamując apoptozę i redukując ekspresję HIF- α (ang. *hypoxia-inducible factor 1*, czynnik indukowany hipoksją 1) w tkankach rdzenia kręgowego. Choć ten ostatni czynnik wywiera ogólnie pozytywne działanie na tkanki w warunkach obniżonej zawartości tlenu, jego nadmierna aktywacja może promować procesy zapalne i wzmacniać przerost naczyń krwionośnych. Sugeruje się, że ten atypowy mechanistycznie efekt neuroprotektoryjny wynika ze zmiatania reaktywnych form tlenu (ROS) przez wanilinę, a to doprowadza do złagodzenia upośledzonej pracy mitochondriów, redukcji peroksydacji lipidów i zahamowania apoptozy [73].

Wanilina jest otrzymywana na drodze ekstrakcji ciała stałe-ciecz ze strączków wanilii trzech jej podstawowych gatunków: *Vanilla planifolia*, *Vanilla tahitensis* i *Vanilla pompona*. Jego nazwa również pochodzi od tego rodzaju roślin. Choć związek ten pozyskany metodami syntetycznymi jest znacznie tańszy w produkcji, metody ekstrakcyjne nadal dominują, gdyż to pierwsze pochodzenie wywołuje negatywny odbiór wśród konsumentów (branża spożywcza). Metody jej otrzymywania opierają się na różnych surowcach, choć najczęściej są one pochodzenia ligninowego (zmielone drewno, odpady ze zbioru i obróbki zbóż, czy nawet odchody zwierząt roślinożernych). Najbardziej zaawansowane metody oparte są o transformacje biotechnologiczne, w których wykorzystuje się metody bioinżynieryjne (modyfikacja genów bakterii i roślin, przemiany enzymatyczne) [73].

3.5.1.5. Dehydrozingeron



Rysunek 20. Wzór strukturalny dehydrozingeronu

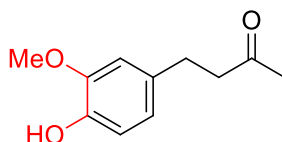
Dehydrozingeron ((*E*)-4-(4-hidroksy-3-metoksyfenilo)but-3-en-2-on), inaczej: wanilidenoaceton (**Rysunek 20**), to związek fitochemiczny z grupy fenylopropanoidów. Przynależy do klasy zarówno ketonów typu styrenowego, jak i pochodnych kwasu ferulowego (kwasu (*E*)-4-hidroksy-3-metoksycynamonowego). Niekiedy nazywany jest feruloilowanym metanem. Strukturalnie stanowi połowę cząsteczki kurkuminy, czyli pigmentu nadającego



zabarwienia kurkumie, co może wskazywać na ich zbieżny mechanizm biosyntezy w tkankach roślinnych. W niektórych badaniach wykazał właściwości przeciwzapalne, przeciwdepresyjne, antybiotyczne, przeciwtleniające, czy przeciwnowotworowe [74]. Jego właściwości, jako potencjalnego chemoterapeutyka, były badane w odniesieniu do linii komórek raka jelita grubego, HT-29. Powoduje on nagromadzenie ROS w komórkach raka, tym samym doprowadzając do zatrzymania ich cyklu życia. Choć obecność ROS kojarzona jest raczej z promowaniem kancerogenezy, na drodze wywoływania procesów zapalnych i uszkodzenia DNA, w tym wypadku ich podwyższony poziom promuje śmierć chorych komórek, nie mając negatywnego wpływu na ich zdrowe odpowiedniki [75, 76]. Przykład ten pokazuje, że w procesach chorobotwórczych, niekiedy indukowany wzrost ilości wolnych rodników, w tym reaktywnych form tlenu, ma pozytywny wpływ na zdrowe komórki. Ponadto, nie zawsze obserwowana aktywność przeciwtleniająca w warunkach *in vitro* przekłada się na te same właściwości w ustroju.

Naturalnym źródłem występowania dehydrozingeronu są przeważnie kłącza roślin z rodziny imbirowatych (*Zingiberaceae*), np. imbiru lekarskiego (*Zingiber officinale* Rosc.), czy kurkumy (*Curcuma longa* L.). Często współwystępuje ze swoim nasyconym analogiem — zingeronem, a także innymi wariantami strukturalnymi. Źródłowym nazwy zingeron oraz dehydrozingeron jest rodzina roślin imbirowatych. Możliwa jest jego pozyskanie z suszonego, mielonego kłącza imbiru, wykorzystując proces ekstrakcji ciało stałe-ciecz [77]. Związek ten nie znalazł szerszego zastosowania, stąd trudno doszukać się jego przemysłowych metod otrzymywania. Możliwe jest jednak przeprowadzenie prostej, jednostopniowej syntezy, korzystającej z łatwo dostępnych substratów, takich jak: wanilina, aceton oraz wodorotlenek sodu [78].

3.5.1.6. Zingeron



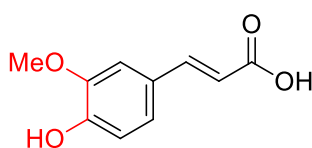
Rysunek 21. Wzór strukturalny zingeronu

Zingeron (4-(4-hydroksy-3-metoksyfenylo)butan-2-on), to zredukowany odpowiednik dehydrozingeronu (**Rysunek 21**). Jest to związek fenolowy posiadający właściwości przeciwtleniające, przeciwzapalne, a także przeciwnowotworowe. Ponadto, znany jest z właściwości przeciwwymiotnych, przeciwbiegunkowych, a także immunostymulujących. Jest odpowiedzialny za ostry smak imbiru. Przykładami reprezentującymi jego unikalne właściwości przeciwtleniające są: hamowanie indukowanej askrobinianem żelaza(III) peroksydacji lipidów na modelu szczurzym, ochrona DNA przed inicjowanym chlorkiem cyny(II) stresem oksydacyjnym, czy też inhibicja białek proapoptotycznych (np. kaspazy 3 do 9). Związek ten wykazuje stosunkowo wysokie właściwości przeciwtleniające w odniesieniu do kwasu askorbinowego, zmiata rodniki nadtlenoazotynowe, a także ma zdolność do hamowania reaktywnych form tlenu. Uważa się, że jest on adaptogenem, czyli związkiem ułatwiającym

przystosowanie organizmu do niekorzystnych warunków środowiska (stres, ksenobiotyki, patogeny) [79].

Jak już wspomniano wcześniej, zingeron współwystępuje z jego styrenowym wariantem w kłączach roślin z rodziny imbirowatych, w tym w galangalu mniejszym (*Alpinia officinarum* Hance) czy galangalu większym (*Alpinia galanga* L.) [77, 79]. W literaturze można również spotkać biosyntezę zingeronu z kwasu ferulowego, w której przemianę tę katalizuje między innymi syntaza poliketydowa typu III pochodząca z pieprzu metystynowego (*Piper methysticum*), w organizmie modyfikowanej genetycznie *E. coli* [80]. Może być otrzymany na drodze syntezy z dehydrozingeronu, który poddany selektywnej redukcji wiązania podwójnego w obecności chlorku niklu(II) i borowodoru sodu, z wydajnością 80%, daje pożądany produkt [78].

3.5.1.7. Kwas ferulowy

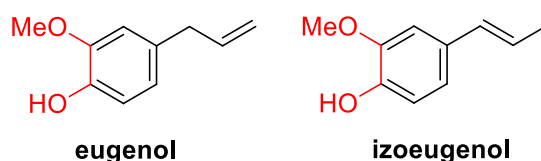


Rysunek 22. Wzór strukturalny kwasu ferulowego

Kwas ferulowy (kwas (*E*)-4-hydroksy-3-metoksycynamonowy) (**Rysunek 22**) to związek z rodziny kwasów hydroksycynamonowych. Jego nazwa pochodzi od roślin z rzędu selerowatych (*Apiaceae* Lindl.), rodzaju zapalczkowatych (*Ferula*). Pełni szereg funkcji biologicznych ze względu na szerokie występowanie w masie ligninowo-celulozowej. Wykazuje wiele potencjalnych właściwości terapeutycznych, w tym: przeciwnowotworowych, przeciwcukrzycowych i działa jako środek hamujący choroby układu krążenia. Jego właściwości przeciwutleniające uważane są za silniejsze niż waniliny, kwasów kumarowych, czy cynamonowych. Jest stosowany w przemyśle kosmetycznym jako środek fotopochronny (promieniowanie UV), a także depigmentujący skórę. W zestawieniu z kwasem askrobinowym i tokoferolami, zwiększa stabilność chemiczną tych witamin oraz wzmacnia ich właściwości fotoprotekcyjne [81].

Kwas ferulowy jest spotykany w tkankach roślinnych w trzech formach: rozpuszczalnej-wolnej (wolny kwas), rozpuszczalnej-sprężonej (estry cukrów) oraz nierozpuszczalnej-związanej. Każda z nich spotykana jest w kompleksach ligninowo-celulozowych obecnych w otrębach pszennych, bądź kukurydzianych. Znane są przykłady ekstrakcji z wykorzystaniem wody przegrzanej, czy metanolu. Przemysłowo produkowany jest metodami ekstrakcyjnymi, choć podejmowane są próby jego otrzymywania na drodze biosyntezy z *L*-tyrozyny, która poddawana jest szeregowi reakcji enzymatycznych w organizmie żywiciela — *E. coli* [81].

3.5.1.8. Eugenol i izoeugenol



Rysunek 23. Wzory strukturalne eugenol i izoeugenolu

Eugenol (4-allyl-2-metoksyfenol) i izoeugenol ((*E*)-4-(prop-1-en-1-yl)-2-metoksyfenol) to pochodne gwajakolu (**Rysunek 23**), podstawione w czwartej pozycji grupą propenylową, będące wobec siebie izomerami konstytucyjnymi.

Eugenol posiada właściwości przeciwbakteryjne, przeciwzapalne, przeciwutleniające, a także przeciwnowotworowe. Wyrazem właściwości antyoksydacyjnych eugenolu jest jego zdolność do zmiatania reaktywnych form tlenu powstałych w ludzkich neutrofilach (w warunkach indukowanych), a także efektywna inhibicja mieloperoksydazy (ang. *myeloperoxidase*) w ludzkich leukocytach. Ten ostatni enzym odpowiedzialny jest za powstawanie kwasu chlorowego(I) w ustroju, co spotykane jest szczególnie w przebiegu reakcji zapalnych. Warto dodać, iż eugenol w wyższych stężeniach może wywoływać efekty pro-oksydacyjne, przyczyniając się do uszkodzenia DNA komórek tkanki łącznej właściwej u ludzi. Osiąganie aktywności przeciwnowotworowej przez eugenol może dojść do skutku przy pomocy zarówno właściwości antyoksydacyjnych (hamowanie mutacji), jak i pro-oksydacyjnych (wpływanie na szlaki sygnałowe, niszczenie komórek nowotworowych). Sugeruje się, że mechanizmy takiej bioaktywności wiążą się z: obniżaniem poziomu cytokin prozapalnych, regulowaniem syntezy prostaglandyn, a także spadkiem aktywności cyklooksygenazy indukowanej (COX-2) [82].

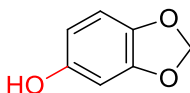
Większość właściwości biologicznych izoeugenolu jest zbliżona do tych obserwowanych w przypadku eugenolu. Można jednak wyróżnić w ich ramach właściwości antybiotyczne, które są wyższe, co do wartości, niż w tym drugim przypadku, w ramach testów *in vitro*. Dodatkowo, stwierdzono, iż izoeugenol ma silne działanie antycholinergiczne i przeciwcukrzycowe w odniesieniu do akarbozy (lek diabetologiczny) i takryny (inhibitor acetylocholinoesterazy, stosowany przy otępieniu w chorobie Alzheimer). W związku z tym, że izoeugenol skutecznie hamuje te oba enzymy, można go stosować w leczeniu łagodnej do umiarkowanej choroby Alzheimer oraz różnych, innych chorób pamięci [82, 83].

Związki te występują w znacznych ilościach w roślinach z rodziny: wawrzynowatych (*Lauraceae*), mirtowatych (*Myrtaceae*) i muskatołowcowatych (*Myristicaceae*), a szczególnie w oleju z goździkowca korzennego (*Syzygium aromaticum*). W 100 gramach goździków znajduje się około 0,94-1,47 g eugenolu, który jest związkiem dominującym w ich kompozycji zapachowej. Choć otrzymywanie eugenolu oparte jest o metody ekstrakcyjne, możliwa jest jego synteza z gwajakolu na drodze: *O*-allylowania i przegrupowania Claisena obserwowanego w ramach półproduktu. Możliwa jest izomeryzacja eugenolu w izoeugenol prowadzona w warunkach zasadowych, co zostało już wspomniane przy omawianiu syntezy aldehydu syryngowego. Metoda biotechnologiczna opiera się na manipulacjach genetycznych niektórych

mikroorganizmów, między innymi: bakterii maczugowca (*Corynebacterium*), *Streptomyces*, czy *E. coli* [82].

3.5.2. Związki fenolowe

3.5.2.1. Sezamol

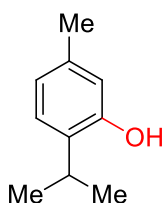


Rysunek 24. Wzór strukturalny sezamolu

Sezamol (3,4-metylenodioksyfenol, benzo[d]-1,3-dioksol-5-ol) (**Rysunek 24**) to związek fenolowy odpowiadający za kompozycję zapachową sezamu oraz oleju sezamowego. Dzięki obecności wolnej grupy fenolowej wykazuje działanie przeciwutleniające poprzez zdolność do zmiatania ROS. Sezamol może również osłabiać produkcję tlenu azotu i nadtlenu wodoru oraz zmniejszać aktywność monoaminooksydazy (ang. *monoamine oxidase*, MAO) w komórkach glejowych astrocytów. MAO odpowiedzialna jest za utrzymanie równowagi neuroprzekazników (takich jak serotonina, czy adrenalina) w mózgu, co jest istotne dla zdrowia psychicznego oraz prawidłowego funkcjonowania układu nerwowego. Aktywność ta może stanowić podstawę w walce z rozwojem chorób neurodegeneracyjnych takich jak choroba Alzheimera [84].

Sezamol, wraz z sezamoliną i sezaminą, przynależy do klasy lignanów sezamowych znajdujących się w nasionach roślin z rodziny sezamowatych, np. sezamu indyjskiego (*Sesamum indicum* L.) [85]. Z powodu niskiej wydajności otrzymywania sezamolu metodami ekstrakcyjnymi, opracowana została synteza chemiczna, w której jako substrat stosuje się piperonal (inaczej: heliotropinę), który w wyniku działania kwasem nadctowym, w obecności octanu sodu, i następczej hydrolizy powstałego mrówczanu sezamylu daje pożądany produkt [86].

3.5.2.2. Tymol



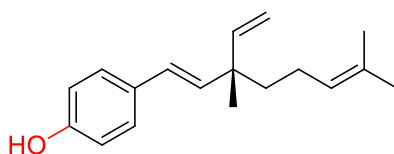
Rysunek 25. Wzór strukturalny tymolu

Tymol (2-izopropyl-5-metylofenol) (**Rysunek 25**) to związek fenolowy przynależący do klasy terpenoidów, odpowiedzialny za zapach tymianku i oleju tymiankowego oraz za ich właściwości biologiczne. Posiada właściwości przeciwutleniające, przeciwzapalne, a ponadto — immunomodulujące i bakteriostatyczne. Te ostatnie obserwowane są wobec wielu najczęściej spotykanych szczepów, zarówno z rodzaju bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych. Na modelu zwierzęcym wykazano, że związek ten wpływa na układ immunologiczny myszy na drodze podwyższania poziomu niektórych komórek układu odpornościowego (np. CD4, CD8) oraz białek (np. cytokiny Th1), które w efekcie zwiększają produkcję innych biomolekuł (takich jak

IFN- γ , czy IL-12), pozytywnie stymulując układ odpornościowy. Tymol został skatalogowany przez Amerykańską Agencję Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA) jako ogólnie bezpieczny w użyciu spożywczym i o znikomej toksyczności [87].

Jest on powszechnie spotykany w roślinach z rodziny jasnotowatych (Lamiaceae), na przykład: macierzanka (*Thymus* L.), lebiodka (*Origanum* L.) i cząber (*Satureja* L.). Jego biosynteza w tkankach roślinnych jest możliwa dzięki szeregowi transformacji opartych na terpenach i terpenoidach, takich jak: aromatyzacja γ -terpinenu do *p*-cymenu (4-izopropylotoluen), hydroksylowanie *p*-cymenu lub cyklizacja pirofosforanu geranylu, hydroksylowanie powstałego γ -terpinenu, a następnie utlenianie i tautomeryzacja produktu przejściowego. Z racji sporego zapotrzebowania w przemyśle, opracowana została metoda przemysłowa jego otrzymywania, która zakłada izopropylowanie *m*-krezolu w obecności propenu i dwutlenku węgla w stanie nadkrytycznym [87].

3.5.2.3. Bakuchiol



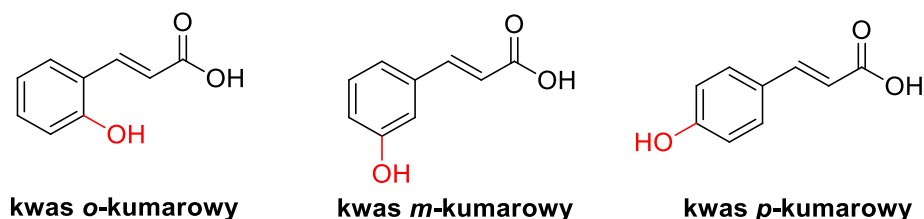
Rysunek 26. Wzór strukturalny bakuchiolu

Bakuchiol ((1*E*)-4-[(3*S*)-3-etenyl-3,7-dimetylookta-1,6-dien-1-yl]fenol) to związek fenolowy (**Rysunek 26**) przynależący do klasy meroterpenów (związków zawierających układy izoprenowe jedynie w części cząsteczki), a także terpenofenoli. Motywem strukturalnym odpowiadającym za bioaktywność bakuchiolu jest jego fragment 4-hydroksystyrenowy. Związek ten uznawany jest za roślinny odpowiednik retinolu, w związku z tym, że posiada zbliżone właściwości biochemiczne (ang. *functional analog*). Stosowany jest w przemyśle kosmetycznym, a także w tradycyjnej medycynie chińskiej (szczególnie w leczeniu chorób skóry). W formulacjach stosowanych bezpośrednio na skórę generuje mniej efektów ubocznych, takich jak: zaczerwienienie, pokrzywka, czy suchość, niż retinol. Bakuchiol został przetestowany na modelu szczurzym, ze sztucznie wywołanym zapaleniem ogólnoustrojowym, o objawach przypominających wstrząs septyczny, gdzie zauważono obniżenie poziomów markerów zapalnych i poprawę funkcji wątroby i nerek. Wskazuje to, że bakuchiol może mieć zastosowanie w leczeniu stanów zapalnych i sepsy. Poza tymi właściwościami, związek ten charakteryzuje się aktywnością przeciwutleniającą, przeciwbakteryjną, a także antyproliferacyjną [88, 89].

Najważniejszym źródłem bakuchiolu są rośliny z rodziny bobowatych (*Fabaceae* L.), w tym ziele Babchi (*Cullen corylifolium* L.). Związek ten można wyizolować ze wszystkich jej części, choć najwięcej znajduje się go w nasionach i owocach. Ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami, a także ta, prowadzona w aparacie Soxhleta, charakteryzują się najwyższymi wydajnościami, a eter naftowy okazuje się być najlepszym do tego rozpuszczalnikiem [88, 89]. Opracowanych zostało wiele metod syntezy bakuchiolu, jednak na szczególną uwagę zasługuje wariant 4-etapowy, gdzie związkiem wyjściowym jest *rac*-cytral, który na drodze katalizowanej

związkiem miedzi(I) reakcji α -winylowania, transformacji z udziałem związku Grignarda, dehydratacji oraz rozszczepienia eteru, daj pożądaný produkt końcowy w postaci racematu [90].

3.5.2.4. Kwasy kumarowe

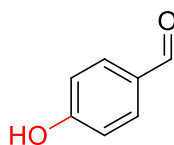


Rysunek 27. Wzory strukturalne kwasów kumarowych

Kwasy kumarowe (kwasy *o*-/*m*-/*p*-hydroksycynamonowy) przynależą do klasy kwasów fenolowych (**Rysunek 27**), a także ich podtypu — kwasów hydroksycynamonowych. Ze względu na obecność wolnej grupy fenolowej oraz układu styrenowego, związki z tej grupy wykazują działanie przeciwutleniające, przeciwzapalne, antybiotyczne oraz fotoprotekcyjne. Związki te, a szczególnie kwas *o*-kumarowy, mogą stanowić alternatywę wobec powszechnie stosowanych w przemyśle kosmetycznym, fototoksycznych parabenów. Dodatkowo, wykazują właściwości korygujące przebarwienia i modyfikujące procesy zapalne skóry. Kwas *p*-kumarowy wpływa na redukcję produkcji azotynów w stymulowanych makrofagach (komórki spotykane w procesie fagocytozy). Komórki te znane są z produkowania tlenu azotu(II), który jest istotnym czynnikiem służącym do walki z patogenami, biorącym udział w procesach zapalnych. Tlenek ten jest w ustroju rozkładany następnie do jonów azotanowych(III). Blokowanie czynników wtórnie odpowiedzialnych za produkcję tego związku (np. NF- κ B czy I κ B), mogą wpływać na zmniejszenie produkcji azotynów i łagodzenie reakcji zapalnej [91].

Najbardziej rozpowszechnionym kwasem kumarowym w przyrodzie jest kwas *p*-kumarowy. Wynika to z faktu, iż powstaje bezpośrednio z dostępnych w ustroju aminokwasów biogennych: *L*-tyrozyny lub *L*-fenyloalaniny, na drodze deaminacji pod wpływem liaz oraz monooksygenaz [92]. Pozostałe związki z tej klasy wymagają wykorzystania mniej rozpowszechnionych substratów, które zwykle obecne są w znikomych ilościach. Sugeruje się, że kwas *o*-kumarowy powstaje w wyniku reakcji utleniania kwasu melilotowego (kwas 3-(2-hydroksyfenylo)propanowy) pod wpływem oksydoreduktazy *o*-kumarynowej, co stanowi element metabolizmu *L*-fenyloalaniny [93]. Synteza kwasów kumarowych możliwa jest dzięki zastosowaniu reakcji Knoevenagla, gdzie substratem są hydroksylowane benzaldehydy i kwas malonowy, w pirydynie jako rozpuszczalniku, w warunkach katalizy zasadowej, np. piperydyną [94]. Kwasy kumarowe współwystępują w naturze z innymi kwasami fenolowymi, dlatego ich pozyskiwanie z materiału biologicznego nie jest tak rozpowszechnione i opłacalne. Niemniej jednak, warto przytoczyć kilka źródeł ich występowania w przyrodzie: kwas *o*-kumarowy — różanecznik dahurski (*Rhododendron dauricum* L.) [95], kwas *m*-kumarowy — malina właściwa (*Rubus idaeus* L.) [96], kwas *p*-kumarowy — herbata chińska (*Camellia sinensis* L.) [97].

3.5.2.5. 4-Hidroksybenzaldehyd

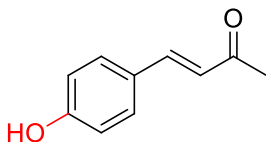


Rysunek 28. Wzór strukturalny 4-hidroksybenzaldehydu

4-Hidroksybenzaldehyd (**Rysunek 28**) to jeden z izomerów aldehydu salicylowego. Stanowi składnik aktywny mieszanek ziół stosowanych w Medycynie Chińskiej do leczenia bólu głowy, migreny, nerwobóli i problemów neurologicznych. Posiada właściwości przeciwutleniające i neuromodulujące, a także przyspiesza gojenie się ran. Kilka badań sugeruje, że 4-hidroksybenzaldehyd ma efekt prozdrowotny w zwierzęcym modelu insulinooporności i zdolny jest do hamowania cholinoesterazy, co może być wykorzystane w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych. Ponadto, ma zdolność do inhibicji transaminazy GABA (ang. *4-aminobutyrate transaminase*), czyli enzymu odpowiedzialnego za degradację tego neuroprzekaźnika, spotykanego w komórkach mózgu. Efekt ten jest silniejszy niż w przypadku szeroko rozpowszechnionego w medycynie kwasu walproinowego (lek przeciwpadaczkowy). Badania te wykazały, że zastosowanie 4-hidroksybenzaldehydu zwiększa poziomy GABA w mózgu, tym samym przyczyniając się do efektów przeciwpadaczkowych i przeciwpadaczkowych [98, 99].

Spotykany jest w roślinach z rodziny storczykowatych (*Orchidaceae* Juss.), w tym w gatunku *Gastrodia elata* Blume [100]. Opracowano syntezę przemysłową, w której 4-hidroksybenzaldehyd może być otrzymany na drodze: (1) hydroksymetylowania fenolu formaliną w środowisku zasadowym oraz (2) utleniania powstałego alkoholu typu benzyłowego z wykorzystaniem katalizatora złożonego z trójtlenku bizmutu, palladu i węgla aktywnego [101]. Inną metodą jego pozyskiwania jest oksydatywna dekarboksylacja kwasu 4-hydroksymigdałowego w obecności chlorku żelaza(III) [102].

3.5.2.6. Dehydroframbinon



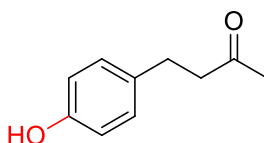
Rysunek 29. Wzór strukturalny dehydroframbinonu

Dehydroframbinon ((*E*)-4-(4-hidroksyfenylo)but-3-en-2-on) (**Rysunek 29**) to związek fenolowy przynależący do klasy fenylobutenonów. Jest jednym ze składników mieszanek roślinnych używanych w Tradycyjnej Medycynie Chińskiej, o właściwościach przeciwzapalnych, przeciwnowotworowych i moczopędnych. W testach *in vitro* na linii komórek nowotworowych K562 (ostra białaczka szpikowa, erytroleukemia) wykazuje cytotoksyczność wyrażoną współczynnikiem IC₅₀ na poziomie 60 μM [103]. Charakteryzuje się też pewną aktywnością przeciwpierwotniakową wobec trzech szczepów zarodźca sierpowatego (*Plasmodium*

falciparum) [104]. Wykazano, że dehydroframbinon, oraz jego pochodne, skutecznie hamuje peroksydację lipidów indukowaną przez jony nadtlenuazotynowe (ONOO^-) w erytrocytach oraz przeciwdziałają uszkodzeniom DNA w bakteriiach *Salmonella typhimurium*. Właściwości te były silniej zaznaczone niż w przypadku znanego zmiatacza rodników — Troloxu (analog witaminy E) [105].

Związek ten można wyekstrahować z każdej części rośliny o nazwie tarczycza brodata (*Scutellaria barbata*), która przynależy do rodziny jasnotowatych (*Lamiaceae* Lindl.) [103]. Jego synteza jest możliwa na drodze prostej kondensacji aldolowej, w której udział bierze 4-hydroksybenzaldehyd i aceton, w obecności 5 M kwasu solnego [104].

3.5.2.7. Keton malinowy



Rysunek 30. Wzór strukturalny ketonu malinowego

Keton malinowy (4-(4-hydroksyfenylo)butan-2-on, frambinon) (**Rysunek 30**) to związek fenolowy odpowiedzialny za charakterystyczny smak i zapach malin. Stanowi również element kompozycji zapachowych innych owoców. Jest powszechnie używany w przemyśle perfumeryjnym, kosmetycznym i spożywczym. Jedna z jego nazw — frambinon — pochodzi najpewniej od łacińskiego wyrażenia *fraga ambrosia*, czyli boska truskawka. Rdzeń tej nazwy spotykany jest również w języku francuskim, fr. *framboise*, i niderlandzkim, nl. *framboose*, gdzie obie oznaczają owoce maliny właściwej. W ostatnich latach zyskuje zainteresowanie ze względu na właściwości nutraceutyczne (środki dostarczające jednocześnie wartości odżywczych i właściwości produktów farmakologicznych). Wykazuje szereg właściwości, w tym: zwalczające otyłość, antyandrogenowe, hepato- i kardioprotekcyjne, czy przeciwzapalne. Jego silne właściwości przeciwutleniające zostały udokumentowane w badaniach na zwierzęcym modelu ostrego uszkodzenia wątroby wywołanego czterochlorkiem węgla. Zmniejszenie przez niego stresu oksydacyjnego powoduje wzrost poziomu kluczowych białek i enzymów antyoksydacyjnych, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) i glutation (GSH), a także wzrost całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC). Ponadto, keton malinowy redukuje poziom peroksydacji lipidów, co zostało zmierzone jako zmniejszenie ilości substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS). Te działania przyczyniają się do ochrony hepatocytów przed uszkodzeniami wywołanymi stresem oksydacyjnym, zapobiegając między innymi utracie integralności błon komórkowych oraz zmniejszając przecieki niektórych enzymów wątrobowych, takich jak ALT i AST [106].

Związek ten występuje w malinie właściwej (*Rubus idaeus*). Możliwa jest jego synteza chemiczna na drodze: (1) kondensacji 4-hydroksybenzaldehydu z acetonem w warunkach zasadowych i (2) selektywnej redukcji wiązania podwójnego borowodorkiem sodu w obecności jonów niklu(II), co zostało już zaprezentowane w punkcie rozdziału dotyczącym zingeronu.

Badacze opracowali również metody bioinżynieryjne, gdzie bakterie o aktywności drugorzędowej dehydrogenazy alkoholowej transformowały betulozyd (rododendrynę) w keton malinowy. Możliwe jest również manipulowanie genami grzybów gatunku *Saccharomyces cerevisiae* w celu dokonania biosyntezy tego związku z prostszych substratów [107].

4. Heterocykliczne motywy strukturalne

4.1. Wstęp

Motywy heterocykliczne stanowią jeden z najważniejszych elementów struktury wśród wszystkich istniejących leków. Stanowi o tym fakt, że cztery z pięciu najczęściej przepisywanych pacjentom medykamentów w USA, w 2014 roku, zawierały fragment heterocykliczny [108]. Dodatkowo, zauważono, iż 59% leków małącząsteczkowych sprzedawanych w USA (również w 2014 roku) posiadało w swej budowie układ przynależący do rodziny heterocykli opartych na atomie azotu [109]. Fakty te sprawiają, że heterocykle są najbardziej wyróżniającymi się motywami strukturalnymi w obszarze projektowania leków. Układy te znane są swoich unikatowych właściwości fizykochemicznych. Mogą służyć jako uniwersalne bioizostery, których lipofilność, polarność i rozpuszczalności w wodzie mogą być łatwo dostosowywalne, zależnie od pożądanych właściwości i od obranych celów molekularnych. Modyfikowanie tych właściwości fizykochemicznych jest możliwe ze względu na niejednakowy charakter aromatyczny i właściwości polarne pośród tej szerokiej klasy związków, często zgoła różny od odpowiedników nie zawierających silnie elektroujemnych pierwiastków [109].

Wszystkie omawiane poniżej układy heterocykliczne, to jest: 1,3-tiazole, benzo[d]-1,3-azole, pirymidyny oraz 1,2,4- i 1,3,4-oksadiazole, są powszechnie spotykane w chemii medycznej, jako przykłady podstawienia bioizosterycznego klasycznych grup funkcyjnych oraz jako rdzenie strukturalne leków i potencjalnych leków. Szczegółowe omówienie metod ich syntezy, a także wybranych właściwości biologicznych, jest naturalną konsekwencją, wynikającą z podjęcia zmagania nad syntezą nowych pochodnych **MPA**, w których pełnią one istotną rolę.

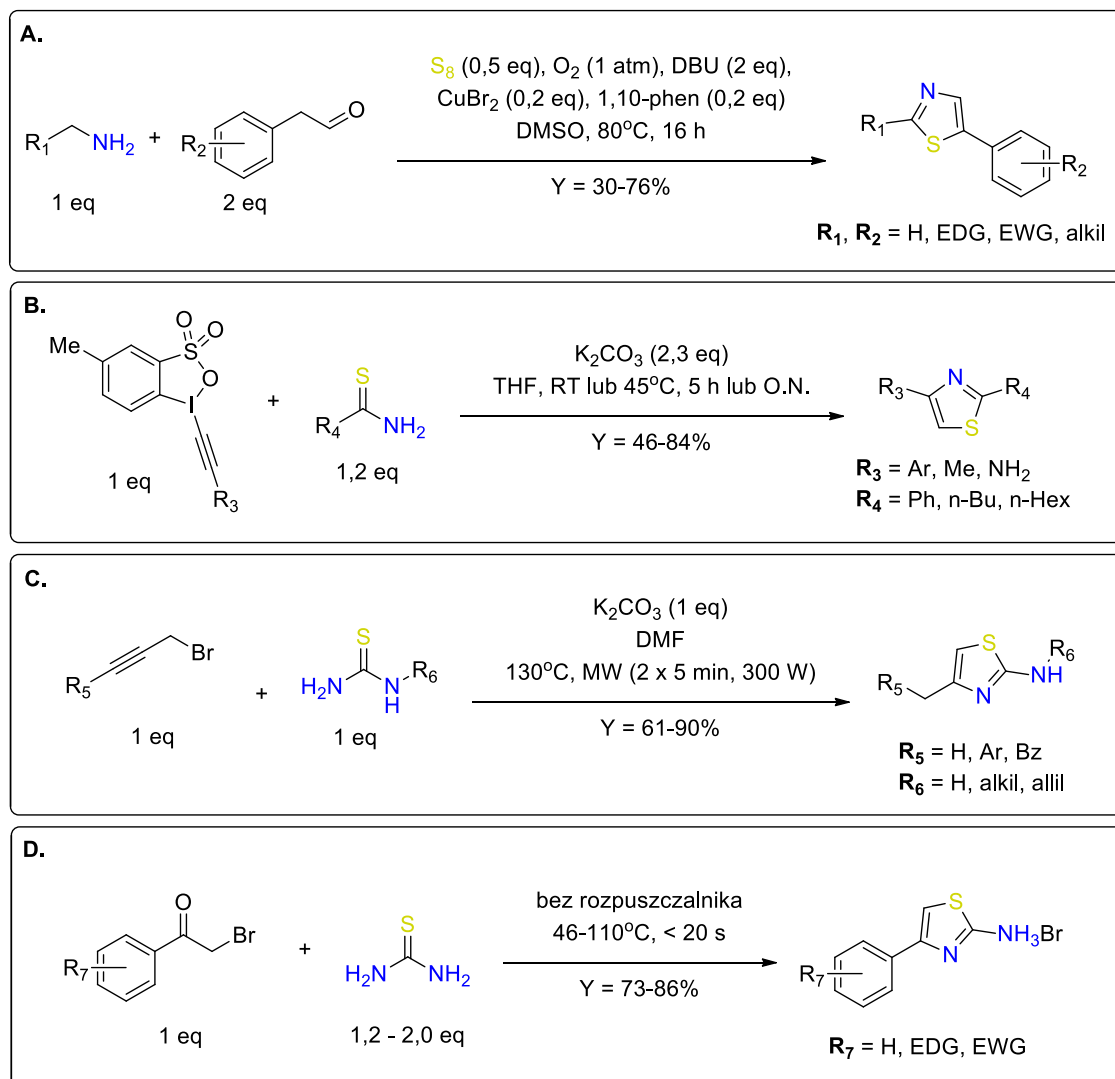
4.2. Metody syntezy i omówienie mechanizmów tworzenia

Opracowanie to składa się z szerszego omówienia metod syntezy prezentowanych układów heterocyklicznych, przedstawienia wybranych czterech metod otrzymywania ich, a także szczegółowego omówienia mechanizmu tworzenia wskazanych heterocykli, w warunkach zilustrowanych na schematach. Ten ostatni element jest szczególnie ważny z punktu widzenia chemii organicznej i chemii medycznej, gdyż przedstawia w bliższym ujęciu szerokie spektrum nowoczesnych metod syntezy, w tym reakcji fotoindukowanych, aktywności karbenów, reakcji kaskadowych, czy procesów redoks zachodzących z udziałem metali przejściowych, które usprawniają procesy otrzymywania leków małącząsteczkowych. Mechanizmy te przedstawione zostały w postaci schematów, w oparciu o sugestie autorów oraz dodatkowe rozważania teoretyczne.

4.2.1. Tiazole

Metodologia konstruowania szkieletu 1,3-tiazolowego zwykle wymaga zastosowania cząsteczek-rdzeni strukturalnych, w które wkomponowywany jest odpowiednio ekwiwalent azotowy oraz siarkowy. Zwykle są to związki karbonylowe, który posiadają w pozycji α wolne atomy wodoru, lub inne układy równoważne, np. związki β -dikarbonylowe, azydki winylowe,

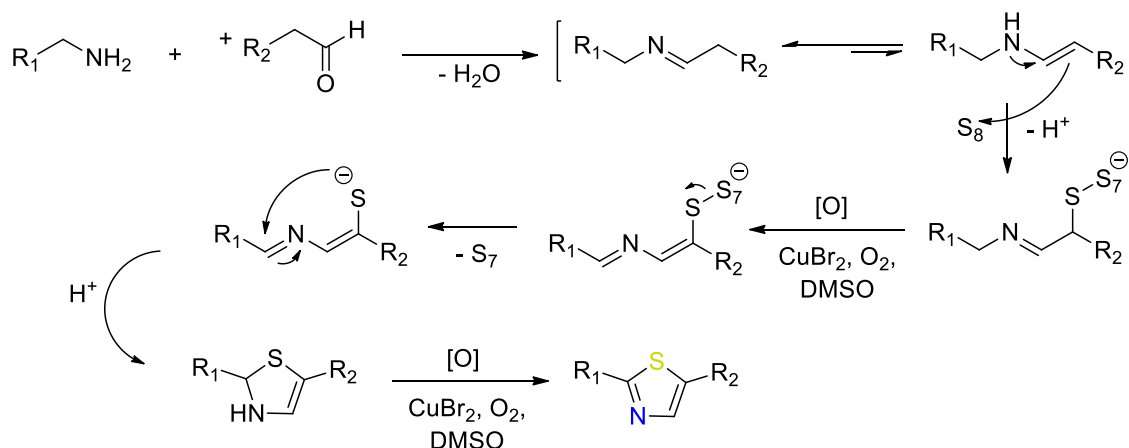
bromki propargylowe, które wnoszą podobną liczbę atomów węgla i pozwalają na prowadzenie reakcji z określoną chemoselektywnością. Ekwiwalent azotowy i siarkowy często wprowadzany jest przy pomocy tej samej cząsteczki, np. tiomocznika, rodanku potasu, lecz możliwe jest podejście rozłączne, to jest, gdy oba równoważniki pochodzą od innych cząsteczek, np. układ amina-aldehyd-siarka pierwiastkowa, czy też ditiokarboksylany-izonitryle benzylowe. Na szczególną uwagę zasługują metody wykorzystujące stosunkowo proste substraty, a także te, które oparte są o utleniającą cyklizację, czy reakcje inicjowane mikrofalami [110]. Wybrane przykłady przedstawiono poniżej (**Schemat 18**).



Schemat 18. Wybrane metody syntezy 1,3-tiazoli

W metodzie A układ heterocykliczny konstruowany jest z wykorzystaniem podstawionych metyloamin oraz sfunkcjonalizowanych w układzie aromatycznym aldehydów fenyllooctowych, które na drodze katalizowanej bromkiem miedzi(II) oksydatywnej insercji siarki pierwiastkowej, biegnącej w podwyższonej temperaturze i zgazowywaniu mieszaniny reakcyjnej tlenem cząsteczkowym w obecności zasady, pozwalają na uzyskanie pożądaných 1,3-tiazoli. W reakcji tej ekwiwalent azotowy wprowadzany jest wraz z aminą, siarkowy wraz z siarką elementarną, zaś

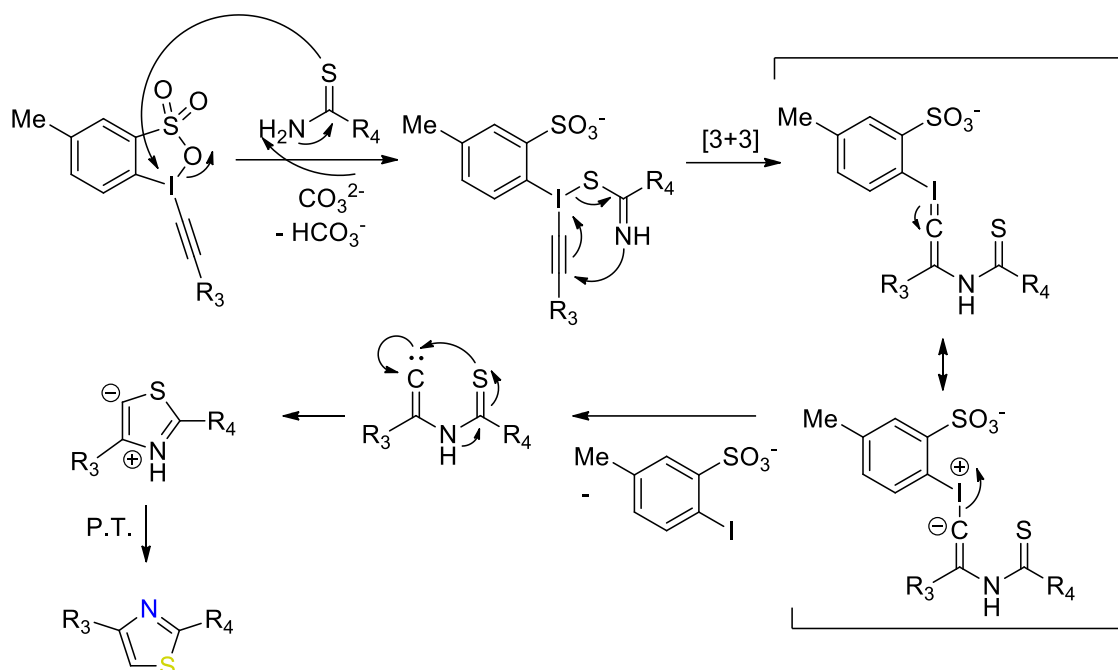
rdzeń cząsteczki budowany jest w oparciu o związki typu benzyłowego, które wnoszą atomy węgla do pierścienia heterocyklicznego.



Schemat 19. Mechanizm syntezy 2,5-dipodstawionego 1,3-tiazolu z aminy typu benzyłowego i aldehydu fenylooctowego, katalizowanej jonami miedzi(II) w warunkach aerobowych

Autorzy w oparciu o eksperymenty kontrolne zaproponowali zgrubny mechanizm otrzymywania tego układu heterocyklicznego (**Schemat 19**). W pierwszym etapie pomiędzy aminą oraz aldehydem zachodzi reakcja kondensacji, z wytworzeniem iminy. Ta ostatnia ulega częściowej konwersji w swój wariant enaminowy, którego układ alkenowy atakuje cząsteczkę siarki wieloatomowej, z odtworzeniem grupy iminowej. Następnie, w warunkach utleniających katalizatora miedziowego oraz tlenu, transformacji ulega fragment pochodzący od benzyloaminy z wytworzeniem układu iminowo-enaminowego. Eliminacja cyklo-heptasiarki, S_7 , odblokowuje wolny anion tiolanowy na przeprowadzenie nukleofilowego ataku na węgiel w grupie iminowej, co prowadzi do powstania dehydro-1,3-tiazolu, który w warunkach utleniających przeprowadzany jest w produkt końcowy [111]. Mechanizm ten jest niedoskonały, gdyż w niejasny sposób wykorzystuje równowagę imina-enamina, a także nie definiuje sekwencji utleniania fragmentu pochodzącego od benzyloaminy w odpowiednią iminę, choć operowanie w warunkach utleniających w pozycji benzyłowej daje ku temu powody. Nie uwzględniono także roli 1,10-fenantroliny w tej reakcji, choć zapewne jest ligandem dla katalizatora metalicznego, bądź środkiem chelatującym produkty uboczne. Autorzy nie zaproponowali również pośrednich związków miedzi, które tworzą się w czasie tej przemiany.

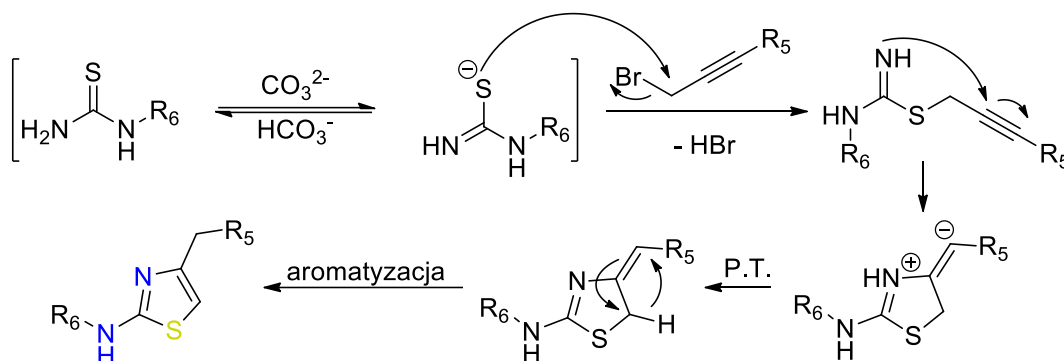
W metodzie B układ 1,3-tiazolowy pozyskiwany jest na drodze przegrupowania sigmatropowego zachodzącego pomiędzy alkinyłowanym związkiem jodu hiperwalencyjnego, a odpowiednim tionoamidem, w obecności węglanu potasu jako zasady, w tetrahydrofuranie. Ekwiwalent siarkowy oraz azotowy są wnoszone jednocześnie przy pomocy ugrupowania tionoamidowego, zaś szkielet heterocykla budowany jest przy pomocy fragmentu alkinu. Niewątpliwą zaletą niniejszej metody jest możliwość regeneracji związku jodu przy pomocy kwasu nadtlenooctowego, która została opisana w tej pracy.



Schemat 20. Mechanizm syntezy 2,4-dipodstawionego 1,3-tiazolu z tionoamidu i alkinylowego związku jodu hiperwalencyjnego w warunkach zasadowych

Mechanizm tej reakcji, przedstawiony na **Schemacie 20**, rozpoczyna się od katalizowanego zasadą ataku nukleofilowego atomu siarki z tionoamidu na atom jodu, w wyniku którego wewnątrzcząsteczkowej eliminacji ulega grupa sulfonowa. Powstały związek przejściowy ulega przegrupowaniu [3,3] sigmatropowemu, w wyniku którego odtwarzana jest grupa tionowa, grupa aminowa ulega addycji do ugrupowania alkinowego, zaś atom jodu tworzy układ pseudo-allenowy. Polaryzacja wiązania $-I=C=C$ do produktu $-I^+-C=C$ daje przyczynek α -eliminacji, której efektem jest powstanie karbenu winylowego i eliminacja odpowiedniego kwasu o-jodobenzosulfonowego. Autorzy następnie postulują atak nukleofilowego atomu siarki na układ karbenowy oraz przeniesienie wodoru (ang. *H-shift*) [112]. Pewnym jest, że produktem ubocznym tej reakcji jest odpowiedni kwas benzosulfonowy, stąd propozycja autorów co do polaryzacji wiązania pseudo-allenowego. Dzięki atakowi atomu siarki na węgiel karbenowy tworzy się karboanion, który następnie odszczepia proton spoczywający na atomie azotu. Nie jest zatem właściwie nazwanie tej reakcji poprzez *H-shift*, a jest to jedynie zwykły transfer protonu (ang. *proton transfer*). Ta pierwsza nazwa mogłaby sugerować przegrupowanie, które jednak tutaj nie zachodzi.

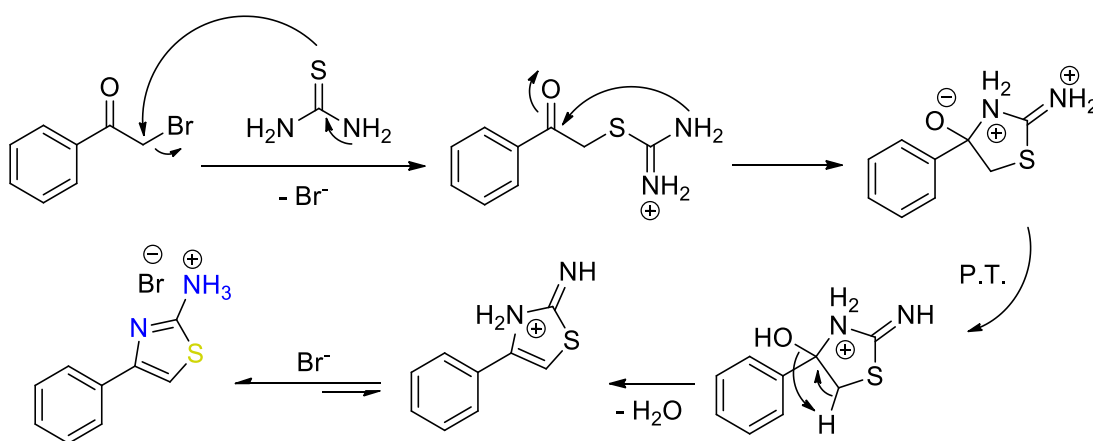
Metoda C opiera się na tworzeniu *N*-podstawionych 2-amino-1,3-tiazoli wykorzystując odpowiednie bromki propargilowe oraz *N*-podstawione tiomoczniki. Reakcja ta jest prowadzona w obecności węglanu potasu jako zasadzie i w *N,N*-dimetyloformamidzie jako rozpuszczalniku. Transformacja ta inicjowana jest mikrofalami o mocy 300 W, które to podgrzewają układ do temperatury 130°C. Ekwiwalent siarkowy oraz azotowy wprowadzany jest do układu przy pomocy pochodnej tiomocznika. Układ propargilowy w czasie reakcji przechodzi w podstawnik typu benzyłowego w produkcie końcowym. Wydajności reakcji są od umiarkowanie dobrych do bardzo dobrych.



Schemat 21. Mechanizm syntezy $N^2,4$ -dipodstawionego 2-amino-1,3-tiazolu z N -podstawionego tiomocznika i bromku propargilu, w warunkach zasadowych

Autorzy sugerują, że w pierwszym etapie mechanizmu (**Schemat 21**) tiomocznik ulega S -alkilowaniu w obecności zasady. Następnie, układ alkinylowy, bądź równoważny do niego — allenowy, ulegają addycji nukleofilowej grupy iminowej tiomocznika. Powstały w trakcie reakcji z formą alkinylową benzylidenowany (lub ogólnie — alkilidenowany) produkt pośredni ulega aromatyzacji na drodze przeniesienia protonów, izomeryzacji. Forma allenylowa generuje po reakcji ten sam produkt pośredni zdolny do transformacji do pożądanej cząsteczki [113].

Dzięki metodzie D, możliwe jest otrzymanie bromowodorków podstawionych w układzie homoaromatycznym 2-amino-4-fenilo-1,3-tiazoli z wykorzystaniem odpowiednich bromków fenacylu oraz tiomocznika, w warunkach bezrozpuszczalnikowych, w temperaturze topnienia substratów. Reakcje bieżą w mniej niż 20 sekund, zaś produkt końcowy wymaga jedynie odmycia wodą. Niewątpliwą zaletą tej metody jest jej prostota, bardzo dobre wydajności oraz możliwość zastosowania do syntezy odpowiednich 1,3-selenazoli.



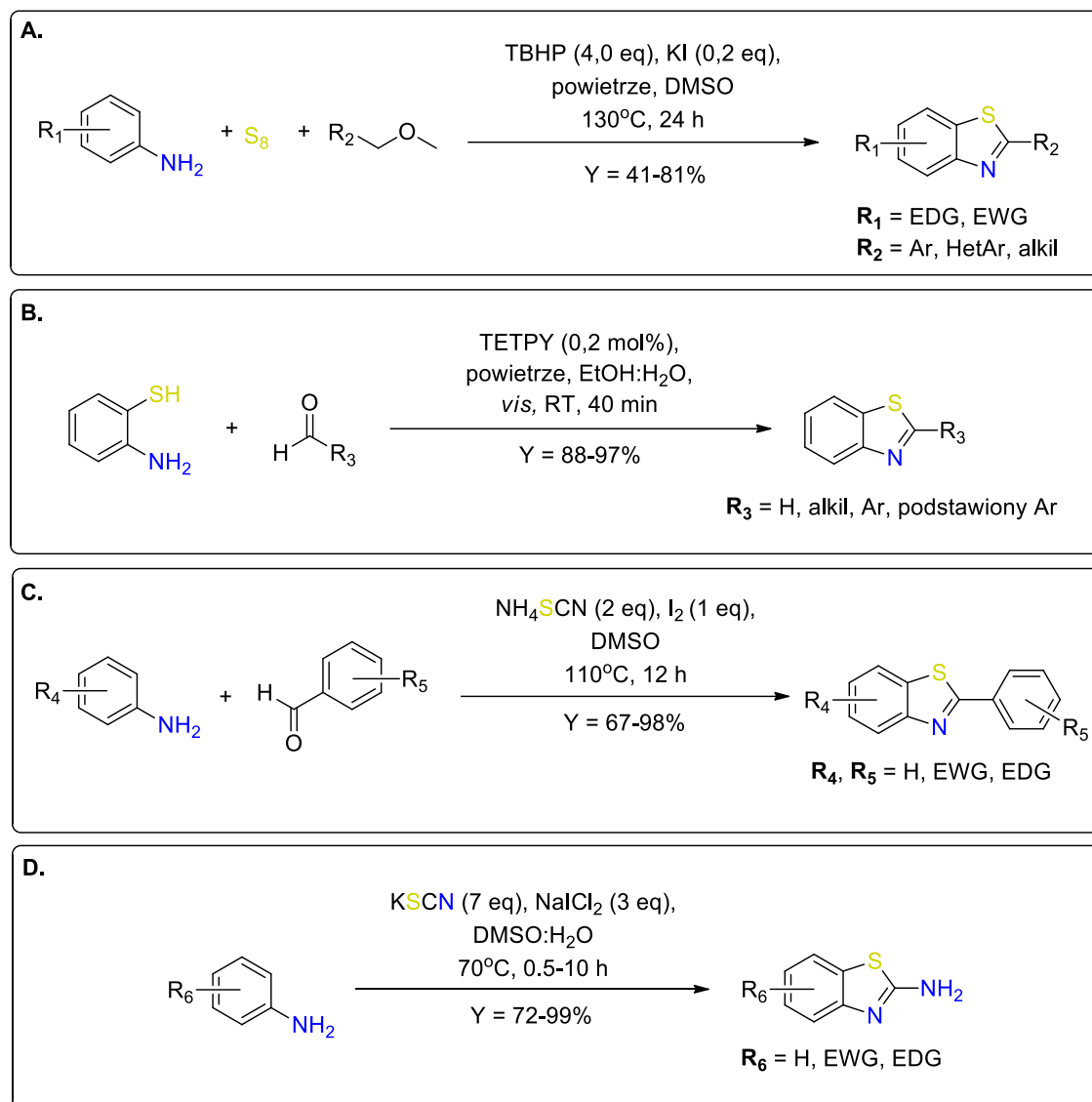
Schemat 22. Mechanizm syntezy bromowodorku 2-amino-4-fenilo-1,3-tiazolu z bromku fenacylu i tiomocznika, w warunkach bezrozpuszczalnikowych

Choć autorzy [114] nie podali mechanizmu tej reakcji, jest on dobrze opisany w literaturze i składa się z: S -alkilowania tiomocznika, wewnątrzcząsteczkowej addycji nukleofilowej do układu karbonylowego, odwodnienia produktu przejściowego i tautomeryzacji iminowo-aminowej (**Schemat 22**).



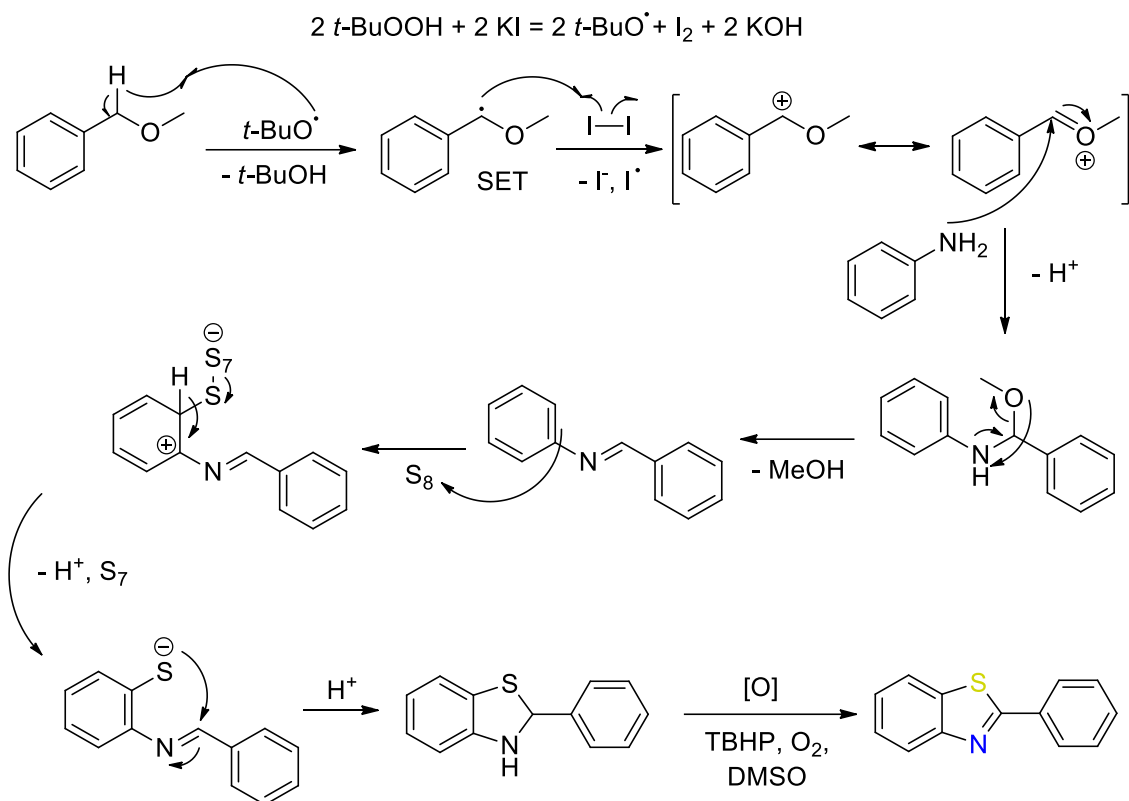
4.2.2. Benzotiazole

Synteza układu benzo[d]tiazolowego możliwa jest na drodze utleniającej, bądź odwadniającej cyklizacji komponentu anilinowego w obecności ekwiwalentu siarkowego wbudowanego w substrat, bądź dodawanego w postaci osobnej substancji (np. siarka elementarna, dimetylosulfotlenek, czy też tiocyjaniany potasu lub amonu). Otrzymywanie tego motywu strukturalnego nie stanowi większego wyzwania dla nowoczesnej chemii organicznej, stąd obserwowana mnogość metod opartych na fotochemii, czy reakcjach inicjowanych mikrofalamami. W literaturze spotyka się także podejście bezrozpuszczalnikowe oraz takie, które wykorzystuje proste, nietoksyczne substraty, co dobrze wpisuje się w obecne trendy odchodzenia od nieneutralnych dla środowiska metod syntezy, na rzecz zrównoważonych, zielonych technik. Warunki prowadzenia procesów utleniającej cyklizacji zasługują na szczególną uwagę, gdyż często wykorzystują katalizatory metaliczne oraz tlen z powietrza lub/i światło o określonej charakterystyce, prezentując w ten sposób zmyślność i osiągnięcia techniki w ostatnich latach [115]. Wybrane przykłady otrzymywania niniejszego układu zostały przedstawione na poniższym schemacie (**Schemat 23**).



Schemat 23. Wybrane metody syntezy benzo[d]tiazoli

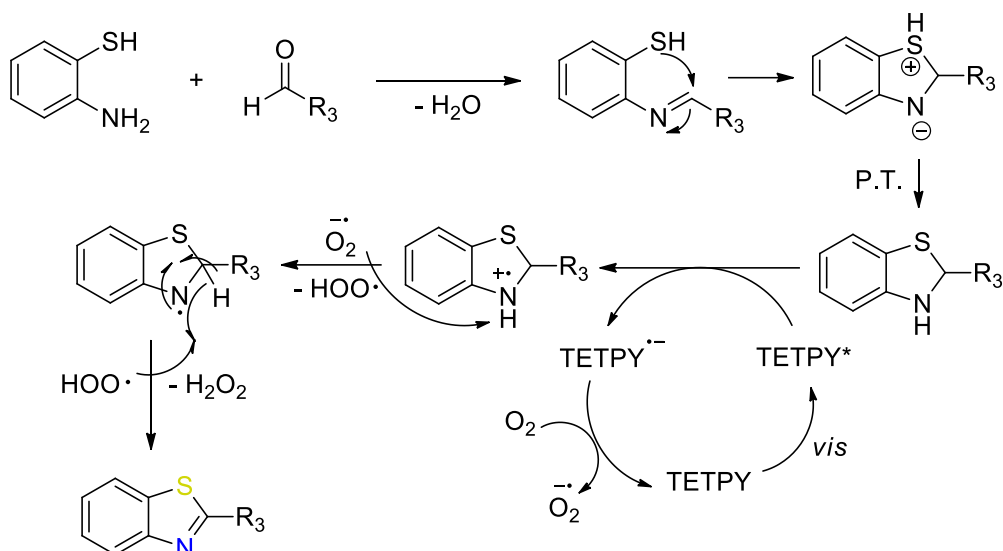
Metoda A. pozwala na uzyskanie benzo[d]tiazoli jednocześnie podstawionych grupami donorowymi (EDG) lub akceptorowymi (EWG) w części homoaromatycznej oraz podstawnikiem arylowym, heteroarylowym, bądź alkilowym w pozycji drugiej części heteroaromatycznej, z umiarkowanie słabymi do dobrymi wydajnościami. Jest to przykład wykorzystujący utleniającą cyklizację, w której rolę utleniacza pełni tlen z powietrza, zaś układ wodoronadtlenek *t*-butylojodek potasu (TBHP-KI) są inicjatorami reakcji rodnikowej, lecz także pełni rolę utleniacza. Ekwiwalent siarkowy wprowadzany jest do układu przy wykorzystaniu siarki pierwiastkowej, a dobudowanie podstawnika w pozycji drugiej możliwe jest dzięki obecności hemiacetalu (eteru). Warto dodać, iż nie tylko eter benzyloowo-metylowy pozwolił na otrzymanie pożądaných produktów, lecz także etery cykliczne (np. oksetan), czy też zupełnie proste etery liniowe, takie jak eter dietylowy.



Schemat 24. Mechanizm syntezy 2-fenylobenzotiazolu z eteru fenylo-metylowego i aniliny, w obecności wodoronadtlenku *t*-butylu i jodu cząsteczkowego, w warunkach aerobowych

Proponowany przez autorów mechanizm (**Schemat 24**) zakłada tworzenie rodnika *t*-butyloksylogowego ($t\text{-BuO}^\bullet$) w pierwszym etapie, który odszczepiając rodnik wodnorodny z hemiacetalu generuje rodnikowy produkt przejściowy, który po dalszym utlenieniu (jodem cząsteczkowym) daje karbokation skłonny do reakcji z aniliną. Wtórnie, powstająca imina reaguje z wieloatomową cząsteczką siarki, S_8 , na drodze substytucji elektrofilowej w aktywowanym układzie aromatycznym. W reakcji tej, odszczepienie cząsteczki S_7 odtwarza układ aromatyczny, a w miejscu podstawienia pozostaje atom siarki w postaci podstawionego anionu siarczkowego. Ten ostatni skłonny jest do wejścia w reakcję wewnątrzcząsteczkowej addycji nukleofilowej do atomu węgla iminowego. Powstały po uprzednim zakwaszeniu benzo[d]dehydrotiazol ulega procesowi aromatyzacji do produktu końcowego pod tlen z powietrza [116].

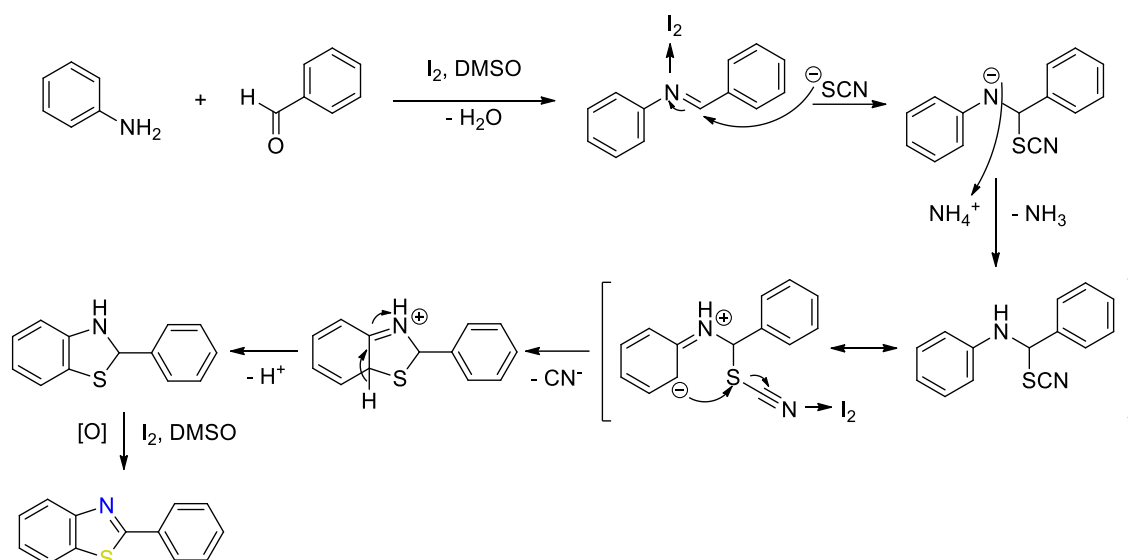
Metoda B. umożliwia otrzymywanie 2-podstawionych benzo[d]tiazoli z bardzo dobrymi wydajnościami, wychodząc z 2-aminotiofenolu oraz komponentu aldehydowego, którym może być formaldehyd, aldehydy alifatyczne, bądź też podstawione benzaldehydy. Powstały na drodze międzycząsteczkowej cyklizacji intermediat utleniany jest następnie pod wpływem układu tlen-słoń światło białe-fotokatalizator pirazynowy do produktu końcowego. Ekwiwalent azotowy oraz siarkowy wprowadzane są do cząsteczki wraz z jednym z substratów, zaś insercja mostka węglowego przebiega z wykorzystaniem komponentu aldehydowego.



Schemat 25. Mechanizm syntezy 2-podstawionego benzotiazolu z *o*-aminofenolu i aldehydu, fotokatalizowanej TETPY w świetle widzialnym, w warunkach aerobowych

Najistotniejszym elementem mechanizmu (**Schemat 25**) omawianej cyklizacji jest fotoindukowane utlenianie intermediatu powstałego na drodze międzycząsteczkowej kondensacji. Naświetlenie fotokatalizatora pirazynowego światłem białym powoduje jego przejście do stanu wzbudzonego. W tym stanie jest on zdolny do inicjowania reakcji redoks. W reakcji z cyklicznym intermediatem tworzy on kationorodnik aminylowy, samemu utleniając się do formy anionorodnikowej. Ta ostatnia zaś zdolna jest do reagowania z cząsteczką tlenu z powietrza z wytworzeniem anionu nadtlenkowego, zdolnego do przeprowadzenia dalszego utleniania układu cyklicznego, skutkując jego aromatyzacją, czyli uzyskaniem 2-podstawionego benzotiazolu. Na tym etapie odtwarzany jest fotokatalizator w swej formie natywnej [117].

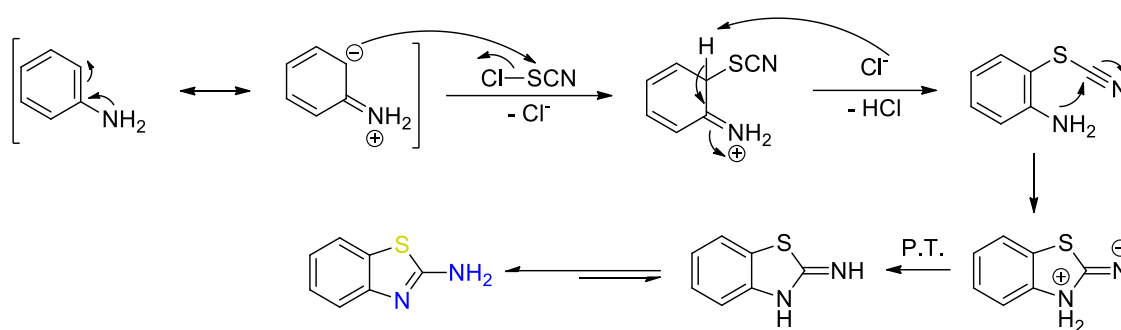
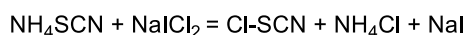
Metoda C. pozwala na otrzymanie 2-podstawionych benzo[d]tiazoli korzystając z protokołu utleniającej cyklizacji. W podejściu tym, wykorzystuje się podstawione aniliny (równoważnik azotowy) oraz podstawione benzaldehydy, jako elementy budulcowe syntezowanego układu, poddawane działaniu rodanku amonu (równoważnik siarkowy) w obecności jodu cząsteczkowego, w dimetylosulfotlenku, w podwyższonej temperaturze, które w wyniku transformacji dają produkty z dobrymi i bardzo dobrymi wydajnościami. Cząsteczka jodu pełni w tej przemianie rolę aktywatora intermediatu iminowego oraz utleniacza pozwalającego na aromatyzację produktu przejściowego do pożądanego 2-podstawionego benzo[d]tiazolu.



Schemat 26. Mechanizm syntezy 2-fenylobenzotiazolu z aniliny, benzalehydu i rodanku amonu, w obecności jodu cząsteczkowego i dimetylosulfotlenku

Autorzy na podstawie eksperymentów kontrolnych potwierdzili mechanizm (**Schemat 26**) tej reakcji, który przedstawia się następująco: (1) kondensacja aldehydu z aniliną skutkuje powstaniem iminy, (2) anion tiocyjanianowy (rodankowy) bierze udział w katalizowanej jodem cząsteczkowym reakcji addycji nukleofilowej do grupy iminowej, (3) zachodzi wewnątrzcząsteczkowa substytucja elektrofilowa w aktywowanym układzie aromatycznym, gdzie rolę elektrofila pełni atom siarki w grupie tiocyjanianowej (eliminacji ulega grupa cyjankowa), (4) produkt końcowy powstaje dzięki utleniającej aromatyzacji nasyconego związku przejściowego [118].

W metodzie D. zademonstrowano przykład reakcji otrzymywania podstawionych 2-aminobenzo[d]tiazoli z anilin (ekwiwalent azotowy), gdzie reagentem zdolnym do dobudowania pozostałej części heterocyklu jest układ rodanek potasu-dichlorojodan(I) sodu, w mieszanym, polarnym rozpuszczalniku i podwyższonej temperaturze. Anion rodankowy ponownie pełni rolę ekwiwalentu siarkowego, zaś ten drugi komponent służy za utleniacz (środek chlorujący). Zastosowanie znacznego nadmiaru rodanku potasu i dichlorojodanu(I) sodu pozwoliło na otrzymanie pożądaných produktów z dobrymi i bardzo dobrymi wydajnościami [119].

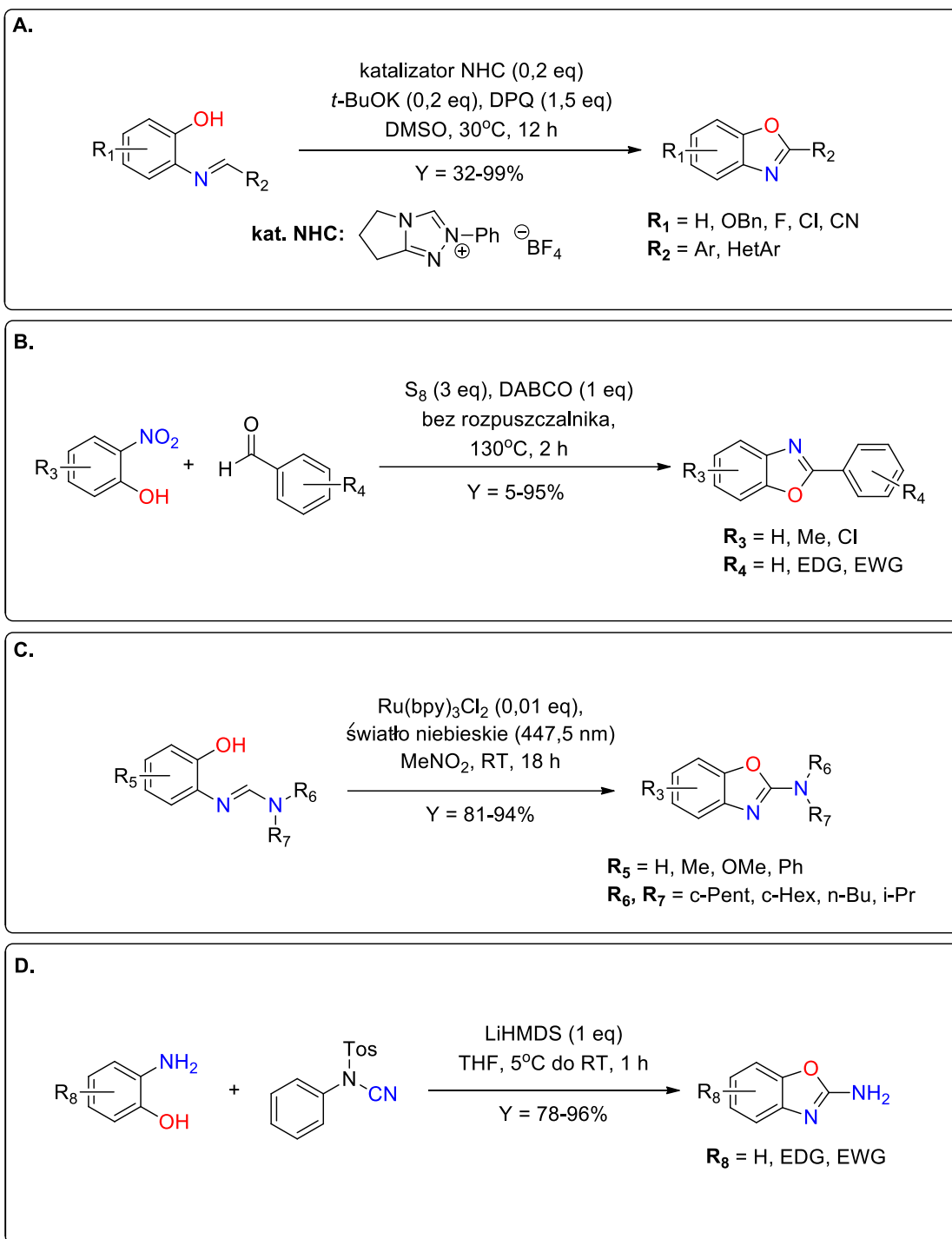


Schemat 27. Mechanizm syntezy 2-aminobenzotiazolu z aniliny i rodanku amonu w obecności dichlorojodanu(I) sodu

Choć autorzy opracowania [119] nie zasugerowali mechanizmu reakcji, może on zostać zaproponowany z wykorzystaniem przesłanek teoretycznych (**Schemat 27**). Rodanek potasu reagując z dichlorojodanem(I) sodu generuje chlorek kwasu tiocyjanowego (Cl-SCN), który w swej reaktywności może przypominać chlorki sulfenylowe z ich elektrofilowymi atomami siarki. Taki czynnik elektrofilowy ulega następnie substytucji elektrofilowej w aktywowanym układzie aromatycznym, domyślnie w pozycji drugiej w stosunku do podstawnika aminowego w anilinie, dając tiocyjanian organiczny (R-SCN). Ten ostatni ulega wewnątrzcząsteczkowej addycji nukleofilowej, w której grupa aminowa podłącza się do fragmentu cyjankowego, z wytworzeniem produktu końcowego jako tautomeru iminowego (-NH-C=NH), po przeniesieniu protonu. Równowaga tautomerów heteroaromatycznych jest silnie przesunięta w stronę wariantu aminowego (-N=C-NH₂), gdyż napędzana jest procesem aromatyzacji.

4.2.3. Benzoksazole

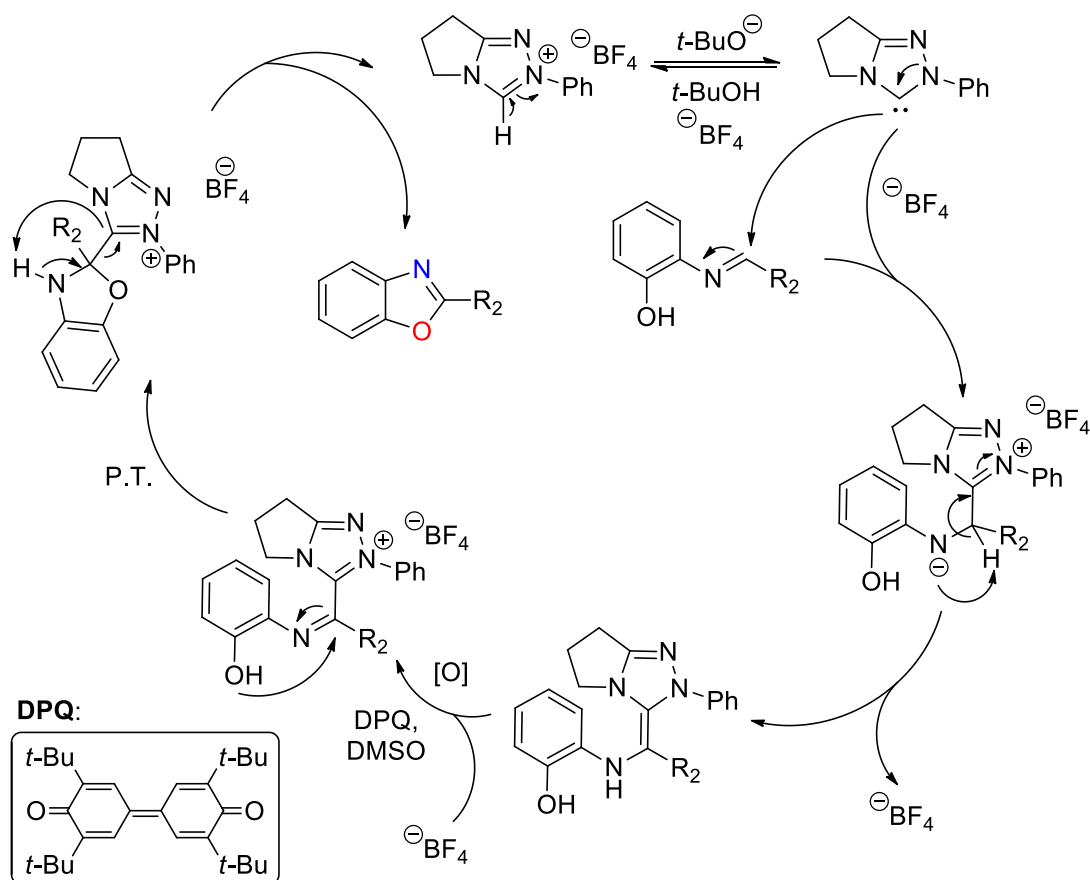
Synteza układu benzo[d]oksazolowego opiera się zwykle na próbie insercji atomu węgla pomiędzy grupę aminową oraz hydroksylową w pochodnej *o*-aminofenolu. Można to osiągnąć dzięki zastosowaniu związku karbonylowego, np. aldehydu, oraz odpowiedniej katalizy kwasowej, wykorzystaniu równoważników grupy karbonylowej, np. ortoestrów, czy nawet kwasów karboksylowych w metodach odwadniających. Podejście wykorzystujące reakcje redoks również jest opisywane w literaturze, zwykle bazuje na redukcji grupy nitrowej w nitrofenolach, lecz także na utleniającej cyklizacji związków typu iminowego, czy oksymowego, będących pochodnymi odpowiednich fenoli. Na szczególną uwagę zasługują metody fotochemiczne, elektrochemiczne oraz takie, u których podstawy leżą łatwo dostępne substraty, np. siarka elementarna [120]. Poniżej zestawiono wybrane metody syntezy niniejszego układu heterocyklicznego (**Schemat 28**).



Schemat 28. Wybrane metody syntezy benzo[d]oksazoli

W metodzie A wykorzystano intensywnie rozwijane w ostatnich latach katalizatory karbenowe oparte na strukturach *N*-heterocyklicznych (ang. *N-heterocyclic carbenes*, NHC), które znane są z udziału w reakcji Stettera, czy kondensacji benzoinowej (np. aktywność witaminy B₁). W prezentowanych, utleniających warunkach reakcji, gdzie rolę utleniacza pełni układ bichinoidowy w DPQ, możliwe jest zajście dogodnej cyklizacji wewnątrzcząsteczkowej. Ekwiwalent tlenowy i azotowy dostarczany jest przy pomocy tej samej cząsteczki, tu: *N*-benzylidenowanego *o*-aminofenolu. Silna zasada w postaci *t*-butanolanu potasu ma za zadanie

zaktywować katalizator NHC, a także zwiększyć aktywność nukleofilową grupy fenolowej. Wydajności reakcji są na ogół dobre i bardzo dobre, z wyraźnie wyższymi wynikami dla R₂ z podstawnikami elektronoakceptorowymi.

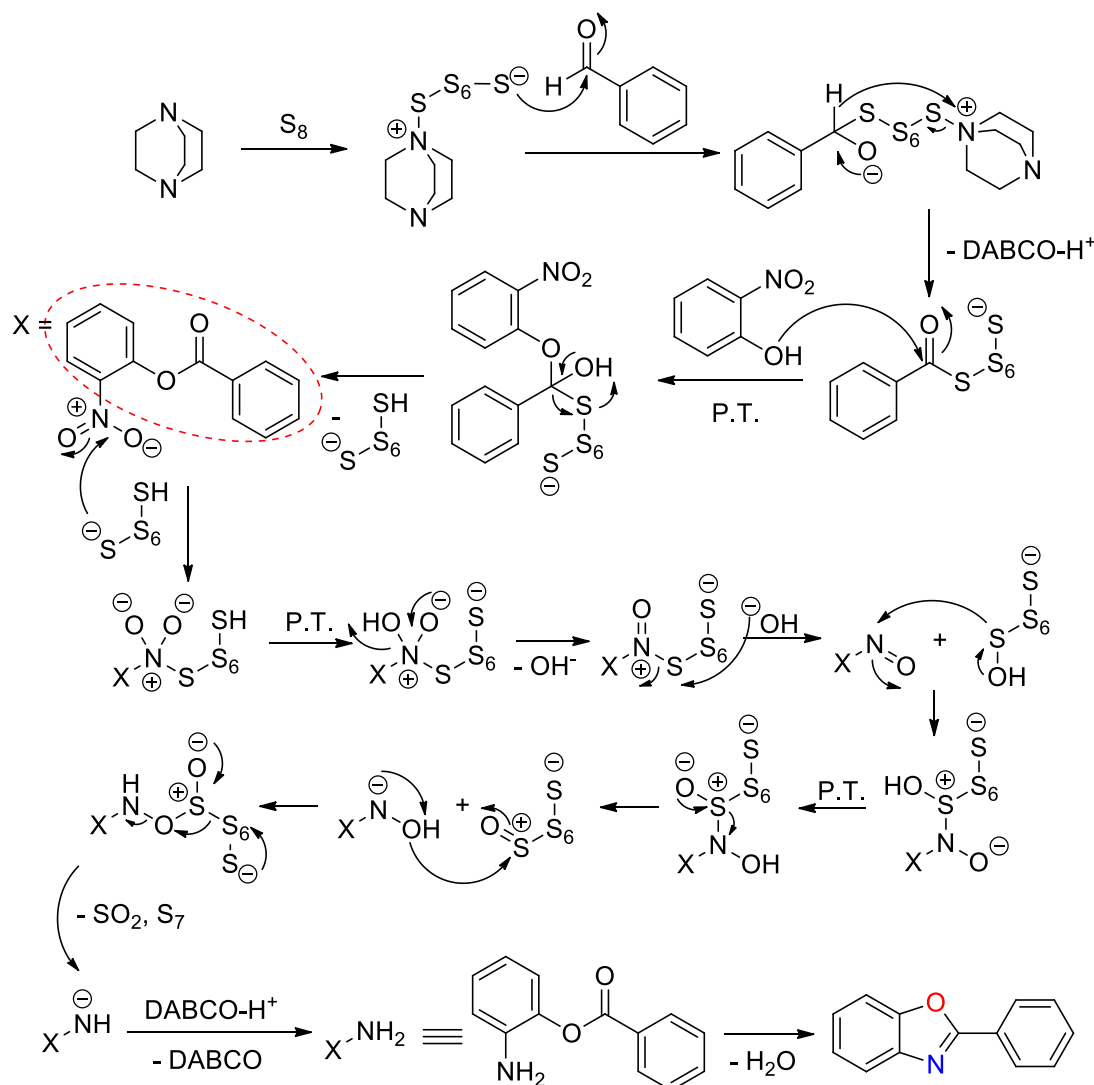


Schemat 29. Cykliczny mechanizm syntezy 2-podstawionego benzoksazolu z *N*-benzylidenowanym *o*-aminofenolem, katalizowanej NHC, w warunkach utleniających

Autorzy dosyć dokładnie określili mechanizm reakcji (**Schemat 29**), wskazując na jego cykliczny charakter, przypominający typowe reakcje katalizowane metalami przejściowymi (np. reakcja Suzuki, Hecka). W pierwszym etapie dochodzi do odszczepienia ruchliwego protonu w pozycji drugiej katalizatora 1,2,4-triazolowego, z wygenerowaniem karbenu. Następnie, ten ostatni ulega addycji nukleofilowej do grupy iminowej substratu, gdzie po transferze protonu powstaje intermediat aza-Breslowa, w którym pozycja karbenowa wiąże się z węglem iminowym przy pomocy wiązania podwójnego, a na atomie azotu spoczywa atom wodoru. W wyniku działania utleniacza, powstaje przejściowy 2-iminoilowany kation azoliowy, czyli wiązanie podwójne uległo przemieszczeniu. W takich warunkach, układ iminowy jest aktywowany na substytucję nukleofilową ze względu na obecność dobrej grupy opuszczającej (katalizatora NHC). Po wewnątrzcząsteczkowym ataku anionu fenolanowego na węgiel iminowy oraz późniejszy rozpad intermediatu tetraedrycznego, powstaje pożądaný produkt, zaś katalizator NHC odtwarza się [121]. Autorzy publikacji nie zaproponowali jedynie wskazanego wcześniej mechanizmu utleniania, jednak nie zawsze naturę tego procesu da się opisać przy pomocy jednej reakcji.



Metoda B przynależy do klasy transformacji opartych na reakcjach redoks. Układ siarka elementarna-DABCO pełni rolę czynnika sprzęgającego/cyklizującego, a także reduktora grupy nitrowej. W reakcji tej wykorzystuje się szereg funkcjonalizowanych *o*-nitrofenoli (ekwiwalent azotowy i siarkowy) oraz benzaldehydów (rdzeń cząsteczki), które dają pożądane produkty reakcji ze zróżnicowanymi wydajnościami, zależnymi od charakteru elektronowego podstawników oraz ich położenia. Najgorsze rezultaty osiąga się przy wykorzystaniu 2-halogenowanych benzaldehydów, które szczególnie chętnie tworzą 1,2-ditiolano-3-tionowy produkt uboczny. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, iż przemiana ta biegnie z wykorzystaniem relatywnie prostych i dostępnych substratów, takich jak siarka, czy też wspomniana już wcześniej bicykliczna zasada, DABCO, a także w warunkach bezropuszczalnikowych.



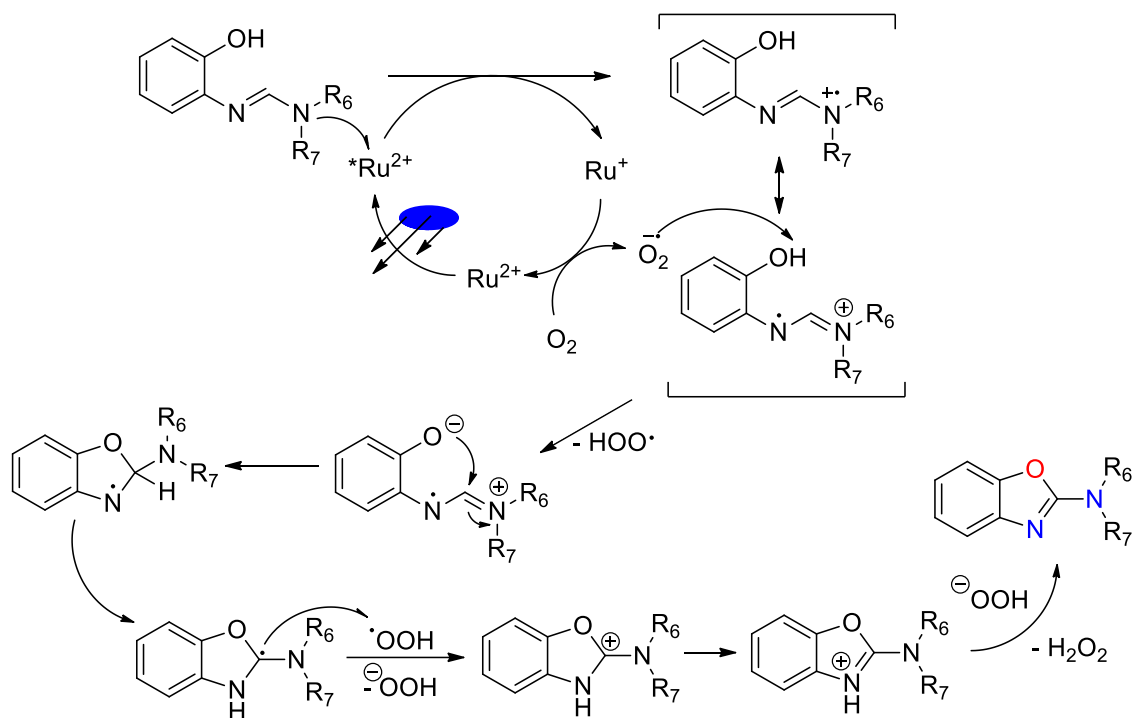
Schemat 30. Mechanizm syntezy 2-fenylbenzoksazolu z benzaldehydu i *o*-nitrofenolu w obecności siarki elementarnej i DABCO

Autorzy publikacji, na podstawie szeregu eksperymentów kontrolnych, zaproponowali mechanizm reakcji, który opiera się w głównej mierze na właściwościach chemicznych tworzących się przejściowo związków siarki (**Schemat 30**). W pierwszym etapie jeden z atomów

azotu DABCO atakuje cyklo-oktasiarkę, S_8 , w wyniku którego to otwarciu ulega pierścień poliatomowy. Powstały, ujemnie naładowany, terminalny atom siarki atakuje następnie na drodze addycji nukleofilowej grupę aldehydową podstawionego benzaldehydu. W powstałym intermedii tetraedrycznym dochodzi następnie do odtworzenia ugrupowania karbonylowego z migracją anionu wodorkowego w kierunku dodatnio naładowanego atomu azotu. Sekwencja ta przypomina reakcję Cannizarro. Przyłączenie anionu wodorkowego oraz rozpad wiązania N-S zachodzą równocześnie. W etapie tym tworzy się monoprotonowany DABCO oraz cząsteczka tioestru (a dokładniej — acylowanej oktasiarki z terminalną grupą tiolanową), która jest aktywną formą kwasu karboksylowego, podatną na atak nukleofila. W kolejnym etapie dochodzi do substytucji nukleofilowej w układzie acylowym, w wyniku której powstaje *O*-benzoilowany *o*-nitrofenol, zaś produktem ubocznym jest jednoujemnie naładowana oktasiarka. W kolejnym etapie autorzy, choć bardzo nieprecyzyjnie, przedstawili redukcję grupy nitrowej do nitrozowej z wykorzystaniem poliatomowego związku siarki. Produktem ubocznym tej reakcji jest pochodna kwasu sulfenowego. Sugeruje się następnie wykorzystanie tej pochodnej siarkowej do dalszej redukcji, tym razem już pochodnej nitrozowej (do pochodnej hydroksyloaminy), z jednoczesnym zamknięciem pierścienia benzoksazolowego (dzięki atakowi grupy aminowej w hydroksyloaminie na węgiel karbonylowy *O*-benzoilowanego fenolu) oraz podłączeniem oksooktrasiarki do atomu tlenu hydroksyloaminy. Występujący w stanie tetraedrycznym anion alkoholany jest zdolny do ataku na terminalny atom siarki, który związany jest z wcześniej wspomnianymi atomami tlenu. Powstały układ bicykliczny zdolny jest do wydzielania tlenku siarki(VI), dzięki któremu tworzy się produkt końcowy, a produktem ubocznym jest anion heptasiarki [122].

Mechanizm redukcji grupy nitrowej z wykorzystaniem kwasów sulfenowych ($R-S-OH$), czy kwasu sulfoksyłowego ($HO-S-OH$), jest prawdopodobny, jednak tworzenie tlenku siarki(VI) jest niemal niemożliwe i nie uszłoby uwadze chemika syntetyka, w niesterylnych warunkach. Grupa nitrowa posiada pewien potencjał utleniający, jednak wytworzenie tak silnie reaktywnego związku, trudnego do otrzymania w warunkach klasycznych, jest mało prawdopodobne. Najpewniej, należałoby się w mechanizmie dopatrywać kompletnej redukcji grupy nitrowej (wzorując się na aktywności dwutlenku tiomocznika) do ugrupowania aminowego i klasycznej cyklizacji bazującej na *o*-aminofenolu. Zbadanie stopnia utlenienia oraz struktury krystalicznej ubocznego związku siarki dostarczyłoby wielu dowodów eksperymentalnych co do przebiegu mechanizmu tej redukcji.

Synteza *N,N*-dialkilowanych 2-aminobenzo[d]oksazoli została przedstawiona w metodzie C. Substratami w tej reakcji są podstawione amidyny fenolowe, czyli związki powstałe w wyniku kondensacji podstawionego *o*-aminofenolu z *N*-formylowaną aminą drugorzędową. Jest to przykład cyklizacji wewnątrzcząsteczkowej fotoindukowanej katalizatorem opartym na jonie rutenu(II), biegnącej w nitrometanie jako rozpuszczalniku i w temperaturze pokojowej, możliwej dzięki naświetlaniu światłem o długości fali 447,5 nm. Jest to przykład wysokowydajnej transformacji o znacznej ekonomii atomowej, korzystającej ze zjawiska fotokatalizy.

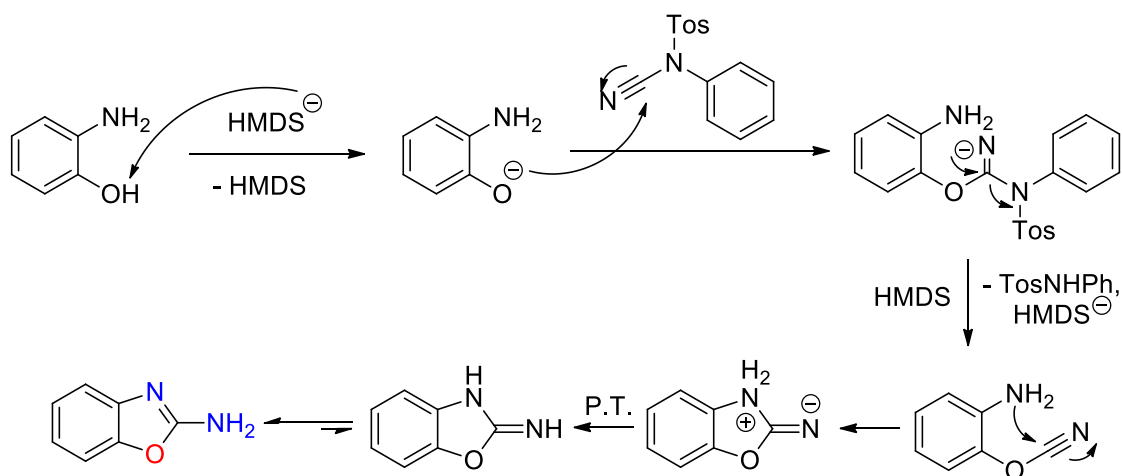


Schemat 31. Mechanizm syntezy *N,N*-dipodstawionego 2-aminobenzoksazolu z amidyny fenolowej, fotokatalizowanej związkami rutenu(II) w świetle niebieskim, w warunkach aerobowych

Mechanizm tej reakcji (**Schemat 31**) rozpoczyna się od przeprowadzenia fotokatalizatora opartego na jonie rutenu(II) do jego stanu wzbudzonego poprzez naświetlanie światłem niebieskim. Wygaszenie aktywowanego katalizatora wiąże się z redukcją metalu do jonu rutenu(I) i jednoczesnym utlenieniem zewnętrznego atomu azotu do formy kationorodnika, na drodze przeniesienia jednego elektronu (ang. *single electron transfer*, SET). Ten ostatni, dzięki bliskiemu sąsiedztwu wiązania nienasyconego, zdolny jest do wytworzenia struktury rezonansowej z rozseparowanym ładunkiem dodatnim (atom azotu) oraz rodnikiem (benzylowy atom węgla). Cząsteczki tlenu obecne w mieszaninie reakcyjnej utleniają następnie jon rutenu(I) do jego natywnej formy, przywracając katalizatorowi jego aktywność, samemu redukując się do anionu nadtlenkowego. Ten, odszczepia następnie kwaśny proton fenolowy przechodząc w rodnik wodoronadtlenkowy, generując anion fenolanowy, który dokonuje ataku nukleofilowego na węgiel w grupie amidynowej. Powstały, cykliczny produkt przynależy do klasy rodników aminylowych, które zdolne są do przegrupowania na drodze przesunięcia-1,2, co skutkuje powstaniem karborodnika. Rodnik ten ulega utlenieniu do karbokationu i następnie do pożądanego produktu końcowego z wykorzystaniem układu wodoronadtlenkowego, wspomnianego wcześniej, lub cząsteczki tlenu [123].

Opisany w metodzie D przykład stanowi jedną z prostszych transformacji pozwalających na otrzymanie 2-aminobenzo[d]oksazoli. Oparta jest na właściwościach cyjanujących popularnego w syntezie organicznej odczynnika — *N*-cyjano-*N*-fenylo-*p*-toluenosulfonamidu (NCTS). Komponent azotowy i siarkowy dostarczane są przy użyciu podstawionych *o*-aminofenoli, zaś ekwiwalent węglowy oraz zewnętrzny równoważnik azotowy przy pomocy wymienionego wcześniej odczynnika. Ta na ogół wysokowydajna reakcja biegnie

w tetrahydrofuranie, od 5°C przy dodawaniu odczynników, do temperatury pokojowej, w obecności silnej, nienukleofilowej zasady, LiHMDS (bis(trimetylosililo)amidek litu). Możliwa jest również synteza 2-aminobenz[d]-1*H*-imidazoli, która opiera się o przytoczoną tutaj metodologię.



Schemat 32. Mechanizm syntezy 2-aminobenzoksazolu z *o*-aminofenolu pod wpływem NCTS i LiHMDS

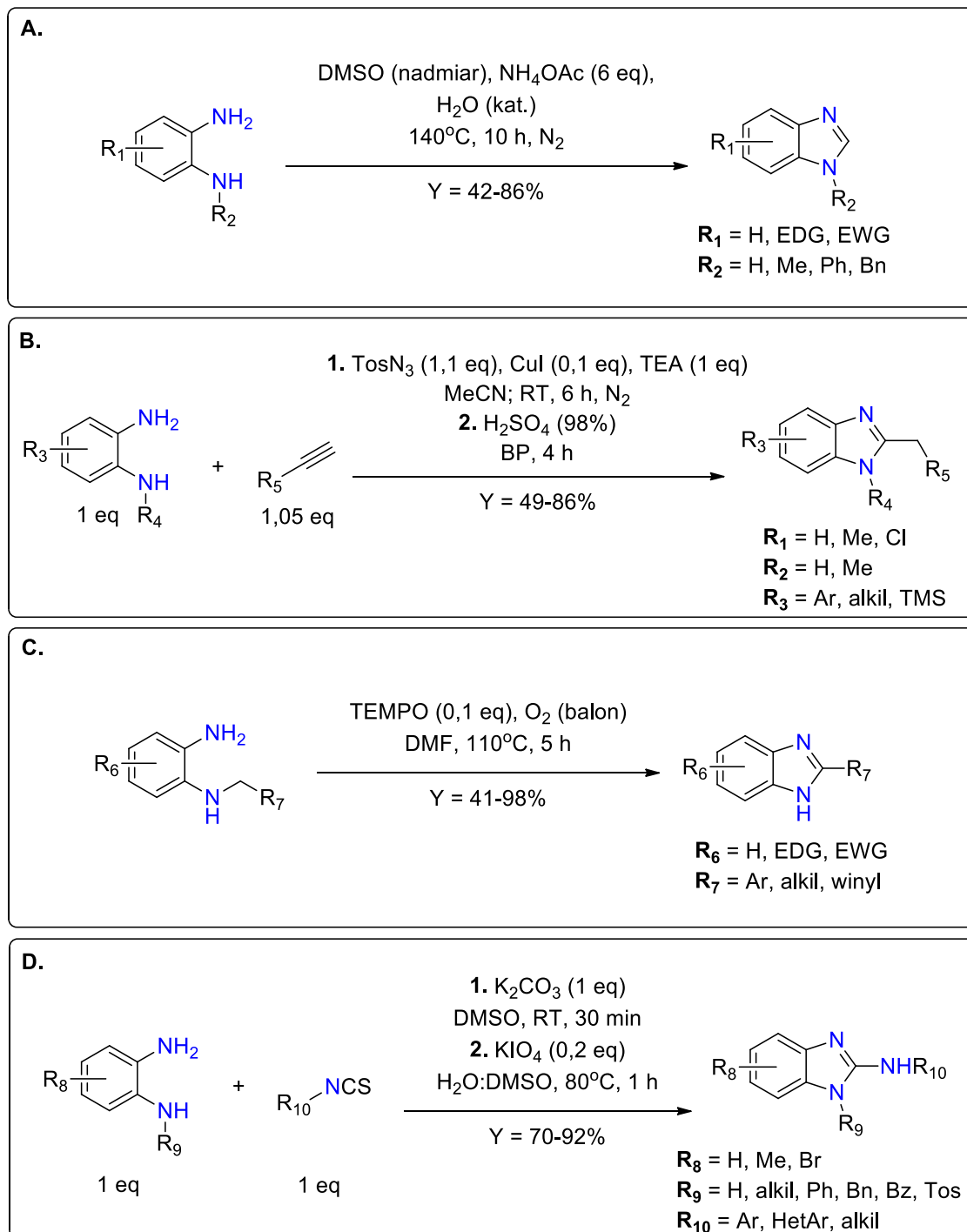
Autorzy postulują (**Schemat 32**), iż w pierwszym etapie dochodzi do odszczepienia kwaśnego protonu fenolowego i następuje atak anionu fenolanowego na grupę cyjankową w NCTS. Powstały na drodze addycji nukleofilowej intermediet (typu iminowego), zdolny jest do odtworzenia grupy cyjankowej wraz z eliminacją świetnej grupy opuszczającej opartej na podstawionym *p*-toluenosulfonamidzie. Wewnętrzzcząsteczkowa addycja nukleofilowa grupy aminowej do grupy cyjankowej i późniejsza tautomeryzacja skutkująca aromatyzacją pierścienia heterocyklicznego, skutkuje powstaniem pożądanego produktu końcowego [124].

4.2.4. Benzimidzole

Otrzymywanie benzo[d]imidazoli opiera się na wkomponowaniu ekwiwalentu węglowego pomiędzy dwa atomy azotu w *o*-fenylenodiaminach, bądź ich prekursorach (np. *o*-nitroaniliny). W literaturze można spotkać również inne warianty, w których drugi równoważnik azotowy wprowadzany jest w aniliny wraz z innym substratem (np. benzyloaminy) lub układem reakcyjnym (np. azydek trimetylosililowy w obecności utleniacza). Mostkujący atom węgla wprowadzony jest przy pomocy związków, które stanowią pośredni, bądź bezpośredni ekwiwalent grupy aldehydowej, np. kwas mrówkowy, D-glukoza, *N,N*-dimetyloformamid, aldehydy aromatyczne. Znane są również utleniające metody cyklizacji, w których substratami są amidyny, które w zależności od modelu mogą być zcyklizowane przy użyciu katalizatorów opartych na metalach przejściowych lub w silnie utleniającym środowisku. Na szczególną uwagę zasługują również przemiany katalizowane nanocząstkami metali i ich tlenków, prowadzone z użyciem zielonych reagentów, np. L-prolina, nadtlenomonosiarczan potasu (Oxone®, KHSO₅), a także korzystające z efektywnych utleniaczy (np. TEMPO, czyli rodnik 2,2,6,6-tetrametylopiperydyn-*N*-oksydowy) [125].



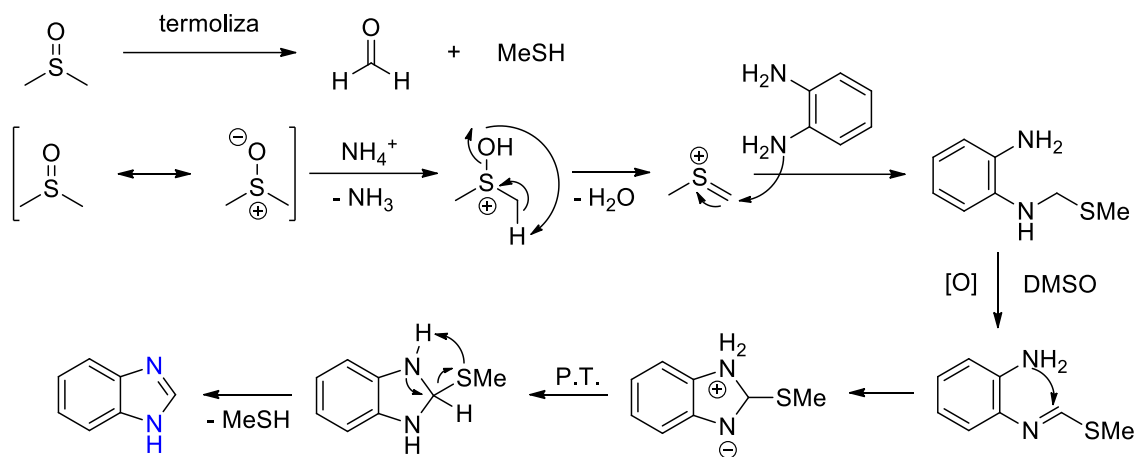
Wybrane metody syntezy układu benzo[d]imidazolowego zostały podsumowane na Schemacie 33.



Schemat 33. Wybrane metody syntezy benzo[d]imidazoli

W metodzie A układ benzo[d]imidazolowy otrzymuje się z podstawionej *o*-fenylenodiaminy, pomiędzy której dwie grupy aminowe wkomponowuje się mostkujący atom węgla. Ekwiwalent węglowy wprowadzany jest z wykorzystaniem dimetylosulfotlenku, który pod wpływem octanu amonu ulega reakcji Pummerera, tworząc metylenujący jon sulfoniowy, podobny aktywnością chemiczną do odczynników Mannicha. W reakcji tej DMSO pełni rolę substratu,

rozpuszczalnika, jak i utleniacza, zaś octan amonu — czynnika odtlenowującego dimetylosulfotlenek. Zastosowanie tej metodologii umożliwia otrzymanie szeregu podstawionych w części homoaromatycznej lub/i heteroaromatycznej benzo[d]imidazoli z dobrymi i bardzo dobrymi wydajnościami.

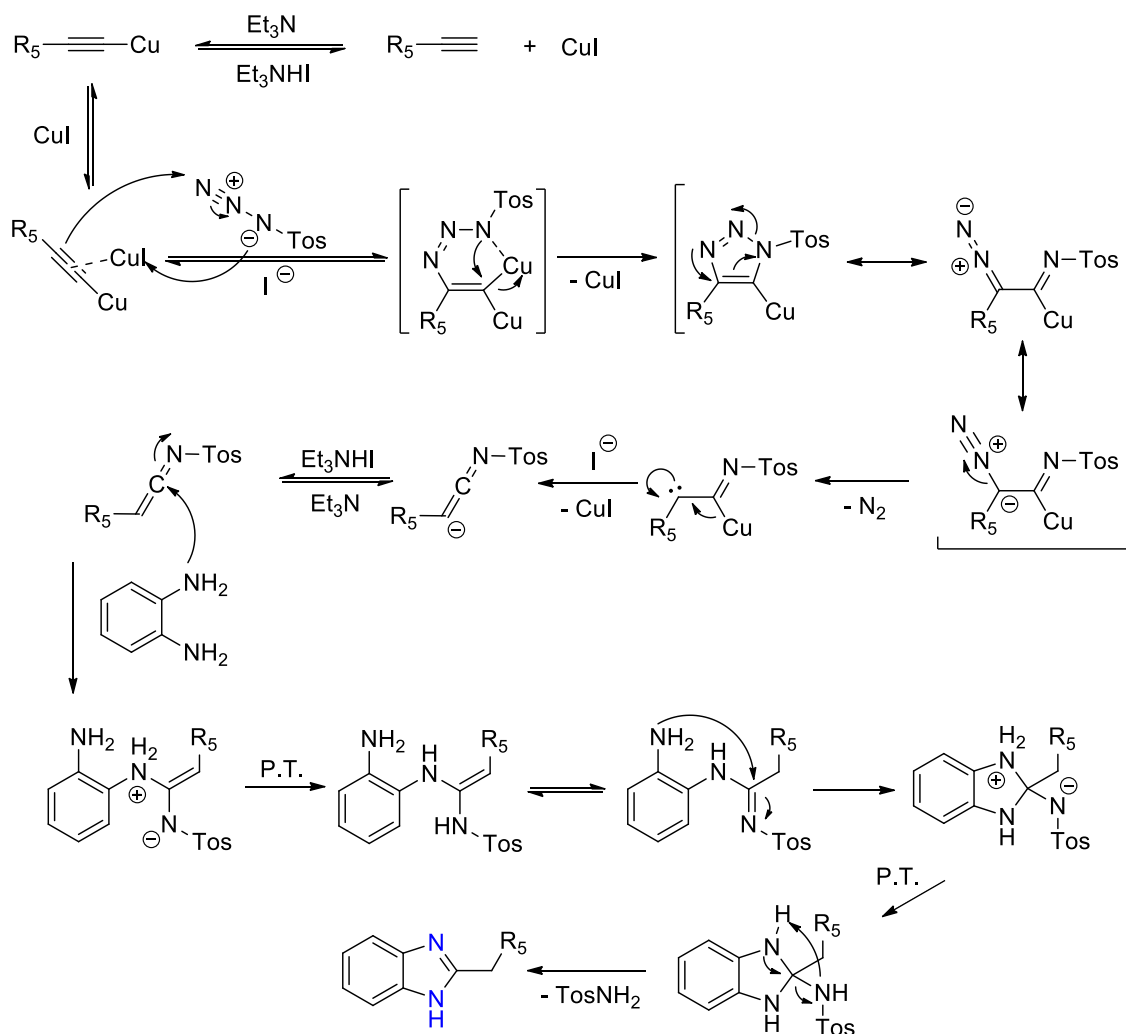


Schemat 34. Mechanizm syntezy benz-1H-imidazolu z o-fenilenodiaminy w obecności dimetylosulfotlenku i octanu amonu

Autorzy na podstawie doniesień literaturowych oraz własnych eksperymentów kontrolnych sugerują (**Schemat 34**), iż w pierwszym etapie mechanizmu, octan amonu przeprowadza DMSO w jon metylo(metylideno)sulfoniowy ($\text{H}_3\text{C-S}^+=\text{CH}_2$) na drodze reakcji Pummerera. Możliwy jest również termiczny rozpad DMSO odpowiednio do formaldehydu i metanotiolu, gdzie ten pierwszy produkt zdolny jest do mostkowania na drodze odwadniającej cyklizacji. o-Fenilenodiamina w reakcji z wygenerowanym jonom sulfoniowym daje produkt alkilowania, w którym w pozycji terminalnej znajduje się grupa metyloliowa ($-\text{SMe}$). Następnie, intermediat ten może ulec rozpadowi z wydzieleniem metanotiolu oraz metylenowanej o-fenilenodiaminy. Ten ostatni zdolny jest do wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji i następnie do utleniającej aromatyzacji dając pożądany produkt. Możliwa jest również inna ścieżka, w której produkt alkilowania ulega utlenieniu do iminy, która to następnie ulega atakowi nukleofilowemu przez sąsiadującą, wolną grupę aminową. Rozpad powstałego intermediatu, napędzany aromatyzacją, daje produkt końcowy. Choć autorzy zaproponowali mechanizm tworzenia benzo[d]tiazoli, możliwe jest przełożenie go na powyższe warunki, gdyż punkt kulminacyjny obu mechanizmów związany jest z wygenerowaniem czynnika metylenującego [126].

Metoda B zakłada otrzymanie podstawionych: w części homoaromatycznej, na atomie azotu oraz mostkującym atomie węgla, benzo[d]imidazoli z wykorzystaniem podstawionych o-fenilenodiamin i alkinów terminalnych w środowisku tiosiowego i jodku miedzi(I), w obecności zasady. Konieczne jest późniejsze wygrzewanie powstałego produktu przejściowego ze stężonym kwasem siarkowym(VI). Wydajności tych reakcji są umiarkowanie dobre i bardzo dobre. W ramach tej przemiany obserwuje się katalizowaną miedzią cykloaddykcję azydek-alkin (ang. *copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition*, CuAAC).

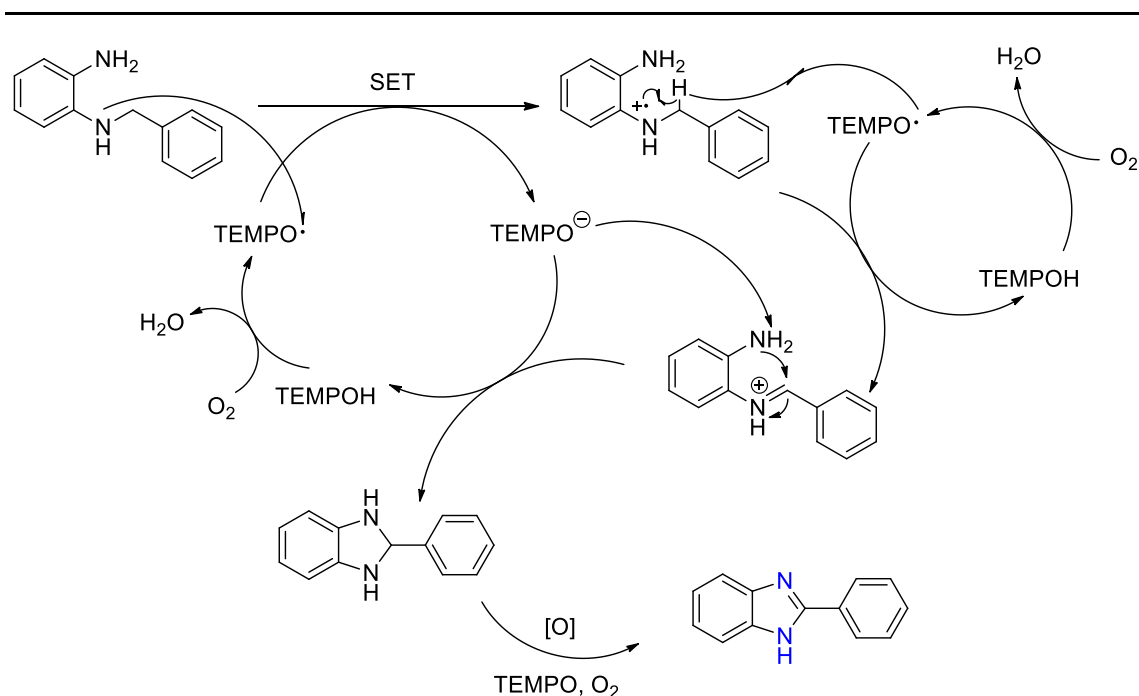




Schemat 35. Mechanizm syntezy 2-metylopodstawionego benz-1*H*-imidazolu z alkinu, azydku tosyłu i *o*-fenylenodiaminy, katalizowanej jodkiem miedzi(I) i trietyloaminą

Mechanizm tej reakcji (**Schemat 35**) zakłada tworzenie keteniminy z azydku tosyłowego oraz alkinu pod wpływem jonów miedzi(I). Autorzy nie zasygnalizowali jasno jaki jest mechanizm jej powstawania, jednak przebiega on najpewniej poprzez reakcję 1,3-dipolarną z wytworzeniem 1,2,3-triazolu, który pozostaje w pewnej równowadze z wariantem otwartołańcuchowym. Ten ostatni po eliminacji cząsteczki azotu tworzy właśnie keteniminę, która to reagując z grupą aminową *o*-fenylenodiaminy, generuje przejściową enaminę, izomeryzującą do *N*-tosylowanej iminy. Następnie, zachodzi cyklizacja z wydzieleniem tosylamidu na drodze katalizowanej kwasem substytucji nukleofilowej w układzie acylowym, w której rolę nukleofila pełni druga, wolna grupa aminowa, zaś elektrofilem jest ugrupowanie iminowe [127].

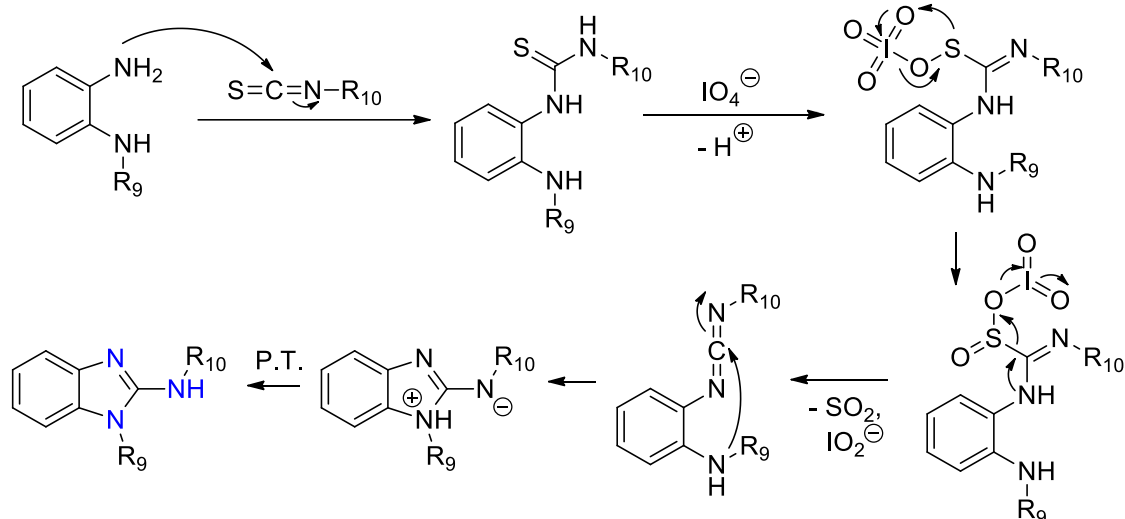
Opisany w metodzie C przykład bazuje na właściwościach utleniających układu TEMPO-O₂. Możliwa na tej drodze jest cyklizacja *N*¹-benzylo-*o*-fenylenodiamin do podstawionych, 2-arylowanych benzo[d]imidazoli. Zarówno ekwiwalenty azotowe, jak i mostkujący atom węgla, dostarczane są wraz z jednym substratem. Reakcja ta prowadzona jest w podwyższonej temperaturze, w *N,N*-dimetyloformamidzie jako rozpuszczalniku, i jej wydajności można opisać jako mieszczące się pomiędzy umiarkowanie dobrymi a bardzo dobrymi.



Schemat 36. Mechanizm syntezy 2-fenyl-benz-1H-imidazolu z *N*¹-benzyl-o-fenylendiaminy i TEMPO w warunkach aerobowych

Mechanizm reakcji (**Schemat 36**) rozpoczyna się w sposób następujący — rodnik TEMPO na drodze reakcji SET odbiera od podstawionego atomu azotu w substracie jeden elektron, przechodząc w anion TEMPO i generując kationorodnik aminylowy. Ten ostatni utleniany jest następnie do odpowiedniej *N*-podstawionej iminy poprzez odszczepienie rodnika wodorowego z pozycji benzyłowej przez inną cząsteczkę rodnika TEMPO. Powstały kation iminiowy jest atakowany przez wolną grupę aminową z wytworzeniem produktu cyklicznego. Sprotonowany atom azotu następnie jest neutralizowany dzięki anionowi TEMPO. Utlenianie cyklicznego produktu pośredniego prowadzi do powstania pożądanego produktu końcowego. Aktywność utleniająca TEMPO odtwarzana jest dzięki obecności drugiego utleniacza, cząsteczki tlenu, w mieszaninie reakcyjnej i zakłada odtworzenie rodnika TEMPO z odpowiedniej pochodnej *N*-hydroksylowanej, zużywając cząsteczkę tlenu z wydzieleniem cząsteczki wody [128].

W metodzie D przedstawiono syntezę podstawionych 2-aminobenzo[d]imidazoli na drodze dwuetapowej reakcji, w której odpowiednia o-fenylendiamina reaguje z izotiocyjanianem generując przejściową pochodną tiomocznikową, która ulega odsiarkowywaniu pod wpływem jodanu(VII) potasu w środowisku zasadowym i następnej cyklizacji. Jest to przykład utleniającej cyklizacji, która daje produkty z umiarkowanie dobrymi i bardzo dobrymi wydajnościami, korzystając z łatwo dostępnych substratów.



Schemat 37. Mechanizm syntezy 1,*N*²-dipodstawionego 2-aminobenzimidazolu z *N*¹-podstawionej o-fenylenodiaminy i izotiocyanianu w obecności anionu jodanowego(VII)

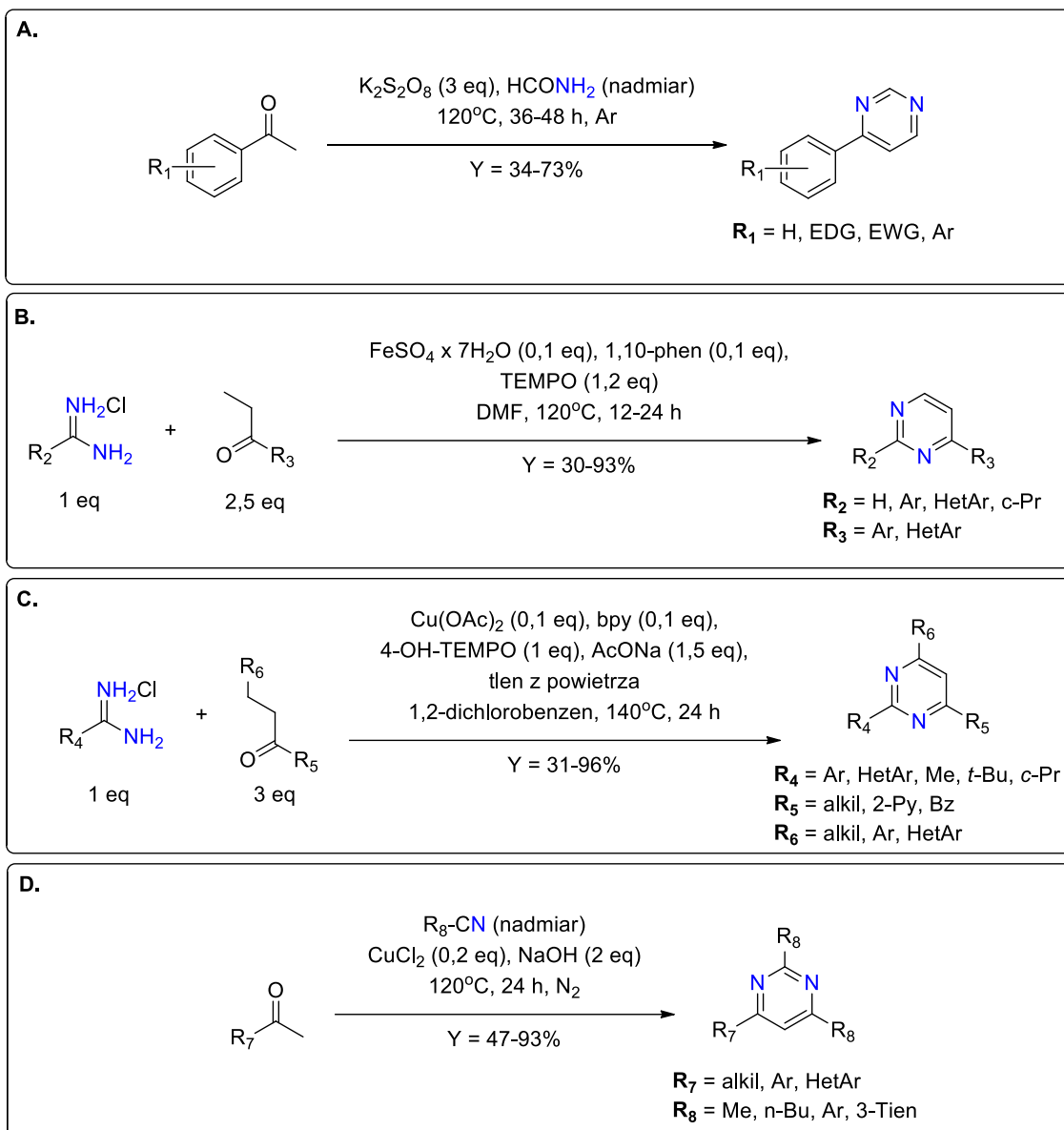
W zaproponowanym przez autorów mechanizmie reakcji (**Schemat 37**), w pierwszym jego etapie, dochodzi do addycji nukleofilowej wolnej grupy aminowej do układu izotiocyanianowego. Powstały produkt oparty o strukturę tiomocznika, ulega następnie cyklodesulfuryzacji przy pomocy jonów nadjodanowych poprzez odpowiednie pochodne kwasu sulfenowego lub sulfonianu, zdolne do wydzielenia siarki lub tlenku siarki(IV), generując odpowiedni karbodiimid. Ten ostatni zdolny jest do wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji przy udziale drugiej, wolnej grupy aminowej substratu. Możliwe jest również bezpośrednie przejście odsiarkowywanego intermediatu do produktu końcowego. Natura tego procesu nie jest do końca poznana [129].

4.2.5. Pirymidyny

Synteza 1,3-diazyn, inaczej pirymidyn, opiera się zwykle na reakcjach, w których do rdzenia węglowego, zazwyczaj zbudowanego z co najmniej 3 atomów węgla, posiadającego ugrupowanie karbonylowe lub jego ekwiwalent, dobudowywany jest równoważnik azotowy w postaci amidyny, guanidyny, nitylu lub amidu. Reakcje te często są katalizowane jonami metali przejściowych. Obserwuje się także więcej wieloskładnikowych metod otrzymywania tego układu 6-członowego w porównaniu z mniejszymi heterocyklami. Niektóre z tych wielokomponentowych przemian wykorzystują alkiiny, alkohole typu benzylowego oraz guanidynę. W literaturze można również natknąć się na transformację, w której rdzeń węglowy dostarczany jest wraz z izoksazolem, którego wiązanie N-O ulega rozszczepieniu pod wpływem katalizatora molibdenowego, a pozostały fragment 1,3-diazyny pochodzi od cząsteczki mocznika. Ta ostatnia metoda prezentuje bardzo innowacyjne podejście do budowania cząsteczek heterocyklicznych, wychodząc z łatwo dostępnych w handlu substratów [130].

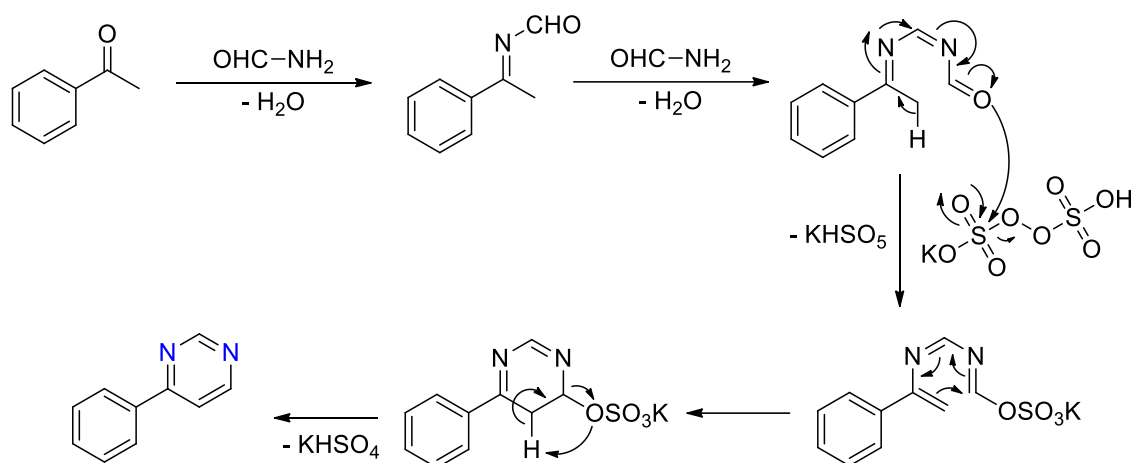
Wybrane przykłady metod syntezy układu 1,3-diazynowego zostały przedstawione na **Schemacie 38**.





Schemat 38. Wybrane metody syntezy 1,3-diazyn

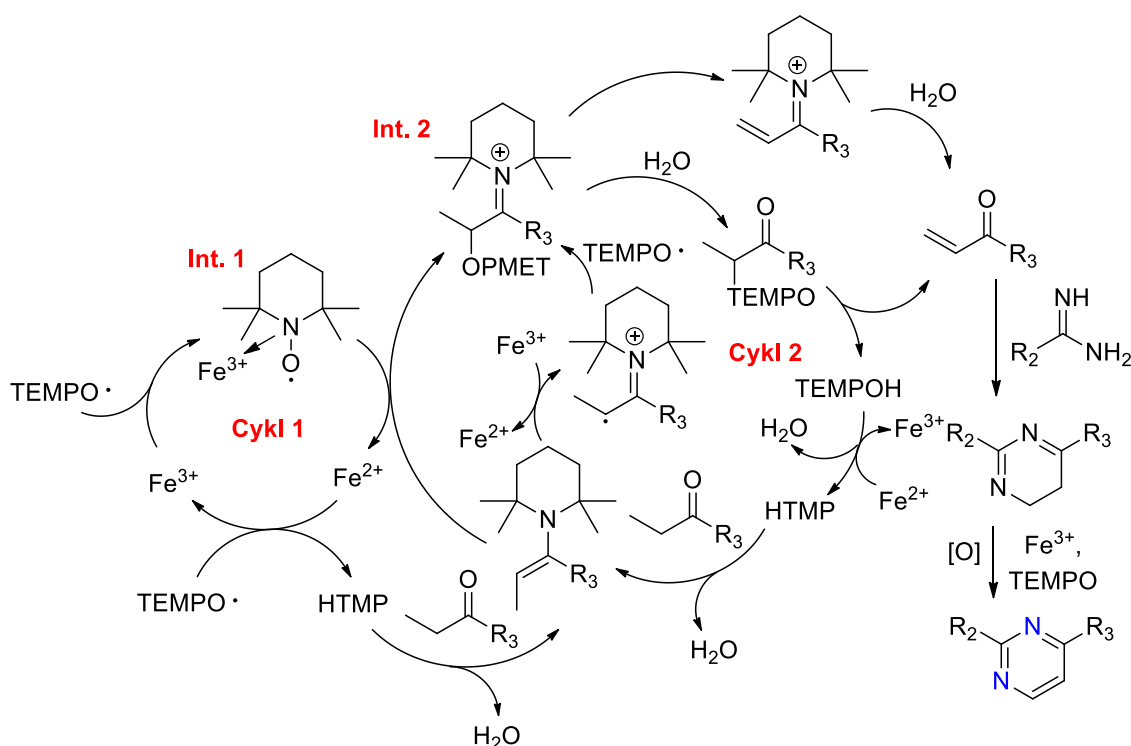
Dzięki metodologii przedstawionej w metodzie A, możliwe jest otrzymanie 4-arylowanej 1,3-diazyny na drodze utleniającej cyklizacji. Reakcja ta będzie w obecności nadsiarczanu potasu jako utleniacza oraz formamidu jako rozpuszczalnika i fragmentu budulcowego dostarczającego dwa ekwiwalenty azotowe. Proces ten prowadzi się w podwyższonej temperaturze w obecności gazu obojętnego, zaś produkty otrzymuje się w granicach umiarkowanie słabych i dobrych wydajności. Główną zaletą tej metody jest mała liczba reagentów oraz ich prostota. Podstawione acetofenony są łatwo dostępne w handlu, a ich ewentualna funkcjonalizacja jest nieskomplikowana.



Schemat 39. Mechanizm syntezy 4-fenyl-1,3-diazyny z acetofenonu i formamidu w obecności nadsiarczanu potasu

Autorzy zakładają (**Schemat 39**), iż w pierwszym etapie mechanizmu dochodzi do kondensacji podstawionego acetofenonu z formamidem z wytworzeniem odpowiedniej *N*-formylowanej iminy. Następnie, dochodzi do kolejnej kondensacji z tą samą cząsteczką z powstaniem prekursora układu 1,3-diazynowego. Sugeruje się, iż następuje nukleofilowy atak atomu tlenu karbonylowego na atom siarki w cząsteczce nadsiarczanu potasu zapoczątkowany przemianą przypominającą tautomerię keto-enolową, z tą różnicą, że jest ona tutaj rozprzestrzeniona na cały układ sprzężonych wiązań podwójnych, a proton w pozycji α w acetofenonie odszczepia się. Jako produkt uboczny wydziela się nadlitenomonosiarczan potasu (KHSO_5). Powstały intermediat ulega następnie reakcji elektrocyklicznej w obrębie 6 elektronów π , tworząc nieutlenioną formę 1,3-diazyny. Aromatyzacja stanowi siłę napędową reakcji eliminacji cząsteczki wodorosiarczanu(VI) potasu, a jej efektem jest powstanie pożądanego produktu [131].

Metoda B wykorzystuje szereg podstawionych chlorowodorków amidyn oraz propiofenonów (i ich heteroaromatycznych, propioilowanych odpowiedników), które ulegają oksydatywnej cyklizacji w układzie siarczan(VI) żelaza-TEMPO. Istota tej reakcji spoczywa na aktywność tej pary redoks. Reakcja ta prowadzona jest w podwyższonej temperaturze, zaś jej wydajności są silnie zależne od charakteru podstawników. Zdecydowanie niższe uzyskuje się dla amidyn heteroaromatycznych. W tej przemianie równoważniki azotowe dostarczane są wraz z jednym z substratów, zaś szkielet węglowy budowany jest przede wszystkim przez drugi substrat.



Schemat 40. Cykliczny mechanizm syntezy 2,4-dipodstawionej 1,3-diazyny z pochodnej propiofenonu i amidyny, katalizowanej jonami żelaza(III) i TEMPO

Autorzy zasugerowali złożony, dwucentrowy mechanizm tworzenia 1,3-diazyny, który w swej istocie skupia się na wytworzeniu związku α,β -nienasyconego z odpowiedniego propiofenonu i jego późniejszej reakcji z amidyną (**Schemat 40**).

W pierwszym cyklu reakcyjnym TEMPO dokonuje utlenienia jonu żelaza(II) do jonu żelaza(III), samemu przechodząc w formę pozbawioną grupy hydroksylowej (ta utlenia jon żelaza i dokoordynowuje do niego), to jest 2,2,6,6-tetrametylo-2,2,6,6-tetrametylo-1-piperidynę (ang. *hexamethylene-2,2,6,6-tetramethylpiperidine*, HTMP). Kolejna cząsteczka TEMPO zdolna jest do wytworzenia kompleksu z jonem żelaza(III) przy pomocy atomu azotu, tworząc Intermediat 1 (Int. 1). Po cyklu pierwszym mamy do dyspozycji cząsteczkę HTMP oraz Int. 1.

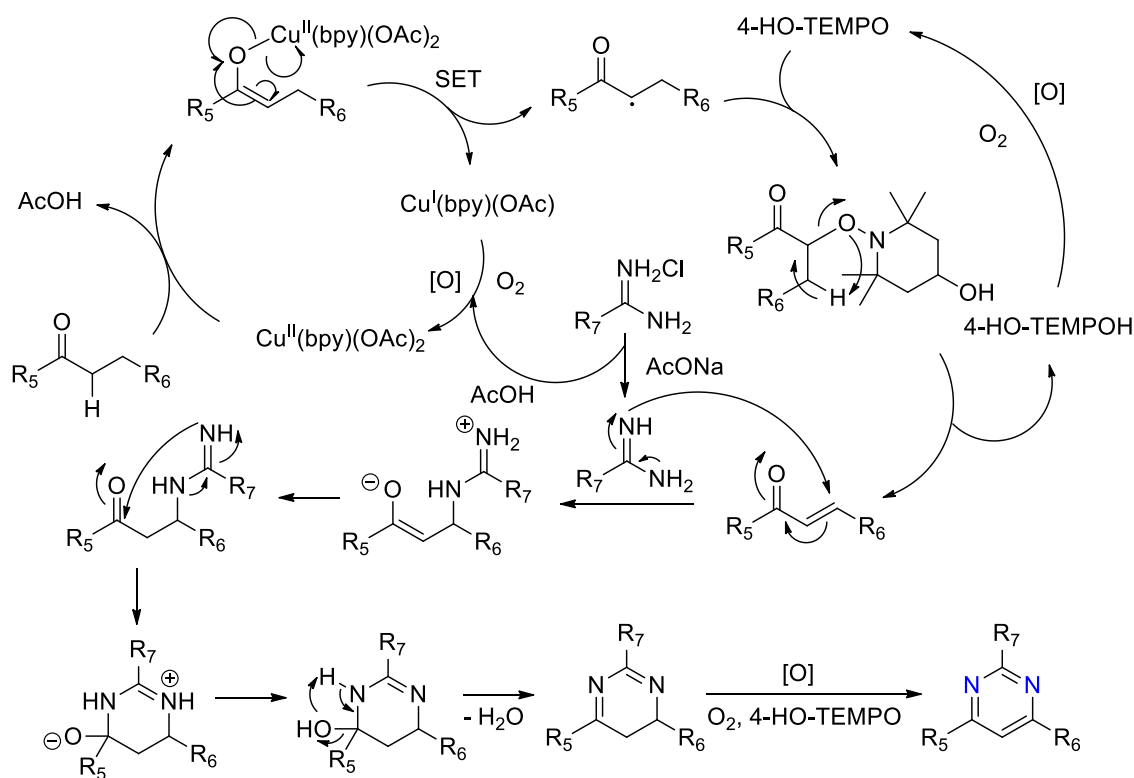
Cykl drugi rozpoczyna się od reakcji kondensacji HTMP z propiofenonem, która kończy się na wytworzeniu odpowiedniej enaminy. Ta ostatnia pod wpływem Int. 1 ulega utleniającej addycji TEMPO do pozycji α tworząc związek o charakterze iminiowym, zwany Intermediatem 2 (Int. 2). W reakcji tej, jon żelaza(III) z Int. 1 ulega redukcji do jonu żelaza(II), tym samym regenerując rezerwuuar zredukowanej formy żelaza. Int. 2 ulega rozpadowi w dwojnasób: (a) β -eliminacja protonu lub/i (b) hydroliza. Droga (a) powoduje powstanie związku α,β -nienasyconego o charakterze soli iminiowej, która wtórnie ulega hydrolizie, do właściwego związku α,β -nienasyconego; tworzy się cząsteczka TEMPOH jako produkt uboczny. Droga (b) stanowi uzupełnienie cyklu drugiego, a w pierwszym jej etapie powstaje keton, który w pozycji α podstawiony jest cząsteczką TEMPO. Następnie, dzięki β -eliminacji protonu, powstaje właściwy związek α,β -nienasycony, a TEMPOH zwracane jest do cyklu drugiego. Ta ostatnia cząsteczka zdolna jest pod wpływem jonu żelaza(II) przejść w HTMP, z wydzielaniem wody oraz wygenerowaniem utleniającego jonu żelaza(III). Powstała HTMP pod wpływem propiofenonu

zdolna jest do dostarczenia pewnej ilości enaminy, od której rozpoczęta została analiza cyklu drugiego.

Można wyróżnić również dodatkową drogę przejścia od enaminy do Int. 2 w ramach drugiego cyklu reakcyjnego. Rozpoczyna się ona od utlenienia enaminy na atomie azotu, przy pomocy jonów żelaza(III), z utworzeniem kationorodnika aminylowego, który dzięki winylowej pozycji wiązania podwójnego może dać strukturę rezonansową typu iminiowego z rodnikiem zlokalizowanym w pozycji α . Ten ostatni zdolny jest do reagowania z TEMPO dając Int. 2. Mechanizm ten obarczony był w publikacji jedynie niewielkim błędem przy utlenianiu wejściowej enaminy, gdyż położenie wiązania podwójnego było nieprawidłowe.

Ostatni etap zakłada kondensację α,β -nienasyconego ketonu z amidyną na drodze: (1) reakcji Michaela, a następnie (2) wewnątrzcząsteczkowej kondensacji. Powstały, nasycony intermediat utlenia się następnie do pożądanego produktu końcowego [132].

Metoda C jest niezwykle podobna do metody B z tego względu, że również korzysta ona z mechanizmu utleniającej cyklizacji, dla podobnych substratów (to jest: podstawionych amidyn i pochodnych propiofenonów), z tą różnicą, że para redoks jaka tu występuje oparta jest o jony miedzi(II), 4-OH-TEMPO oraz tlen z powietrza. Wydajności tych reakcji są zbieżne z tymi, które notowane są w metodzie B. Pewną nowość wnosi podstawienie propiofenonów w pozycji β , dzięki czemu możliwa jest synteza 2,4,6-tripodstawionych pirymidyn.

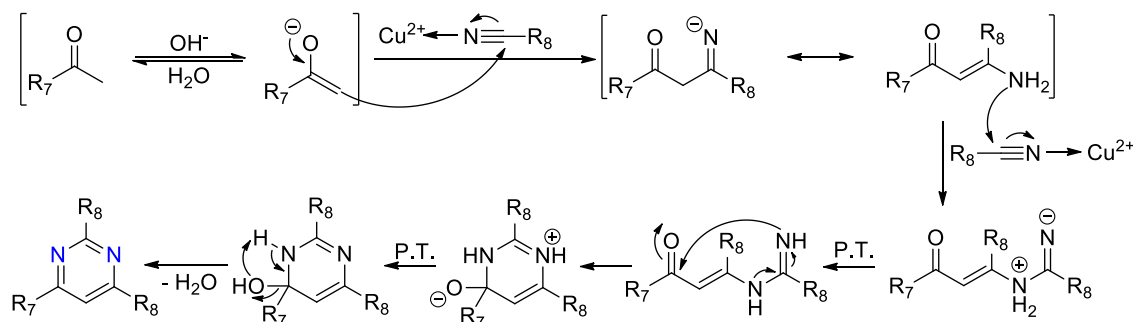


Schemat 41. Mechanizm syntezy 2,4,6-tripodstawionej 1,3-diazyny z pochodnej propiofenonu i chlorowodoru amidyny, katalizowanej jonami miedzi(II) i 4-HO-TEMPO, w warunkach aerobowych

Autorzy zaproponowali prostszy mechanizm niż ten w metodzie B (**Schemat 41**). Rozpoczyna się on od kompleksowania podstawionego propiofenonu przez jony miedzi(II), co

skutkuje możliwą tautomeryzacją grupy ketonowej do formy enolowej. Następnie dochodzi do reakcji SET, w wyniku której związek miedzi(II) redukuje się do miedzi(I), uwalniając się z wytworzonego uprzednio kompleksu, zaś rdzeń węglowy transformowany jest do rodnika opartego o rdzeń propiofenonu, zlokalizowanego w pozycji α względem grupy karbonylowej. W wyniku rekombinacji powstałego rodnika z 4-HO-TEMPO powstaje α -podstawiony keton, który skory jest do β -eliminacji. α,β -Nienasycony keton stanowi akceptor Michaela i atakowany jest przy pomocy wolnej pary elektronowej zlokalizowanej na atomie azotu w amidynie. Bieg tego etapu jest taki sam jak w przypadku końcowej fazy reakcji w metodzie B. Skonsumowane w reakcji 4-HO-TEMPO przechodzi w swój zredukowany wariant — 4-HO-TEMPOH, a ten może zostać ponownie zaktywowany przy pomocy tlenu z powietrza, i tym samym znów spełniać swoje funkcje jako utleniacz [133].

Metoda D, podobnie do metody A, wykorzystuje postawione acetofenony jako rdzeń budowanych cząsteczek 1,3-diazyn. Ekwiwalenty azotowe dostarczane są w tym wypadku przy pomocy nityli, które poza aktywnym udziałem w reakcji, pełnią rolę jako rozpuszczalnik. Reakcja ta prowadzona jest w podwyższonej temperaturze, w obecności jonów miedzi(II), które pełnią rolę kwasu Lewisa, a także przy udziale zasady — wodorotlenku sodu. Przemiany te charakteryzują się wydajnościami mieszczącymi się w przedziale od umiarkowanych do bardzo dobrych i pozwalają na otrzymanie 2,4,6-tripodstawionych 1,3-diazyn.



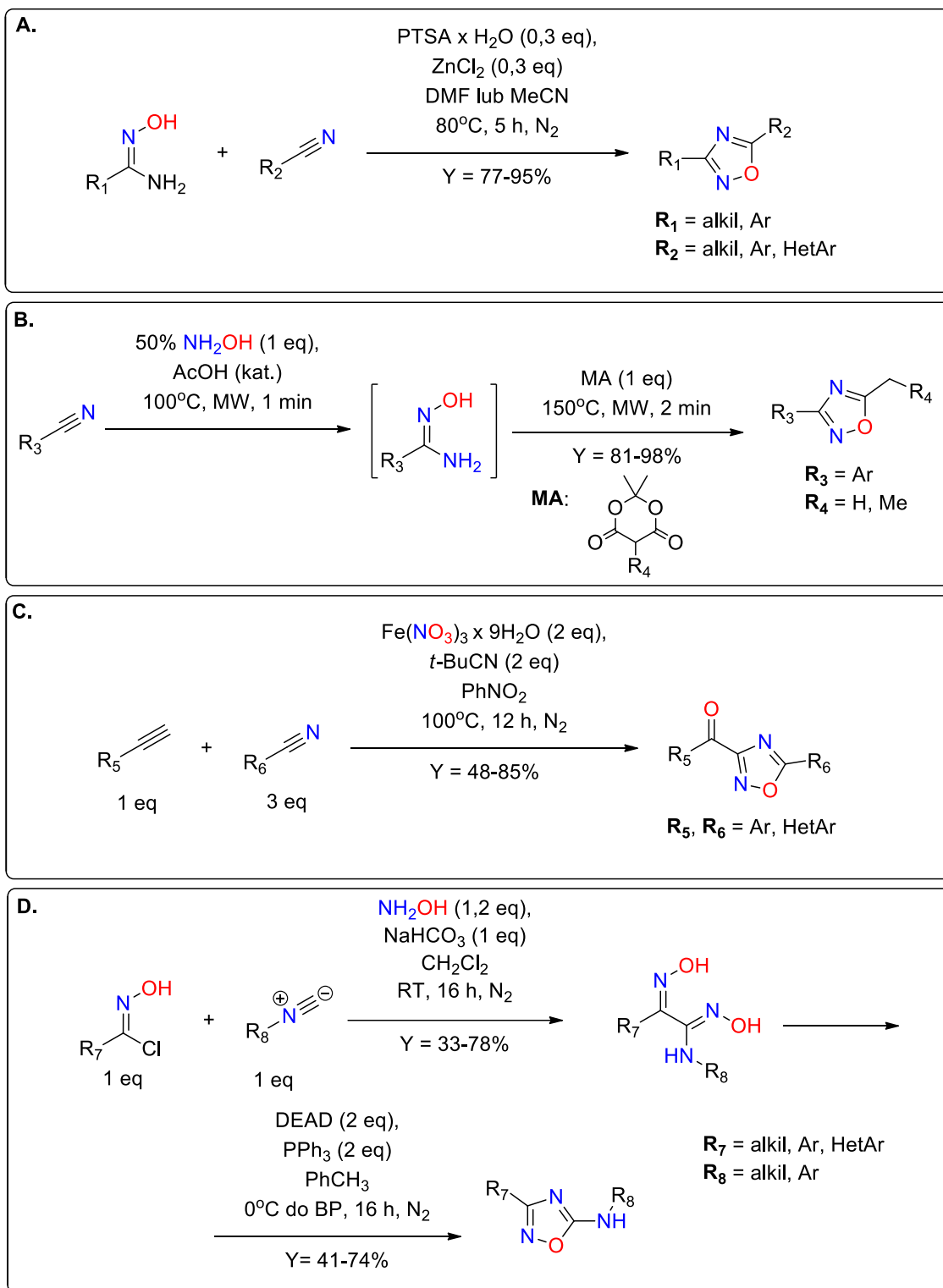
Schemat 42. Mechanizm syntezy 2,4,6-tripodstawionej 1,3-diazyny z pochodnej acetofenonu i nitylu, katalizowanej związkami miedzi(II), w warunkach zasadowych

Mechanizm ten zakłada wkomponowywanie dwóch ekwiwalentów azotowych w cząsteczkę acetofenonu dzięki zjawisku tautomeryzacji katalizowanej zasadą (Schemat 42). W pierwszym etapie enolizacja zachodzi dzięki odszczepieniu kwaśnego protonu α przez anion wodorotlenkowy. Następnie, dochodzi do wytworzenia wiązania C-C poprzez atak nukleofilowego węgla α na elektrofilowy atom węgla w nitylu, aktywowanym poprzez kompleksowanie jego atomu azotu związkiem miedzi(II). Powstała na tym etapie imina, zdolna jest do wytworzenia wariantu aminowego na drodze tautomeryzacji iminowo-aminowej. Kolejno, promowana przez zasadę jest addycja nukleofilowego atomu azotu do kolejnej, aktywowanej cząsteczki nitylu, z powstaniem wiązania C-N. Na drodze dalszej tautomeryzacji i cyklokondensacji, możliwe jest powstanie pożądanego produktu [134].

4.2.6. 1,2,4-Oksadiazole

Otrzymywanie 1,2,4-oksadiazoli wiąże się z wprowadzeniem do małego, 5-członowego szkieletu heterocyklicznego aż 3 heteroatomów. Można to osiągnąć dzięki zastosowaniu cząsteczek zawierających wszystkie 3 heteroatomy w swojej budowie (np. amidoksyminy) lub dzięki reakcjom wielokomponentowym, zachodzącym dla molekuł zawierających mniejszą ich liczbę (np. oksym i równoważnik azotowy, czy też chlorooksym i nityl). W literaturze, zdecydowanie częściej można natknąć się na ten pierwszy wariant, gdyż amidoksyminy są proste w syntezie (z odpowiednich nityli i hydroksyloaminy), i dzięki temu łatwo dostępne. Dobudowanie brakującego ekwiwalentu węglowego można osiągnąć dzięki użyciu kwasów karboksylowych w metodach odwadniających, nityli w reakcjach dipolarnych, alkinów w transformacjach katalizowanych metalami przejściowymi, czy nawet kwasu Meldruma (malonian izopropylidenowy, 2,2-dimetylo-1,3-dioksano-4,6-dion) w przemianach zachodzących z dekarboksylacją [135].

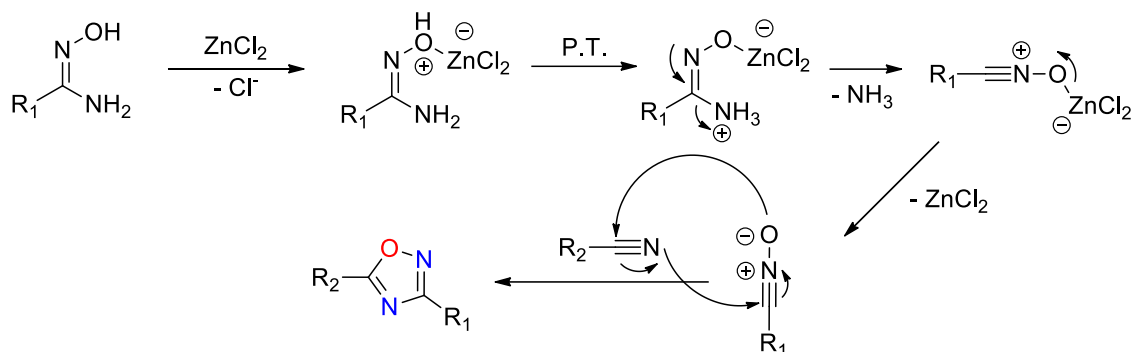
Wybrane metody syntezy 1,2,4-oksadiazoli przedstawiono na **Schemacie 43**.



Schemat 43. Wybrane metody syntezy 1,2,4-oksadiazoli

W metodzie A przedstawiono syntezę 3,5-dipodstawionych 1,2,4-oksadiazoli wychodząc z amidoksymów oraz nityli jako źródeł azotu oraz rdzenia węglowego. Reakcję prowadzi się w obecności kwasu *p*-toluenosulfonowego (PTSA) oraz chlorku cynku, w *N,N*-dimetyloformamidzie lub acetonitrylu (wówczas, gdy R_2 = Me). Wydajności tych reakcji są dobre i bardzo dobre. Układ PTSA-ZnCl₂ odpowiada za transformację wejściowego amidoksymu

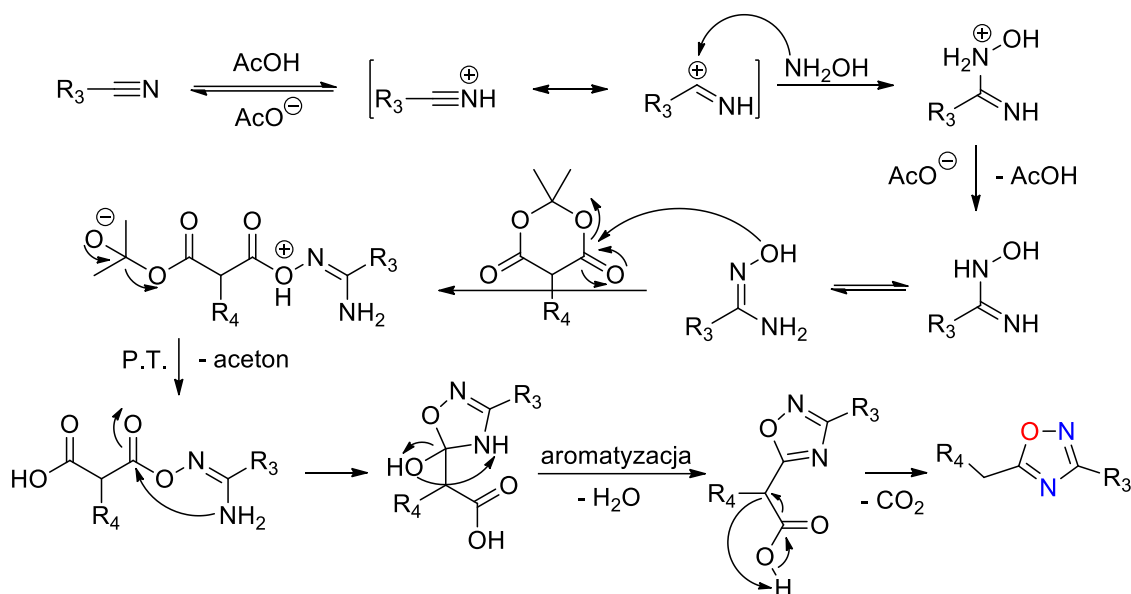
w *N*-tlenek nitrylu, stąd atom azotu typu amidowego w amidoksymie nie bierze udziału w tworzeniu pierścienia. Pożądany heterocykl powstaje na drodze reakcji dipolarnej.



Schemat 44. Mechanizm syntezy 3,5-dipodstawionego 1,2,4-oksadiazolu z amidoksymu i nitrylu, katalizowanej chlorkiem cynku

Zaproponowany przez autorów mechanizm reakcji (**Schemat 44**), choć dosyć skąpo opisany, sugeruje powstawanie *N*-tlenku nitrylu z wejściowego amidoksymu. Choć obecność PTSA mogłaby sugerować mechanizm biegnący przez dehydratację, nie jest to możliwe, gdyż w układzie reakcyjnym nie ma innego źródła tlenu. Najprawdopodobniej, w pierwszym etapie dochodzi do wytworzenia kompleksu chlorek cynku-atom tlenu w amidoksymie. Transfer protonu z atomu tlenu na amidowy atom azotu promuje eliminację cząsteczki amoniaku z wytworzeniem produktu przejściowego. Nie można wykluczyć tworzenia kompleksu z amidowym atomem azotu przez układ PTSA-ZnCl₂, co w efekcie również doprowadzi do eliminacji NH₃. Dochodzi następnie do reakcji 1,3-dipolarnej pomiędzy tlenkiem nitrylu a nitrylem, której efektem jest powstanie 1,2,4-oksadiazolu [136].

Metoda B stanowi przykład reakcji inicjowanej mikrofalami. W pierwszym etapie dochodzi do powstania amidoksymu, z odpowiedniego nitrylu oraz hydroksyloaminy (kataliza kwasem octowym). Następnie, bez oczyszczania produktu przejściowego, dodawany jest kwas Meldruma lub jego metylowa pochodna, co w warunkach podwyższonej temperatury (dekarboksylacja), skutkuje powstaniem 2,5-dipodstawionym 1,2,4-oksadiazolem, gdzie w pozycji piątej obserwuje się podstawnik typu benzyłowego. Reakcje te będą z bardzo dobrymi wydajnościami, zaś czas ich prowadzenia mieści się w 3 minutach. Transformację tę można zaliczyć zarówno do odwadniającej cyklizacji, jak i dekarboksylacji.

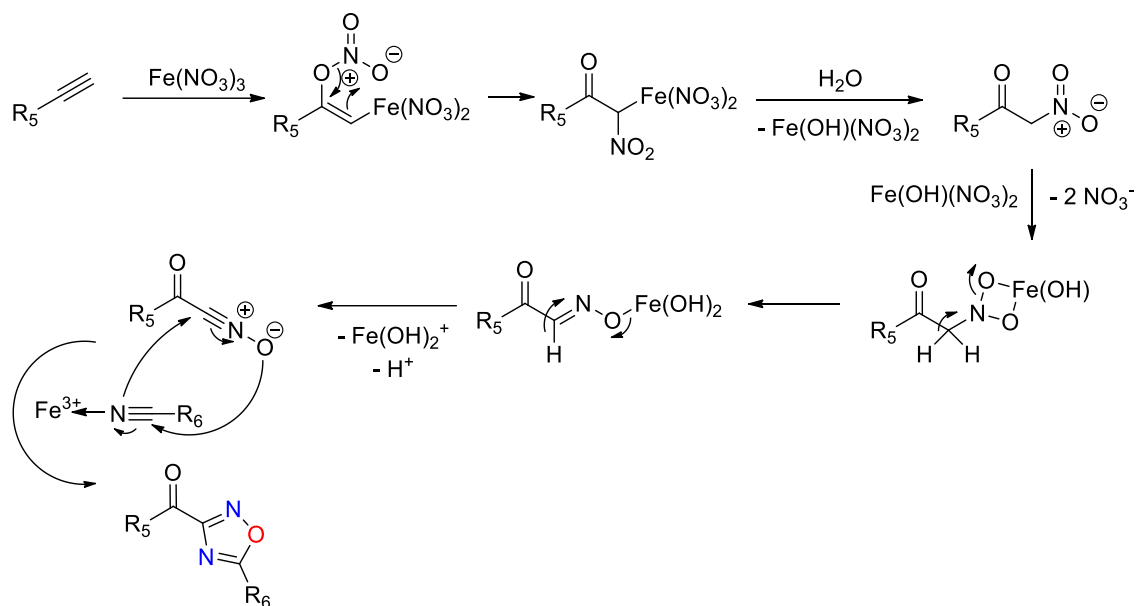


Schemat 45. Mechanizm syntezy 3,5-dipodstawionego 1,2,4-oksadiazolu z nitylu, hydroksyloaminy i pochodnej kwasu Meldruma w kwasie octowym

Mechanizm tej reakcji (**Schemat 45**) obejmuje addycję nukleofilową hydroksyloaminy do grupy nitylowej, skutkującą powstaniem amidoksymu. Ten ostatni ulega następnie acylowaniu kwasem Meldruma. Cyklizacja biegnie przez etap substytucji nukleofilowej w układzie acylowym, w której atom azotu typu amidowego wiąże się z węglem w grupie acylowej. Następca dehydratacja oraz dekarboksylacja powoduje powstanie pożądanego produktu końcowego [137].

W metodzie C wskazano otrzymywanie 2-acylo-5-arylo-1,2,4-oksadiazolu z odpowiednich alkinów terminalnych i nityli. Choć nityle mogą stanowić równoważniki wnoszące atom azotu do heterocykli, nie zawierają one koniecznego do powstania 1,2,4-oksadiazoli atomu tlenu. Jako źródło brakującego atomu tlenu (oraz azotu) stosuje się azotan(V) żelaza(III). Pełni on dwie podstawowe funkcje, a mianowicie — działa jako środek nitrujący i uwadniający alkiny terminalne oraz jako aktywator (czynnik zwiększający elektrofilowość) atomu węgla w grupie cyjankowej. Katalizator żelazowy stabilizowany jest *t*-butylnitrylem, który pełni rolę liganda w jego kompleksie. Transformacja ta prowadzona jest w podwyższonej temperaturze, w nitrobenzenie jako rozpuszczalniku, a jej wydajności mieszczą się w granicach od umiarkowanych do bardzo dobrych.



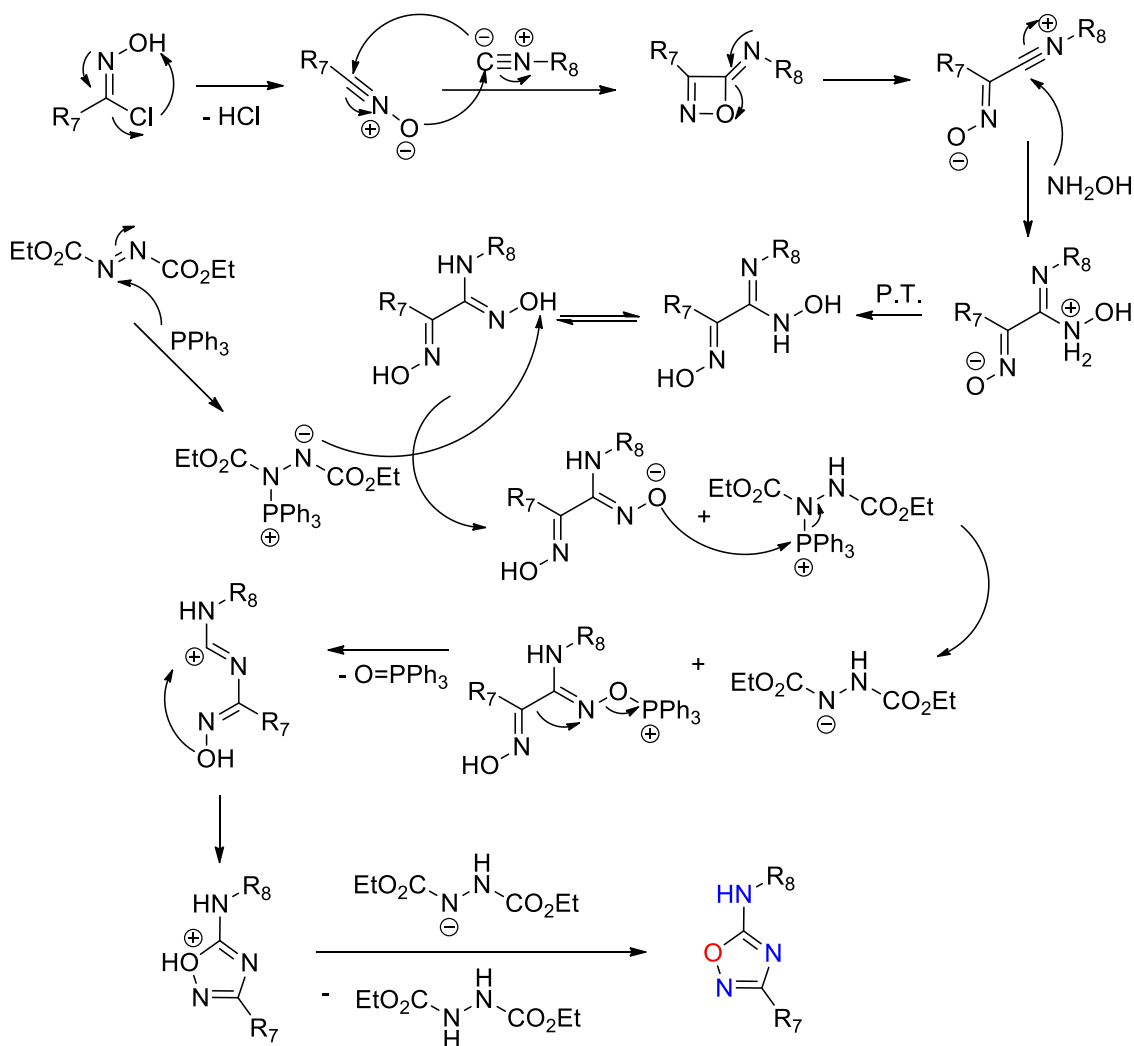


Schemat 46. Mechanizm syntezy 3-acylo-5-alkilo 1,2,4-oksadiazolu z alkinu i nitrylu, warunkach katalizy azotanem(V) żelaza(III)

Autorzy postulują mechanizm (**Schemat 46**), w którym w pierwszym etapie dochodzi do jednoczesnego uwodnienia alkinu i jego nitrowania w pozycji terminalnej [138]. Przeprowadzone eksperymenty kontrolne z izotopem ^{18}O wykazały, że w tlen w ugrupowaniu acylowym pochodzi od cząsteczki wody obecnej w mieszaninie reakcyjnej. Wcześniejsze doniesienia literaturowe, gdzie użyto azotanu(V) miedzi(II) [139], wskazują jednak na addycję $Cu(NO_3)_2$ do alkinu, z wytworzeniem alkenu, w którym w pierwszej pozycji znajduje się anion NO_3^- , zaś w drugiej grupa $-Cu(NO_3)$. W wyniku przegrupowania, grupa NO_3^- pozostawia w pozycji pierwszej grupę karbonylową, zaś w drugiej — nitrową. Powstały α -nitroketon występuje w pewnej równowadze nitro-*aci* ze swoim wariantem α,β -nienasyconym. Sugeruje się, iż pod wpływem katalizatora, tautomer *aci* może być źródłem *N*-tlenku nitrylu na skutek dehydratacji [138, 139]. Ten ostatni ulega cykloaddycji 1,3-dipolarnej z aktywowanym nitrylem, dając pożądaný produkt. Istnieją pewne mechanizmy kompetycyjne, które mogą wpływać na obniżenie wydajności tych przemian (np. tworzenie izoksazolu, czy 1,3-diazyny) [139]. Przedstawiony powyżej mechanizm powstał na podstawie sugestii znalezionych w literaturze [138-140].

Ostatnia z wybranych metod otrzymywania 1,2,4-oksadiazoli jest reakcją dwuetapową, w której: (1) w pierwszym kroku otrzymuje się aminodioksymy ($R-C(=N-OH)-C(=N-OH)-NH-R$) z odpowiednich chlorków oksymów, izonitryli oraz hydroksyloaminy w obecności wodorowęglanu sodu jako zasady, zaś w (2) drugim — aminodioksym ulega przegrupowaniu (Mitsunobu-)Beckmanna do odpowiednich 5-amino-1,2,4-oksadiazoli. Wydajności otrzymywania produktu przejściowego mieszczą się w granicach 33-78%. W drugim etapie odtlenowaniu ulega grupa amidoksymowa, co skutkuje przegrupowaniem Beckmanna i następczą cyklizacją do pożądanego produktu. Usuwanie atomu tlenu możliwe jest dzięki wprowadzeniu warunków reakcji Mitsunobu, gdzie rolę odczynnika roboczego pełni układ PPh_3 -DEAD (trifenylfosfina-azodikarboksylan dietylu). Wydajność tej reakcji mieści się w granicach 41 i 74%.





Schemat 47. Mechanizm syntezy $N^5,3$ -dipodstawionego 1,2,4-oksadiazolu z chlorooksymu, izonitrylu i hydroksyloaminy, w obecności DEAD i trifenylfosfiny

Mechanizm pierwszego etapu tej transformacji obejmuje wieloskładnikową reakcję biegnącą przez (1) stadium N -tlenku nitrylu, który może reagować z izonitrylem na drodze insercji (izonitryl jako karben) lub na drodze addycji nukleofilowej (izonitryl jako nukleofil), a następnie z hydroksyloaminą poprzez addycję nukleofilową; następnie, (2) w drugim etapie obserwuje się reakcję Mitsunobu-Beckmanna (**Schemat 47**).

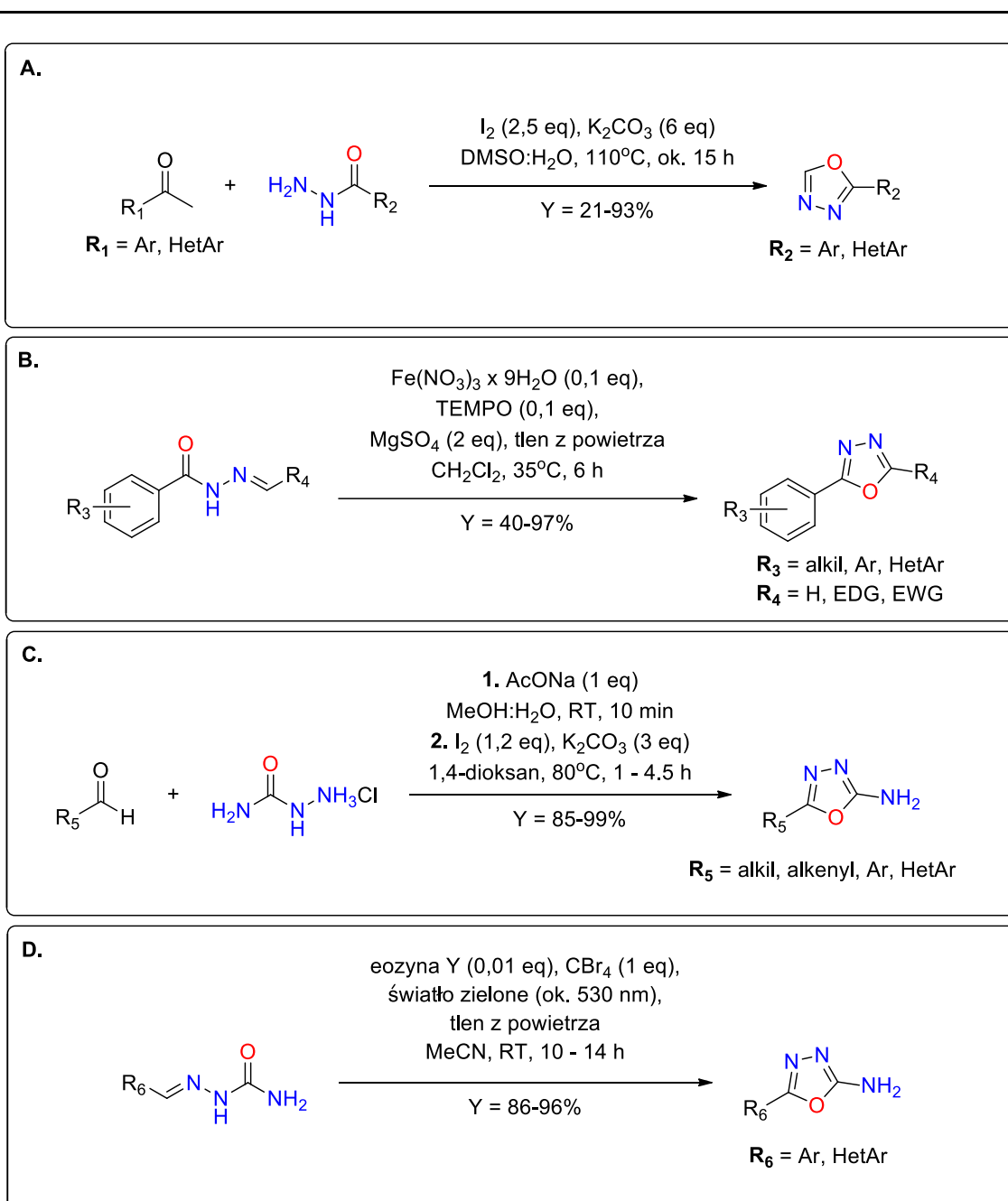
Chlorki oksymów mają zdolność do eliminacji chlorowodoru z wytworzeniem N -tlenku nitrylu. Ten ostatni zdolny jest do wzięcia udziału w reakcji z izonitrylem. Jeśliby rozważyć charakter karbenowy węgla w grupie izonitrylowej, jego reakcja z N -tlenkiem nitrylu będzie mechanizmem uzgodnionym. Węgiel izonitrylowy ulega insercji pomiędzy tlen i węgiel w N -tlenku nitrylu z wytworzeniem podatnego na rozczepienie 1,2-oksazetu. Powstający tutaj N -alkilowany kation nitryliowy, w obecności hydroksyloaminy, przechodzi w aminodioksym. Jeśli reakcję N -tlenku nitrylu z izonitrylem potraktować jako reakcję jonową, gdzie rolę nukleofila pełni atom węgla w grupie izonitrylowej, to N -alkilowany kation nitryliowy powstaje od razu.

Drugi fragment mechanizmu oparty jest o reakcję Mitsunobu. Wytworzony, betainowy addukt $\text{PPh}_3\text{-DEAD}$ odszczepia kwaśny proton z atomu tlenu w części amidoksymowej aminodioksymu. Następnie, nukleofilowy atom tlenu ulega fosfinowaniu. Powstały układ fosfoniowy, po eliminacji tlenu trifenylfosfiny (O=PPh_3), ulega przegrupowaniu Beckmanna, w którym migruje fragment oksymowy. Cyklizacja przebiega z udziałem atomu tlenu w oksymie, który atakuje elektrofilowy atom węgla powstały po migracji fragmentu cząsteczki [141].

4.2.7. 1,3,4-Oksadiazole

Konstruowanie rdzenia 1,3,4-oksadiazolu możliwe jest dzięki zastosowaniu metodologii utleniającej, bądź odwadniającej cyklizacji. Ten pierwszy wariant może zostać zrealizowany dzięki wykorzystaniu *N'*-acylowanych hydrazonów w obecności utleniaczy opartych na jonach metali przejściowych lub barwników triarylometinowych, hydrazydów wraz z ekwiwalentami węglowymi przy udziale jodu cząsteczkowego, czy też tiosemikarbazydów na drodze utleniającej desulfuryzacji inicjowanej nadtlenomonosiarczanem potasu. Drugi sposób odnosi się do odwadniania takich układów jak: kwas karboksylowy-hydrazyd, ester aktywny kwasu karboksylowego-hydrazyd, czy *N'*-acylowany semikarbazyd (tiosemikarbazyd), w obecności środków odwadniających (np. chlorek tosylu, EDCI, T3P), często zachodzących w podwyższonej temperaturze. Główną wadą tych pierwszych metod jest zwężenie zakresu stosowanych grup funkcyjnych, ze względu na ryzyko ich degradacji. Na szczególną uwagę zasługuje transformacja 5-arylowanych-2*H*-tetrazoli w 2,5-dipodstawione 1,3,4-oksadiazole, prowadzona w obecności aldehydów i nadtlenu di-*t*-butylu (DTBP), ze względu na możliwość przeprowadzenia jednego układu heterocyklicznego w drugi, w nieskomplikowany sposób [142].

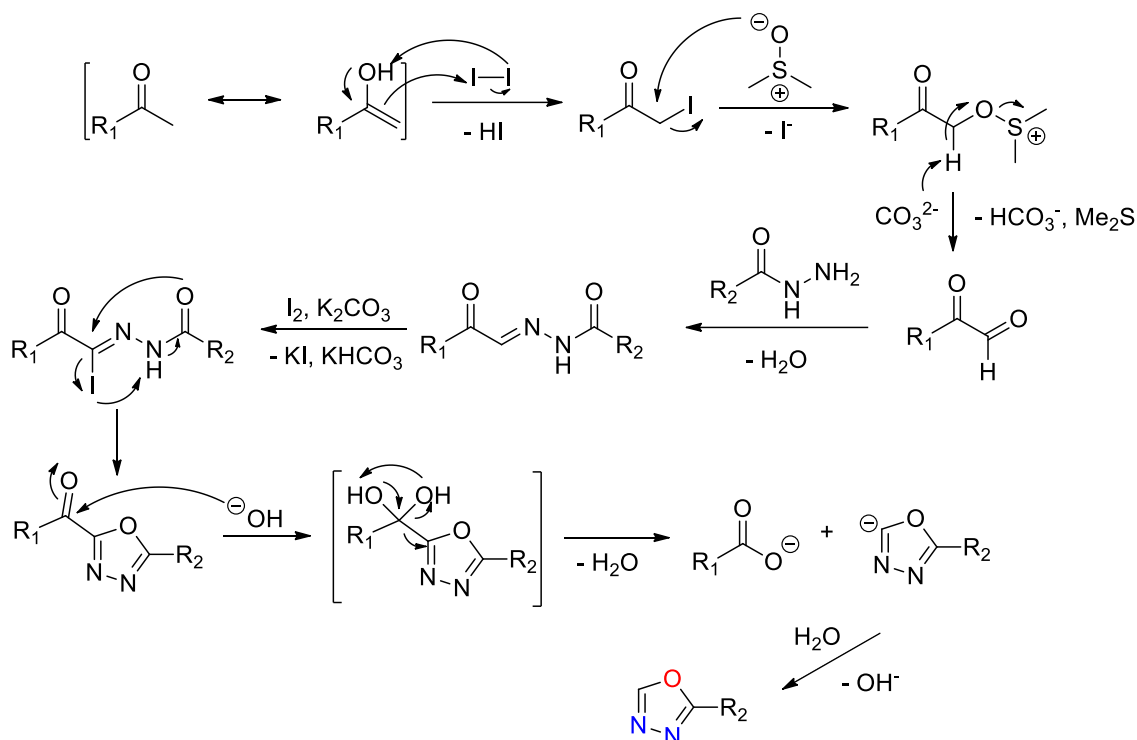
Wybrane metody syntezy układu 1,3,4-oksadiazolowego zostały zaprezentowane na **Schemacie 48**.



Schemat 48. Wybrane metody syntezy 1,3,4-oksadiazoli

W metodzie A przedstawiono syntezę 2-podstawionych 1,3,4-oksadiazoli, które otrzymuje się z podstawionych acetofenonów (i ich heterocyklicznych odpowiedników) oraz hydrazydów, na drodze oksydatywnej cyklizacji w obecności jodu cząsteczkowego, zasady, w podwyższonej temperaturze i mieszaninie DMSO:H₂O jako rozpuszczalniku. Czynnikiem utleniającym w tej reakcji jest cząsteczka jodu oraz pomocniczo dimetylosulfotlenek. Wydajności tych reakcji mieszczą się w granicach od słabych do bardzo dobrych, w zależności od modelu, z wyraźnie niższymi w przypadku podstawników wywierających silny efekt indukcyjny skierowany w kierunku heteroatomu. Należy zwrócić uwagę na fakt, iż w reakcji tej mamy do czynienia z rozszczepieniem wiązania C-C, występującym pomiędzy węglem karbonylowym ketonu a jego

podstawnikiem metylowym. Możliwe jest jednak zachowanie podstawnika acylowego, jednak wymaga to zastosowania innej zasady — fosforanu(V) potasu.



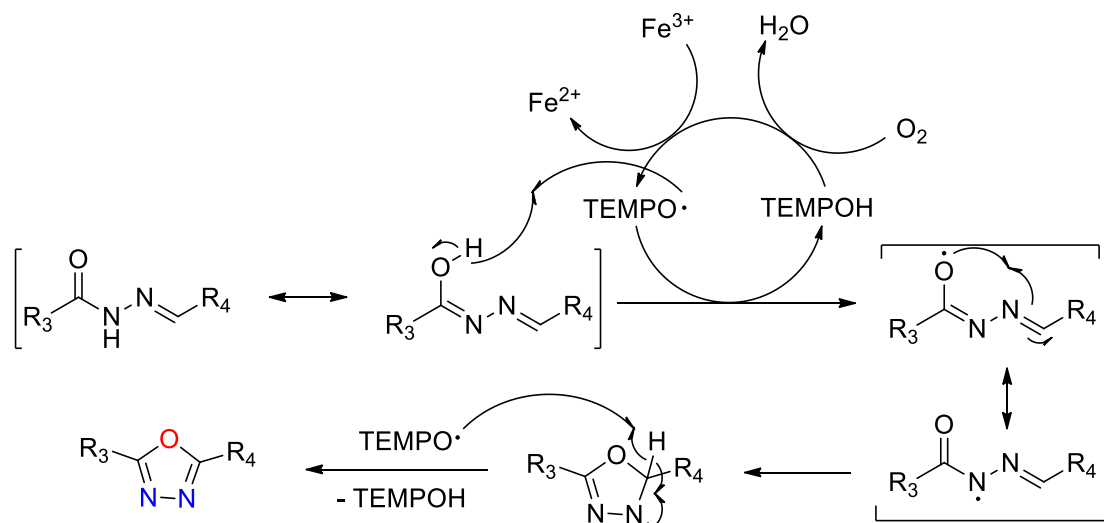
Schemat 49. Mechanizm syntezy 2-podstawionego 1,3,4-oksadiazolu z pochodnej acetofenonu i hydrazynu, w obecności jodu cząsteczkowego, dimetylosulfotlenku i węglanu potasu

Mechanizm otrzymywania 2-podstawionych 1,3,4-oksadiazoli (**Schemat 49**) zakłada w pierwszym etapie α -halogenowanie acetofenonu. Następnie, po dodaniu zasady do mieszaniny reakcyjnej, zachodzi utlenianie Kornbluma otrzymanego jodku fenacylu, przy udziale DMSO, z wytworzeniem związku 1,2-dikarbonylowego. Powstałe ugrupowanie aldehydowe reaguje następnie z obecnym w układzie hydrazynem tworząc N',C -diacylowany hydrazon. Autorzy sugerują, iż kolejnym krokiem jest transformacja hydrazonu w jodek hydrazonowy pod wpływem cząsteczek jodu, w warunkach zasadowych. Po cyklizacji i izomeryzacji powstaje 2,5-dipodstawiony 1,3,4-oksadiazol, gdzie w pozycji piątej podstawnikiem jest grupa acylowa. Sugeruje się, iż intermediat ulega deacylowaniu pod wpływem zasady, w podwyższonej temperaturze, dając produkt końcowy [143].

W metodzie B przedstawiono syntezę 2,5-dipodstawionych 1,3,4-oksadiazoli, które otrzymuje się z N' -acylowanych hydrazonów pod wpływem utleniającej cyklizacji katalizowanej jonami żelaza(III) i TEMPO, w obecności tlenu powietrza i czynnika wiążącego powstałe w reakcjach ubocznych cząsteczki wody. Wydajności obserwowane dla tej przemiany mieszczą się w granicach od umiarkowanie słabych do bardzo dobrych, jednak trudno jest skorelować uzyskane wyniki z występowaniem zawady sterycznej, czy konkretnych efektów elektronowych w podstawnikach, zarówno pochodzących od części aldehydowej, jak i hydrazynowej.



Niewątpliwą zaletą tej reakcji jest stosunkowo krótki czas jej prowadzenia przy temperaturze zbliżonej do warunków pokojowych.

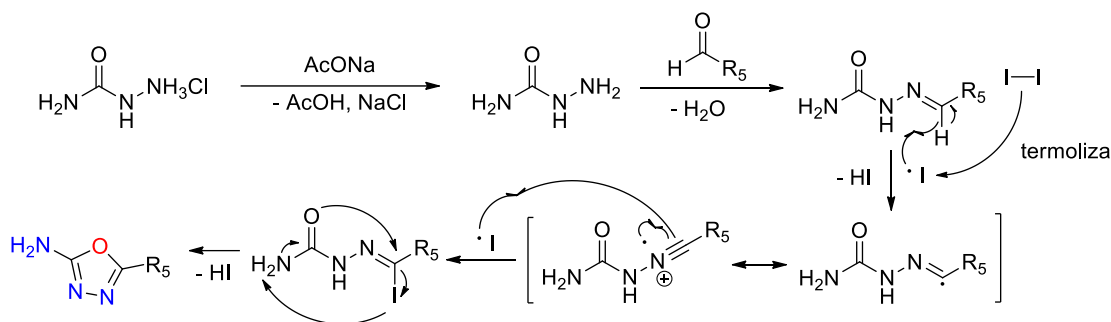


Schemat 50. Mechanizm syntezy 2,5-dipodstawionego 1,3,4-oksadiazolu z *N'*-acylowanego hydrazonu w obecności TEMPO i jonów żelaza(III), w warunkach aerobowych

Autorzy sugerują (**Schemat 50**), iż w pierwszym etapie mechanizmu dochodzi do rodnikowego odłączenia atomu wodoru typu amidowego, z tautomerycznym przejściem do rodnika oksylogowego. Choć w publikacji przedstawiono tworzenie anionu na atomie tlenu, zanim wytworzy się wcześniej wymieniony rodnik, nie jest to możliwe. Dalszy fragment mechanizmu zakłada rodnikową, wewnątrzcząsteczkową cyklizację z wykorzystaniem rodnika oksylogowego, który przyłącza się do atomu węgla w hydrazonie, generując rodnik aminylowy. Cyklizacja może nastąpić poprzez rodnikowe odłączenie atomu wodoru i następczą aromatyzację. Możliwe jest również wyrysowanie cykli reakcyjnych w oparciu o reakcje aktywności redoks jonów żelaza oraz TEMPO, w kontekście odtwarzania zdolności utleniających jonów żelaza(III) oraz TEMPO przez cząsteczkę tlenu lub aniony azotanowe(V). W przedstawionym przez autorów zamyśle, umyka sens wykorzystania jonów żelaza, gdyż wyrysowana struktura anionowa nie może się tworzyć [144].

Dzięki metodzie C, możliwe jest otrzymanie 5-podstawionych 2-amino-1,3,4-oksadiazoli na drodze utleniającej cyklizacji powstałych jako produkty pośrednie semikarbazonów. Jako utleniacz stosuje się tutaj jod cząsteczkowy, działający w obecności węglanu potasu. Semikarbazony stosuje się bez dodatkowej obróbki, a podstawą ich syntezy jest reakcja aldehydu z chlorowodorkiem semikarbazyny przy udziale octanu sodu jako zasady neutralizującej chlorowodor. Transformacja ta jest prowadzona w podwyższonej temperaturze, w 1,4-dioksanie jako rozpuszczalniku. Jej wydajność można określić jako bardzo dobrą dla większości modeli. Niewątpliwą zaletą tej metody jest wykorzystanie łatwo dostępnych reagentów oraz zielony charakter utleniacza oraz zasady.

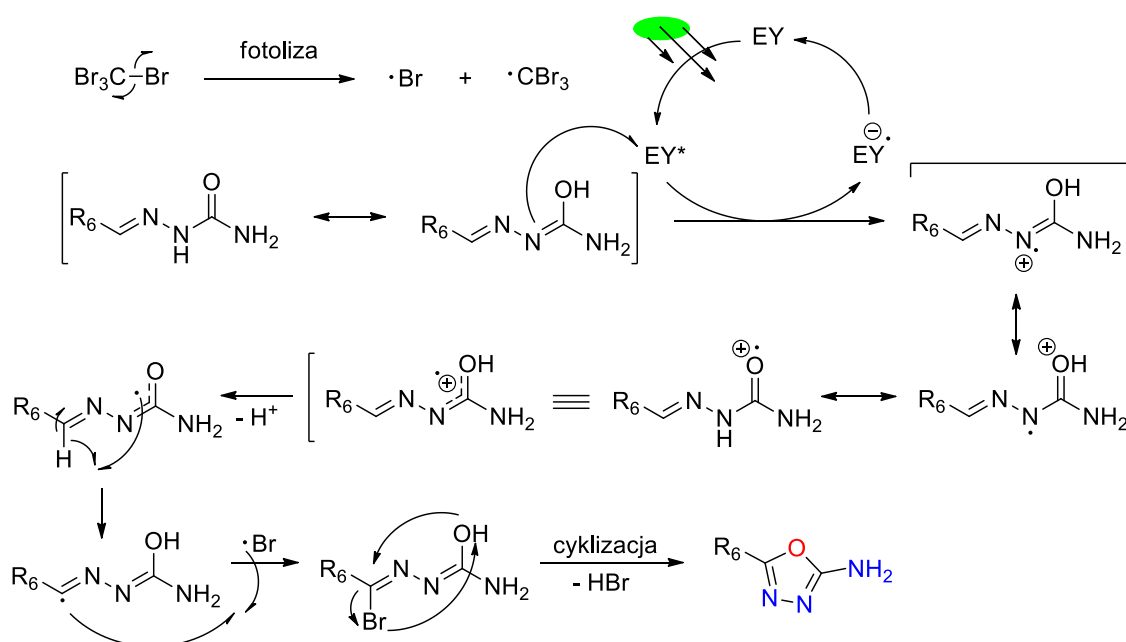




Schemat 51. Mechanizm syntezy 5-podstawionego 2-amino-1,3,4-oksadiazolu z chlorowodoru semikarbazydu i aldehydu, w obecności jodu cząsteczkowego i octanu sodu

Mechanizm tej reakcji rozpoczyna się od neutralizacji chlorowodoru semikarbazydu octanem sodu. Następnie dochodzi do kondensacji pomiędzy uwolnionym semikarbazydem i aldehydem. Powstały semikarbazon przechodzi kolejno w jodek semikarbazonu, który cyklizuje poprzez atom tlenu, powodując eliminację anionu jodkowego (**Schemat 51**) [145].

Ostatnia z przytoczonych metod wykorzystuje reakcję fodoindukowanej konwersji semikarbazonów w 5-podstawione 2-amino-1,3,4-oksadiazole pod wpływem katalizy barwnikiem triarylometinowym — eozyną Y, w obecności czterobromku węgla, tlenu z powietrza, przy naświetlaniu światłem zielonym o długości fali mieszczącej się pomiędzy 520 a 530 nm. Jest to transformacja bliźniacza w stosunku do tej obserwowanej w metodzie C, gdyż również zakłada halogenowanie *in situ* cząsteczki semikarbazonu, a jej wydajności są tak samo dobre. Największą zaletą tej przemiany jest wykorzystanie procesów fotochemicznych do budowania rdzeni heterocyklicznych, choć użycie czterobromku węgla może budzić wątpliwości dotyczące bezpieczeństwa i zieloności tego procesu, niemniej jednak, jest to mało agresywny chemicznie środek bromujący, w porównaniu do NBS czy PBr_3 .



Schemat 52. Mechanizm syntezy 5-podstawionego 2-amino-1,3,4-oksadiazolu z semikarbazonu, fotokatalizowanej eozyną Y (EY) w warunkach światła zielonego, w obecności czterobromku węgla



Autorzy sugerują (**Schemat 52**), iż w pierwszym etapie dochodzi do fotolizy czterobromku węgla z wytworzeniem dwóch rodników: bromkowego oraz tribromometylowego. W kolejnym etapie, rozpatrując zachowanie semikarbazonu, obserwuje się tautomeryzację jego wewnętrznej grupy amidowej. W osobnym cyklu, naświetlanie eozyny Y światłem zielonym przeprowadza ją do stanu wzbudzonego, a ten zdolny jest do redukcji semikarbazonu do formy kationorodnika, samemu przechodząc w formę anionorodnikową. Kationorodnik, zdelokalizowany w ramach wewnętrznej grupy amidowej, po odszczepieniu protonu, tworzy rodnik oksylowy (pozostający w równowadze z rodnikiem aminylowym), który zdolny jest do rodnikowego odszczepienia atomu wodoru w grupie iminowej. Powstały rodnik typu acylowego rekombinuje następnie z rodnikiem bromkowym tworząc bromek semikarbazonu. Cyklizacja następuje poprzez atak nukleofila tlenowego na węgiel iminowy. Eliminacja bromowodoru doprowadza reakcję do pożądanego produktu [146].

4.3. Wybrane właściwości biologiczne układów heterocyklicznych

Ten fragment rozdziału poświęcony jest małym cząsteczkowym związkom chemicznym, które zdolne są do modyfikowania kierunku, bądź intensywności obserwowanych w ustroju odpowiedzi układu immunologicznego. W większości przypadków, omawiana jest inhibicja konkretnego celu molekularnego (np. kinazy, glikoproteiny), która pośrednio lub bezpośrednio wpływa na składniki układu odpornościowego. Związki te prezentowane są zgodnie z klasami heterocykli, które wyróżnia się w ramach ich struktury, choć nie zawsze występują one samodzielnie.

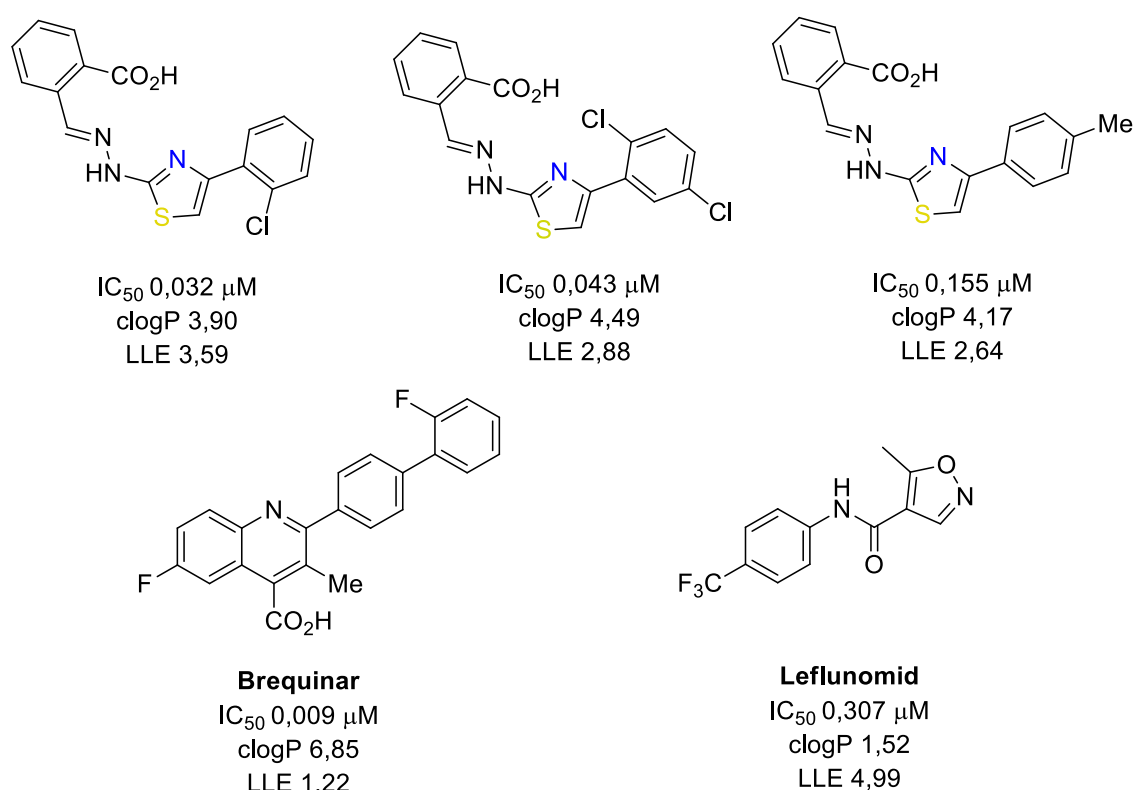
Wraz z początkiem każdego punktu rozdziału przytaczany jest krótki rys biochemiczny mający na celu zgrubne wyjaśnienie aktywności biologicznej celu molekularnego i strategii, która przyswieca działaniu opisywanych później związków. Następnie, cząsteczki te są prezentowane w postaci krótkiego zestawienia graficznego, często uwypuklając wybrane właściwości biologiczne. W końcu, zebrane są najważniejsze informacje, bezpośrednio wynikające z cytowanej pracy eksperymentalnej, możliwie, ze wskazaniem perspektyw badawczych oraz wniosków.

Klasy prezentowanych poniżej heterocykli są komplementarne z wymienionymi w poprzednim podrozdziale, aby aspekty syntetyczne dopełnić istotnymi właściwościami biologicznymi, w tym powiązanymi z aktywnością immunologiczną.

4.3.1. Tiazole

Dehydrogenaza dihydroorotanowa (ang. *dihydroorotate dehydrogenase*, DHODH) to enzym zakotwiczony po zewnętrznej stronie wewnętrznej błony mitochondrium, uczestniczący w biosyntezie nukleotydów pirymidynowych. Transformuje kwas dihydroorotowy w kwas orotowy, na drodze utleniającej reakcji enzymatycznej, z wykorzystaniem tlenu cząsteczkowego i pochodnej ubiquinonu. Zapotrzebowanie metaboliczne na pirymidyny różni się w zależności od typów komórek, gdyż tempo ich rozwoju jest niejednakowe. Dla komórek w pełni rozwiniętych następuje droga odzysku (ang. *salvage pathway*), podczas gdy aktywowane limfocyty i inne,

szybko proliferujące komórki, w tym nowotworowe, zależne są przede wszystkim od biosyntezy pirymidyn szlakiem *de novo*. Inhibicja DHODH wywołuje zatem efekt antyproliferacyjny, zmniejszając przeżywalność komórek układu immunologicznego i nowotworowych, stąd obranie jej za strategię terapeutyczną do walki z rakiem, bądź chorobami autoimmunologicznymi, takimi jak: reumatoidalne zapalenie stawów, łuszczyca, czy stwardnienie rozsiane, wydaje się być uzasadnione. Niektóre z badanych związków małowcząsteczkowych, np. Leflunomid czy Brequinar, będące inhibitorami DHODH, zostały już w przeszłości dopuszczone do praktyki klinicznej, jednak ich ograniczone parametry fizykochemiczne sprawiają, że konieczne jest dalsze poszukiwanie nowych leków immunosupresyjnych w celu zredukowania efektów ubocznych [147, 148].



Rys. 1. Wybrane inhibitory DHODH oparte o rdzeń 1,3-tiazolu (wraz z wzorcami)

Opracowana została seria nowych inhibitorów DHODH w oparciu o szkielet 1,3-tiazolu. Związki te zostały przebadane zarówno w oparciu o testy enzymatyczne *in vitro*, jak i o badania *in vivo* na modelu szczurzym, w którym u zwierząt sztucznie wywołano reumatyzm, dla najbardziej obiecującej pochodnej tiazolu. Procedura optymalizacji zawierała również analizę oddziaływań międzycząsteczkowych, ligand-centrum aktywne enzymu, z wykorzystaniem technik komputerowych.

Badania enzymatyczne przeprowadzono stosując ludzki enzym DHODH, który stworzono i oczyszczono dzięki ekspresji plazmidu kodującego to białko przez bakterie *Escherichia Coli*. Autorzy wyliczyli również parametr LLE (ang. *ligand-lipophilicity efficiency*), który łączy w sobie aktywność biologiczną związku i jego lipofilność; dany jest równaniem: $LLE = pIC_{50} - clogP$,



gdzie pIC_{50} oznacza ujemny logarytm dziesiętny z wartości IC_{50} , zaś $clogP$ — wyliczoną wartość współczynnika podziału oktanol-woda. Stanowi to interesującą metodę porównania związków chemicznych pod kątem ich zdolności do bycia lekiem (ang. *druglikeness*). Nie da się jednoznacznie określić jaki przedział jego wartości jest korzystny dla optymalizacji, jednak warto odnieść go do znanych inhibitorów DHODH. W tym przypadku, wartość ta powinna mieścić się w przedziale LLE od 1,22 do 4,99, aby osiągnąć parametry Brequinaru i Leflunomidu, choć ma to charakter przybliżony, ze względu na niejednakową strukturę analizowanych cząsteczek.

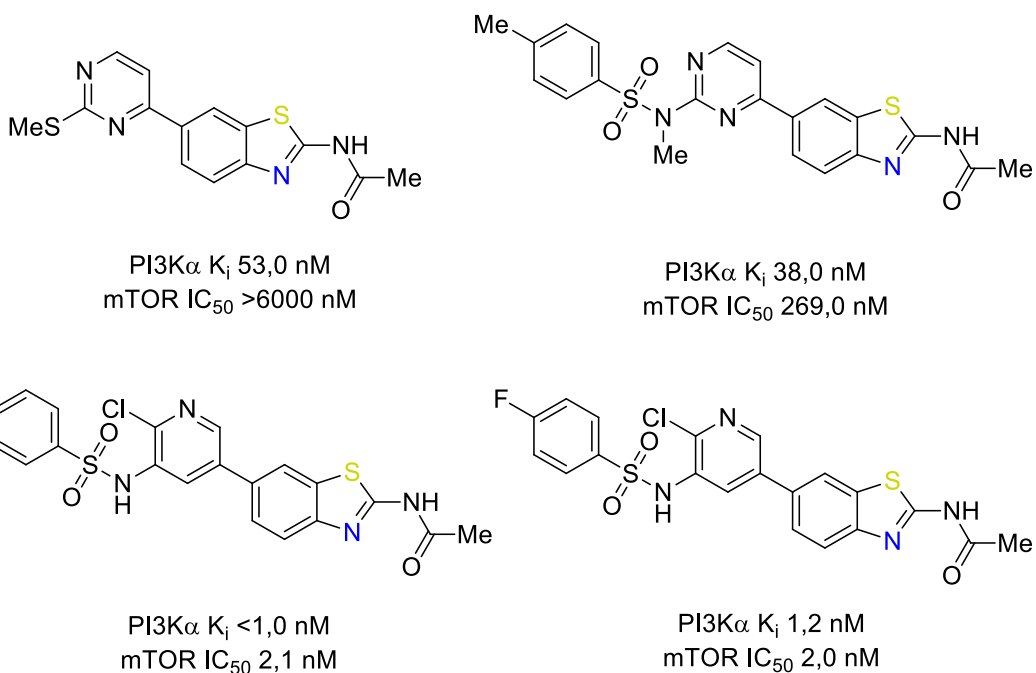
Spośród 32 badanych związków, jedynie jeden okazał się mieć najbardziej obiecujące właściwości, to jest: najniższą wartość współczynnika IC_{50} , godne uwagi właściwości przeciwrheumatyczne w modelu szczurzym, a także dobre właściwości farmakokinetyczne *in vivo*. Dodatkowo, autorzy udowodnili, że do efektywnej aktywności enzymatycznej badanych ligandów, konieczna jest obecność dwóch cząsteczek wody. Tworzą one silne wiązania wodorowe w domenie ubichinonowej DHODH z polarnymi fragmentami cząsteczek (grupa karboksylowa oraz atom azotu w tiazolu wraz z sąsiadującym układem hydrazynowym) [148].

Przedstawiony powyżej przykład dobrze wpisuje się w nurt nowoczesnej chemii medycznej, ze względu na wykorzystanie: celu molekularnego związanego niebezpośrednio ze schorzeniem autoimmunologicznym, technik komputerowych i krystalograficznych, które wzajemnie potwierdzają mechanizm inhibicji enzymu, zaawansowanej syntezy organicznej, a także niebanalnej metodologii prowadzenia badań biologicznych.

4.3.2. Benzotiazole

PI3K (kinaza 3-fosfatydyloinozytolu, ang. *phosphatidylinositol 3-kinase*) to białko będące elementem szlaku sygnałowego odgrywającego istotną rolę we wzroście, przeżyciu i proliferacji komórek. Może wpływać na odpowiedź immunologiczną jedynie wtórnie, drugorzędowo, gdyż nie jest bezpośrednio związane z immunosupresją. Jego rozregulowanie jest obserwowane w rakowaceniu i chorobach opartych na procesach zapalnych, stąd uważa się, że może mieć swój wkład w aktywność immunosupresyjną. Aktywacja PI3K może hamować funkcję komórek odpornościowych i wspierać rozwój komórek immunosupresyjnych, takich jak komórki T regulatorowe i komórek supresorowych pochodzenia mieloidalnego [149, 150].

Szlak sygnałowy PI3K prowadzi do aktywacji wtórnych celów biologicznych, takich jak: kinaza serynowo-treoninowa (PKB), a także kinaza mTOR (ssaczy cel rapamycyny, ang. *mammalian target of rapamycin kinase*), które promują wzrost i przeżywalność, integrując sygnały związane z czynnikami wzrostu, składnikami energetycznymi i bilansem energetycznym komórek. Aktywacja szlaku sygnałowego PI3K obserwowana jest w przypadku wielu nowotworów ludzkich, stąd opracowanie nowych serii inhibitorów PI3K lub dualnych PI3K-mTOR, wydaje się być rozsądną strategią w zwalczaniu chorób nowotworowych i autoimmunologicznych [151].



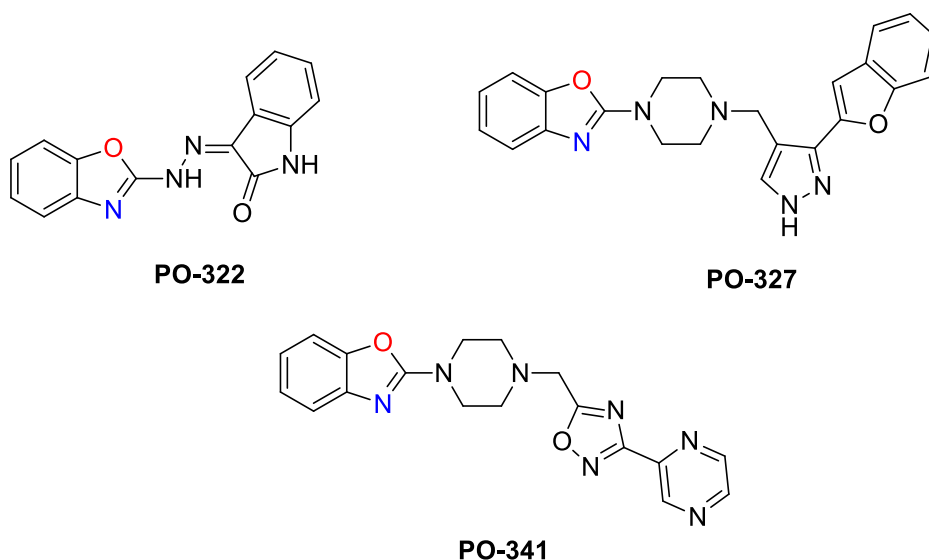
Rys. 2. Wybrane pochodne benzotiazolu hamujące aktywność PI3K α i mTOR

Przetestowano szereg pochodnych benzotiazolowych pod kątem ich użyteczności jako dualne inhibitory PI3K α -mTOR. Poprzez PI3K α należy rozumieć izoformę białka PI3K, różniącą się nieco strukturą. Badania te miały formę optymalizacji, gdzie starano się dokładnie określić zależność struktura-aktywność dla coraz to nowszych pochodnych benzotiazolu, zarówno na podstawie analizy oddziaływań omawianego związku w centrum aktywnym jednej z izoform PI3K, jak i z wykorzystaniem testów *in vitro*, czy uzupełniając — *in vivo*. Opracowanie to zawiera 82 związki, które przynależą do jednej z następujących podkategorii: pochodna z łącznikiem atomowym, związek z łącznikiem siarkowym, azotowym lub tlenowym, grupa pochodnych z łącznikiem w postaci pierścienia aromatycznego i różne jego warianty podstawienia, a także pochodne sulfonamidowe. Należy wyróżnić 4-fluorowaną pochodną sulfonamidową, która wykazywała najwyższą aktywność enzymatyczną i komórkową. Warto dodać, iż związek ten okazał się być najbardziej skuteczny w wątrobowym teście farmakodynamiki, a także w 3 różnych modelach ksenotransplantacyjnych (czyli takich, w których tkankę ludzką przeszczepiono do organizmu zwierzęcego z osłabionym układem odpornościowym), w porównaniu do pozostałych typów związków. Dzięki tym badaniom można stwierdzić, że tego typu benzotiazole mogą posłużyć za obiecujące inhibitory PI3K i mTOR, hamujące wzrost guza w testach *in vivo* [151].

4.3.3. Benzoksazole

SGK1, znana również jako kinaza 1 regulowana przez glikokortykoidy (ang. *glucocorticoid-regulated kinase 1*) lub proteinowa kinaza serynowo-treoninowa (ang. *serine/threonine-protein kinase*), jest kinazą proteinową regulowaną przez glikokortykosteroidy i osocze. Odgrywa istotną rolę w wielu zróżnicowanych procesach komórkowych, w tym: przeżyciu, proliferacji i różnicowaniu komórek, a także w transporcie jonowym. SGK1 jest

niezwykle istotna w przenoszeniu efektów glikokortykosteroidów na ekspresję genów i odpowiedzi komórkowe. W kontekście właściwości immunosupresyjnych wiadomo, że SGK1 dostosowuje funkcje komórek układu odpornościowego poprzez wpływ na aktywność czynników transkrypcyjnych, takich jak NF- κ B (jądrowy czynnik transkrypcyjny κ B (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), kompleks białkowy odgrywający kluczową rolę w modyfikowaniu ekspresji docelowych genów regulujących przeżycie komórek i apoptozę), i regulowanie ekspresji cytokin, i innych składników odpowiedzi immunologicznej. Inhibicja SGK1 może stanowić podstawę pod określanie strategii terapeutycznych w walce z cukrzycą, stanami zapalnymi, a także niektórymi rodzajami raka [152].



Rys. 3. Wybrane pochodne benzoksazolu hamujące aktywność limfocytów T

Nowe pochodne benzoksazolowe, PO-322, PO-327 oraz PO-341, zostały zbadane na limfocytach T aktywowanych przeciwciałami przeciwko CD3 i CD28, a ich wartości IC_{50} wynosiły kolejno: 0,7, 15,1 i 24,5 μ M. Określone wartości stężeń wskazują 50-procentowe zahamowanie proliferacji wcześniej wskazanych komórek. PO-322 wykazał, ponadto, zdolność do specyficznej inhibicji kinazy SGK1, którą określono na podstawie analizy Western Blot, co doprowadziło do inhibicji proliferacji limfocytów T. Dodatkowo, związek ten w badaniach na modelu mysim efektywnie hamował opóźnioną nadwrażliwość skóry wywołaną dinitrofluorobenzenem i zapalenie skóry wywołane imikwimodem (lek z grupy aminochinolin stosowany w leczeniu niektórych chorób skóry). Jednakże, konieczne jest przeprowadzenie dodatkowych badań w celu określenia zależności struktura-aktywność, by wtórnie spróbować znaleźć zastosowanie tego związku w immunoterapii [153].

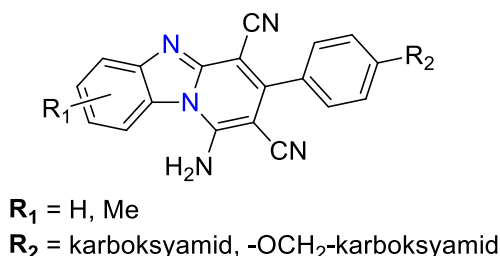
4.3.4. Benzimidazole

Układ immunologiczny funkcjonuje w oparciu o komórki, takie jak: cytotoksyczne limfocyty T (ang. *cytotoxic T lymphocytes*, CTLs) i NK (ang. *natural killers*), których aktywność zapewnia zbalansowaną odpowiedź immunologiczną. Komórki te wykorzystują proces zwany

egzocytozą ziarnową (ang. *granule exocytosis*), czyli mechanizm umożliwiający gwałtowne uwolnienie specyficznych cząsteczek w celu wyeliminowania komórek zarażonych wirusem, bądź komórek rakowych. W momencie ich kontaktu z CTLs, bądź NK, tworzy się struktura zwana synapsą immunologiczną. W jej ramach obserwuje się transport ziaren wydzielniczych (ang. *secretory granules*) do powierzchni komórki układu odpornościowego i uwolnienie magazynowanych w niej związków do przestrzeni synaptycznej. To zjawisko wystawia błonę komórki docelowej (eliminowanej) na działanie dwóch klas substancji: perforyn (związki z klasy glikoprotein), które tworzą pory w kształcie łuku lub pierścienia, oraz granzymów, grupy proteaz serynowych. Wspólnie skutecznie niszczą one chore komórki indukując apoptozę [154].

Perforyny odgrywają istotną rolę w egzocytozie ziarnowej poprzez tworzenie kanalików w błonie komórki. Pory te zaburzają równowagę osmotyczną, pozwalając drugiej klasie substancji — granzymom — na migrację w głąb komórki i zainicjowanie procesu apoptozy. Co istotne, w mechanizmie tym obie strony synapsy immunologicznej wyeksponowane są na perforynę, jednak tylko błona niepożądanego komórki jest przerywana. W efekcie, CTLs i NK mogą szybko unicestwić wiele komórek docelowych, bez szkody dla efektorów. Sugeruje się, iż powyższa odpowiedź immunologiczna zostaje całkowicie odtworzona po usunięciu chorych komórek, wskazując na odwracalny charakter inhibicji perforyny przez niektóre, zbadane związki małowcząsteczkowe. Obieranie perforyny za cel molekularny wydaje się być obiecującą strategią w projektowaniu nowych klas związków o charakterze immunosupresyjnym, czy ogólnie — immunomodulującym, ze względu na jej zdolność regulacji odpowiedzi immunologicznej [154].

1-amino-2,4-dicyjanopirydo[1,2-a]benzo[d]imidazole



Rys. 4. Wybrane pochodne skondensowane benzimidazolu

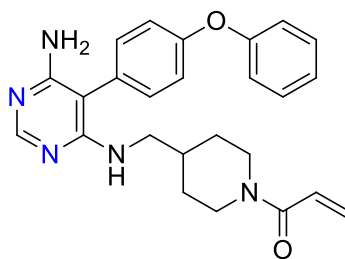
Seria skondensowanych pochodnych benzimidazolu została przebadana na aktywowanej linii komórek T-Jurkat wzbogaconych radioizotopem ^{51}Cr , pod kątem stopnia uwalniania tego pierwiastka. W obecności inhibitorów perforyny zjawisko to zachodzi wolniej. Zmierzono współczynnik IC_{50} dla 30 pochodnych i jednego wzorca, gdzie najniższą wartość osiągnięto dla pochodnej z podstawnikiem $-\text{CONHMe}$ i wynosiła ona $1,04 \mu\text{M}$ ($0,97 \mu\text{M}$ dla wzorca). Następnie, w celu urzeczywistnienia warunków działania perforyny, przeprowadzono testy *in vitro* dla badanych substancji w układzie efektor-cel, w stosunku 2:1. Rolę efektorów pełni linia komórek KHYG-1 (równoważnik NK), zaś celu — linia komórek K562 (białaczka szpikowa). W efekcie, zmierzona została specyficzność lizy dla tego układu (określana z wykorzystaniem tego samego radioizotopu), a także przeżywalność komórek KHYG-1 (test kolorymetryczny

oparty na błękanie trypanowym), odzwierciedlająca cytotoksyczność badanych związków wobec równoważnika NK. Niektóre z nich dobrze hamowały lityczną aktywność perforyny uwalnianej przez komórki typu NK (KHYG-1), w nietoksycznych dla nich stężeniach, chociaż trudno jest ją skorelować z bioaktywnością wobec linii komórek T-Jurkat, gdyż układy te w innym stopniu reprezentują aktywność tej glikoproteiny [155].

4.3.5. Pirymidyny

Stwardnienie rozsiane (ang. *multiple sclerosis*, MS) to powszechnie spotykana choroba autoimmunologiczna, przeważnie u młodych osób dorosłych, która często prowadzi do niepełnosprawności neurologicznej. Cechą charakterystyczną tego schorzenia są występujące procesy zapalne, utrata warstwy ochronnej włókien nerwowych, nadprodukcja komórek mózgu (neuronów i komórek glejowych), a także uszkodzenie nerwów. Choroba ta atakuje przede wszystkim ośrodkowy układ nerwowy (OUN), nie obciążając jednak tak silnie obwodowego układu nerwowego. Występuje głównie w dwóch typach: nawracającej i postępującej, oraz w ich kombinacji, gdzie najczęściej spotykaną jest forma postępująca MS. Ta ostatnia obejmuje epizody nasilenia schorzeń neurologicznych, po których następują okresy częściowego, bądź całkowitego wyzdrowienia. Z biegiem czasu, epizody te stają się rzadsze, ale stan ogólnie się pogarsza, co prowadzi do nieprzerwanego postępu choroby. Każdy z typów MS współdzieli tę samą etiologię, która oparta jest na procesach zapalnych i degradacji zakończeń nerwowych, niezależnie od etapu choroby u pacjentów [156].

Kinaza tyrozynowa Brutona (ang. *Bruton's tyrosine kinase*, BTK) jest białkiem występującym w limfocytach B, makrofagach i mikrogleju, czyli wyspecjalizowanych komórkach OUN, które odpowiadają za regulację procesów zapalnych i naprawę tkanek. Podwyższony poziom BTK obserwuje się w limfocytach B pacjentów z rzutowo-remisyjną i wtórnie-postępującą postacią MS, a także w mikrogleju w obrębie postępujących zmian w MS. Dzięki temu, BTK może stanowić istotny cel molekularny w terapiach chorób autoimmunologicznych takich jak: MS, reumatoidalne zapalenie stawów (RZS), czy toczeń rumieniowaty układowy [157].



Evobrutinib

Rys. 5. Wzór strukturalny ewobrutynibu

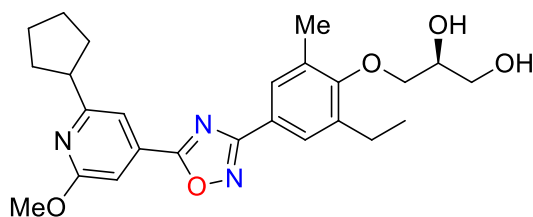
Evobrutinib (pol. ewobrutynib) jest lekiem przyjmowanym doustnie, którego aktywność związana jest z inhibicją BTK i zdolnością do migrowania w OUN. Znajduje się obecnie w fazie III badań klinicznych, jako lek na MS. Ponadto, wcześniej był również testowany w fazie II badań

klinicznych pod kątem RZS i toczenia rumieniowatego układowego, będąc dobrze tolerowalnym przez pacjentów, u których nie zaobserwowano efektów ubocznych zależnych od dawki. Analiza bezpieczeństwa leku, przeprowadzona na dużej bazie danych obejmującej ponad 1000 pacjentów, którzy uczestniczyli w trzech badaniach II fazy dotyczących różnych chorób autoimmunologicznych, potwierdziła, że ewobrutynib jest dobrze tolerowany przez pacjentów z MS, RZS i toczeniem rumieniowatym układowym. Odkrycia te mogą pomóc w lepszym zrozumieniu profilu bezpieczeństwa ewobrutynibu i poprzeć jego dalszy rozwój w leczeniu MS, w tym trwające badania III fazy [157].

4.3.6. 1,2,4-Oksadiazole

Toczeń rumieniowaty układowy (ang. *systemic lupus erythematosus*, SLE) to choroba autoimmunologiczna, w której obserwuje się wytwarzanie szkodliwych auto-przeciwciał, migrację i akumulację (wnikanie) limfocytów do układów, w których normalnie się ich nie spotyka, a także uszkodzenie tkanek wielu narządów. Zarówno limfocyty B, jak i T, pełnią istotną rolę w rozwoju tego schorzenia. Limfocyty T nie tylko bezpośrednio przyczyniają się do uszkodzenia narządów, ale także wspomagają aktywację i wzrost limfocytów B, które to są odpowiedzialne za produkcję auto-przeciwciał. Do limfocytów B wytwarzających auto-przeciwciała, znanych jako komórki wydzielające przeciwciała (ASC), zaliczają się proliferujące plazmocyty i komórki plazmatyczne. ASC, będące głównymi komórkami efektorami w chorobach autoimmunologicznych, są ściśle związane z aktywnością SLE [158].

Podstawowym czynnikiem odpowiedzialnym za przemieszczanie się limfocytów z obwodowych narządów limfatycznych do krążenia limfatycznego i naczyniowego jest gradient chemotaktyczny (ukierunkowana reakcja ruchowa układu w kierunku gradientu chemicznego bodźca) sfingozyno-1-fosforanu (S1P). Ten sfingolipid o wysokiej aktywności biologicznej, wiąże się z receptorami S1P1 na limfocytach B i T. Środki modyfikujące ten receptor zostały zatwierdzone w leczeniu MS i dają pozytywne wyniki w przypadku innych chorób, co podkreśla ich znaczenie w projektowaniu terapii chorób autoimmunologicznych. Zablokowanie aktywacji receptorów S1P1 na powierzchni limfocytów uniemożliwia ich efektywne wydostawanie się z węzłów chłonnych i w konsekwencji — ich migrację do tkanek objętych stanem zapalnym. Sytuacja ta prowadzi do osłabienia ogólnej i tkankowej odpowiedzi immunologicznej, i zahamowania stanu zapalnego, poprzez zmniejszenie liczby aktywnych limfocytów w organizmie. Mechanizm ten można wykorzystać do kontrolowania postępu choroby i przeciwdziałania skutkom SLE [158].



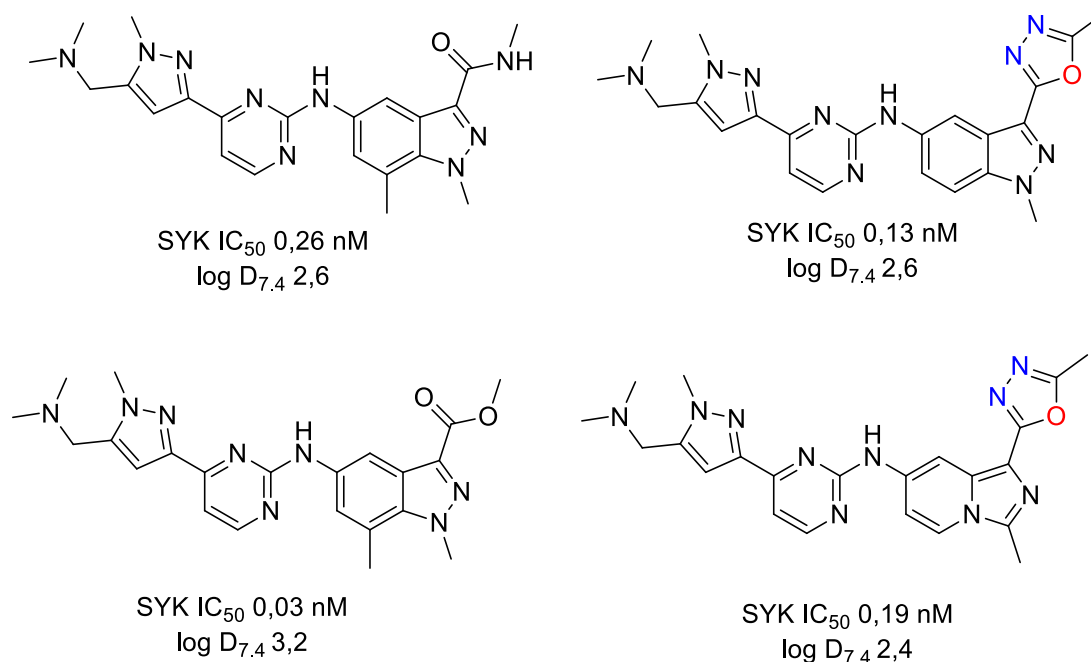
Cenerimod

Rys. 6. Wzór strukturalny cenerimodu

Cenerimod, lek przechodzący obecnie badania kliniczne III fazy [159], wykazał zdolność do zmniejszania liczby limfocytów we krwi u myszy, co doprowadziło do redukcji gromadzących się w tkankach komórek odpornościowych, poprawy ogólnego stanu tkanek, ograniczenia obecności białka w moczu i wygaszenia stanów zapalnych. W efekcie, myszy potraktowane tym związkiem cechował poprawiony stan ogólny zdrowia i wyższa przeżywalność. Cenerimod efektywnie promuje internalizację receptorów S1P1 w limfocytach, zarówno u osób zdrowych, jak i chorych na SLE [159].

4.3.7. 1,3,4-Oksadiazole

Kinaza tyrozynowa śledzionowa (ang. *spleen tyrosine kinase*, SYK) stanowi istotny składnik szlaku sygnałowego komórek układu odpornościowego poprzez rozmaite receptory w nich zawarte, w tym receptor limfocyta B (ang. *B cell receptor*, BCR), receptor Fc (FcR) i integrynę $\beta 2$. Inhibicja, bądź całkowite usunięcie SYK, ma wyraźnie negatywny wpływ na układ immunologiczny, ponieważ białko to jest ściśle związane z rozwojem, aktywacją i dojrzewaniem limfocytów B, a także z produkowaniem i zmianą typu (klasy) przeciwciał. Rozregulowanie pracy SYK obserwuje się u pacjentów z SLE i z toczniowym zapaleniem nerek (ang. *lupus nephritis*, LN), które jest nerkową odmianą SLE charakteryzującą się odkładaniem komórek odpowiedzialnych za ekspresję SYK w nefronach. Choć inhibitory SYK były badane na modelach zwierzęcych tocznia, żadne z nich nie były poddane badaniom klinicznym angażującym pacjentów z SLE lub LN [160].



Rys. 7. Wybrane pochodne 1,3,4-oksadiazolu, ich aktywność enzymatyczna i specyficzny parametr podziału

Przeprowadzono szereg badań mających na celu optymalizację czasu półtrwania serii 1-metyloindazoli (i kilku ich benzimidazolowych odpowiedników) w ustroju. Dokonano tego poprzez modyfikacje strukturalne pozycji trzeciej w tym heterocyklu. Ogólny zamysł dotyczył strategii obniżania wartości parametru log D (odpowiednik znanego parametru log P, w którym hydrofilnym układem odniesienia nie jest woda, a roztwór o zadanej wartości pH, np. 7,4, które odpowiada fizjologicznej wartości pH surowicy krwi) w celu poprawy stabilności metabolicznej nowych pochodnych. Zmianę we właściwościach biologicznych rejestrowano między innymi przy pomocy testu enzymatycznego Omnia (metoda fluorescencyjna określania aktywności 112 rodzajów kinaz proteinowych), a także testów komórkowych na liniach komórek ludzkiego chłoniaka, SU-DHL-4, które są modelem nieprawidłowego działania limfocytów B. Na szczególną uwagę zasługują dwie pochodne oparte na rdzeniu 1,3,4-oksadiazolu, które dzięki zastosowaniu metodologii podstawienia bioizosterycznego osiągnęły lepszą aktywność enzymatyczną, wyrażoną jako SYK IC₅₀, niż odpowiedniki estrowe i *N*-metylokarboksamidowe, wyższą stabilność hydrolityczną niż odpowiednik estrowy, a także odpowiednio niższe (bądź zbieżne) wartości log D_{7.4} i odpowiednio wysoką aktywność komórkową. Choć osiągnięcie wyższej hydrofilności cząsteczki jest możliwe dzięki zastosowaniu przedstawionych w publikacji modyfikacji strukturalnych, to nie wpływa to bezpośrednio na aktywność w ustroju. Przeprowadzone, dodatkowe badania na myszach i szczurach wykazały, że związki te są słabo przez nie przyswajalne [161].

Jest to przykład podstawienia bioizosterycznego, które poprawiło aktywność enzymatyczną *in vitro* i pozwoliło na manipulowanie lipofilnością cząsteczek, co dobrze wpisuje się w tematykę tej pracy i stanowi nieocenione narzędzie przy projektowaniu leków w chemii medycznej.

5. Deacetylasy histonowe (HDACs)

W niniejszym rozdziale została przedstawiona ogólna charakterystyka klasy enzymów jaką są deacetylasy histonowe (ang. *histone deacetylases*, HDACs). Przytoczone zostały informacje ogólne, podział, a także mechanizmy działania, uzupełnione o szczególny przypadek dualnej inhibicji oraz przykłady znanych inhibitorów. Część informacji została podsumowana w formie tabeli, po części teoretycznej (**Tabela 1**).

Istotą tego rozdziału jest zaprezentowanie, w możliwie jak najbardziej przystępny sposób, inhibicji HDACs, jako istotnego mechanizmu w walce z chorobami nowotworowymi, która może stanowić podstawę funkcjonowania nowych pochodnych **MPA**, o odpowiednio zmodyfikowanej strukturze, tu: pochodnych bioizosterycznych.

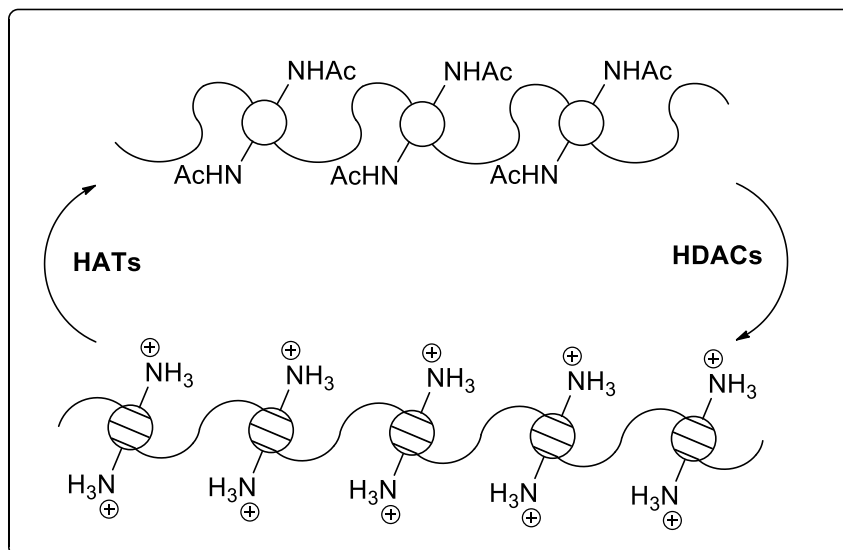
5.1. Informacje ogólne

Zmiany ekspresji genów oparte o mechanizmy epigenetyczne (czyli takie, które nie wiążą się ze zmianą sekwencji nukleotydów) są niezwykle istotne z punktu widzenia regulowania procesów biologicznych. HDACs to grupa enzymów stanowiąca kluczowy składnik tej epigenetycznej maszyneryi molekularnej, niezwykle istotna w procesach przebudowywania chromatyny (główny składnik chromosomów) i kontroli ekspresji genów. Taka aktywność przekłada się na właściwości korepresorowe (ang. *corepressors*), czyli takie, które hamują ekspresję genów na drodze, na przykład, wiązania się z czynnikiem transkrypcyjnym. Zgoła odmienne funkcje pełnią acetylotransferazy histonowe (ang. *histone acetyltransferases*, HATs) mając właściwości koaktywatorowe (ang. *coactivators*), pełniąc tym samym, w pewnym zakresie, funkcje przeciwne do HDACs. Ustalenie równowagi pomiędzy tymi dwoma grupami enzymów stanowi podstawę epigenetycznej regulacji ekspresji genów.

Białka wiążące ugrupowania metylowane (ang. *methyl-binding proteins*, MBPs; rodzina białek jądrowych ściśle związana z metylowaniem DNA) łączą się z metylowanym DNA poprzez: rozpoznanie i późniejsze podłączenie do konkretnych metylowanych cytozyn w ramach struktury DNA. Procesy korepresorowe rozpoczynają się właśnie od działania tego typu czynników białek (ang. *protein readers*; białka zbudowane z domen zdolnych do specyficznej interakcji z określonymi grupami funkcyjnymi), przyciągając w ten sposób HDACs i biegnąc z ich udziałem. Przyciąganie to następuje poprzez rozpoznanie konkretnych modyfikacji chemicznych na histonach (białka zasadowe, będące częścią chromatyny, o charakterze kationowym). HDACs zdolne są do usuwania grupy acetylowej z ϵ -NH₂ reszt lizyny na ogonach histonów. To deacetylowanie wzmacnia wiązanie pomiędzy dodatnio naładowanymi histonami i ujemnie naładowanym DNA, powodując gęstsze upakowanie chromatyny. W rezultacie następuje zagęszczenie w ramach jej struktury, prowadząc do zahamowania transkrypcji.

W opozycji do aktywności HDACs znajdują się HATs. przenosząc grupy acetylowe na *N*-terminalne reszty lizyny w histonie, powodując rozkurczenie struktury chromatyny, zwiększając dostępności białek regulatorowych do DNA i umożliwiając transkrypcję. Aktywności tych obu enzymów przedstawiono na **Schemacie 53**.

REGULOWANIE UPAKOWANIA CHROMATYNY



Schemat 53. Graficzna reprezentacja regulacji upakowania chromatyny

Wszelkie zmiany w upakowaniu struktury chromatyny, wynikające z: inhibicji HATs, nadekspresji HDACs oraz epigenetycznych zmian w procesie metylowania DNA, mogą stanowić zarzewie wielu chorób. Z tego powodu, HDACs są obiecującym celem molekularnym, ważnym w opracowywaniu nowoczesnych terapii dla szerokiej gamy chorób, a postępy w rozwoju inhibitorów HDACs jest obserwowany w literaturze [162].

5.2. Podział HDACs

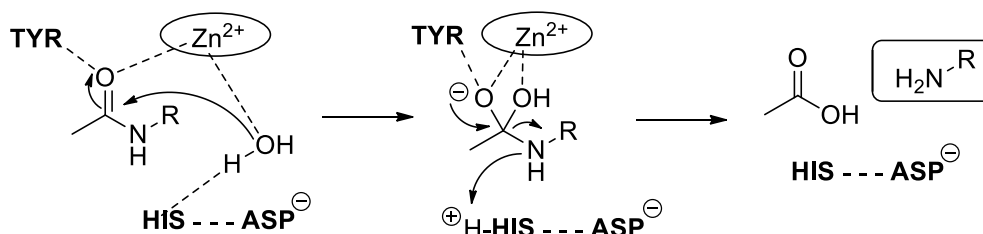
Wyróżnia się 18 typów HDACs, gdzie każdy z nich przynależy albo do grupy typowo cynkozależnych enzymów, albo NAD-zależnych sirtuin. W ogólnym ujęciu, HDACs podzielono na pięć klas: I, IIa, IIb, III, IV, gdzie każda z nich różni się charakterystyczną dla siebie sekwencją homologiczną (choć to ten sam rodzaj enzymów, różnią się one sekwencją genów je kodujących), miejscem występowania (jądro komórkowe, cytoplazma, mitochondrium), aktywnością enzymatyczną i specyficznością substratu. Do grupy cynkozależnej zalicza się klasę I, IIa, IIb oraz IV, zaś do grupy NAD-zależnej — klasę III. Do klasy I przynależą: HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8, do klasy IIa — HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9, IIb — HDAC6 i HDAC10, zaś do klasy IV — HDAC11. Klasa III mieści w sobie enzymy zwane sirtuinami, posiadającymi jony cynku niepełniące funkcji katalitycznych i zależne w swej aktywności enzymatycznej od NAD⁺. Wyróżnia się sirtuiny o symbolach pomiędzy SIRT1 a SIRT7 [162].

Klasa I HDACs to enzymy spotykane przeważnie w jądrze komórkowym, o znacznej zdolności do deacetylowania białek. Grają kluczową rolę w hamowaniu transkrypcji genów poprzez tworzenie kompleksów z cząsteczkami korepresorowymi, lecz także zdolne są do oddziaływania z białkami nie-histonowymi, wpływając na szereg procesów komórkowych. HDACs klasy IIa mają niską zdolność do deacetylowania i oddziałują z czynnikami transkrypcyjnymi. Mogą tworzyć kompleksy z HDAC3. Ich rola nie została do końca poznana (2020). Klasa IIb odnosi się do enzymów przeważnie spotykanych w cytoplazmie, zdolnych do deacetylowania



substratów nie-histonowych, np. tubulin, z HDAC6 odgrywającym swą szczególną rolę w procesie autofagii i metabolizmu. Klasa IV łączy w sobie cechy charakterystyczne dla klasy I i II, i jest głównie kojarzona z odpowiedzią immunologiczną i procesem replikacji DNA. Klasa III, czyli sirtuiny, wiązane są z regulowaniem metabolizmu i odpowiedzi ustroju na stres [163].

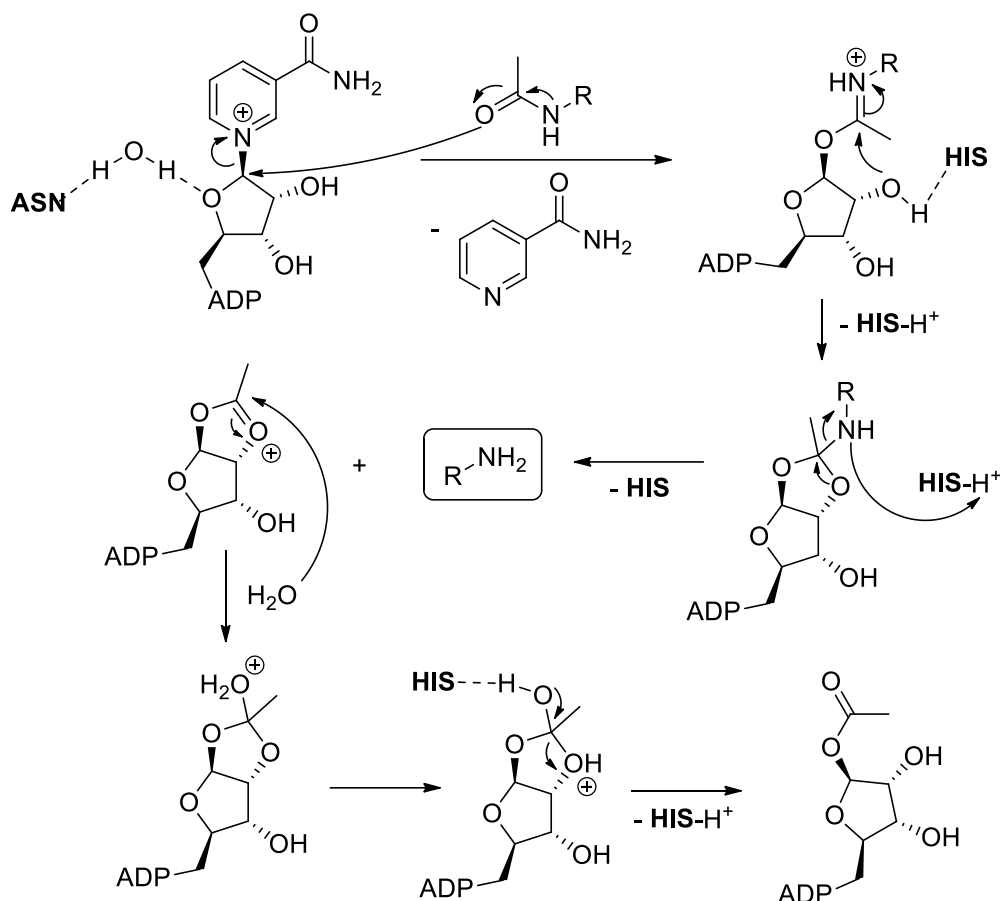
5.3. Ogólny mechanizm działania HDACs



Schemat 54. Prawdopodobny mechanizm deacetylowania z wykorzystaniem HDAC klasy I, II i IV

Dla klas I, II oraz IV, opartych o aktywność jonu cynku, notuje się mechanizm, w którym w miejscu aktywnym enzymu, jon tego metalu jest stabilizowany przez jedną resztę histydynową, dwie asparaginianowe i dwie cząsteczki wody. W czasie reakcji katalitycznej, *N*-acetamidowe ugrupowanie acylowanej lizyny wypiera jedną cząsteczkę wody, co skutkuje powstaniem wiązania wodorowego z resztą tyrozynową enzymu. Ta ostatnia, zdolna jest do ulegania zmianom konformacyjnym, umożliwiając wiązanie substratu w miejscu aktywnym. Przy takim ułożeniu, histydyna zdolna jest do deprotonowania wody w układzie histydyna-asparaginian (o znacznym podobieństwie mechanizmu działania do triady katalitycznej obserwowanej w aktywności chymotrypsyny), znanym ze zdolności do polaryzowania wody i podwyższania jej zdolności nukleofilowych. Dwie reszty histydynowe, zlokalizowane w centrum aktywnym, znajdują się obok siebie, a jedna z nich odpowiada za aktywujące efekty elektrostatyczne w stosunku do cząsteczki wody, zaś druga — do typowej reakcji kwas-zasada.

Mechanizm, po deprotonowaniu wody, zakłada substytucję nukleofilową w układzie acylowym, w której rolę nukleofila pełni anion hydroksylowy, zaś elektrofila — grupa acetylowa. Rozpad przejściowego produktu tetraedycznego prowadzi do wydzielenia reszty octanowej i *N*-terminalnej reszty lizynowej. W odniesieniu do wspomnianej wcześniej niskiej zdolności enzymów klasy IIa do deacetylowania, warto zauważyć, że w tej grupie metaloenzymów reszta tyrozynowa została zastąpiona resztą histydynową, co wyraźnie wpływa na ich aktywność enzymatyczną [163, 164]. Mechanizm tej przemiany został przedstawiony powyżej na **Schemacie 54**.



Schemat 55. Prawdopodobny mechanizm deacetylowania z wykorzystaniem HDAC klasy III (sirtuiny)

W ramach katalizy enzymami z grupy sirtuin (HDACs klasy III), obserwuje się występowanie szczeliny katalitycznej zlokalizowanej pomiędzy domeną wiążącą jon cynku a domeną Rossmanna (motyw strukturalny białek, który służy do wiązania nukleotydów). W tej rodzinie enzymów, otoczenie aminokwasowe wyścielające szczelinę katalityczną jest zakonserwowane, pozwalając na dogodne oddziaływanie z NAD⁺ oraz szerokiej gamy substratami (np. acetylowane, bądź malonylowane lizyny). Sugeruje się, iż mechanizm tej reakcji rozpoczyna się od ataku nukleofilowego atomu tlenu w grupie acetylowej substratu na atom węgla C1' NAD⁺, z jednoczesną eliminacją nikotynamidu. Powstały iminoester, o charakterze kationowym, ulega następnie atakowi nukleofilowemu grupy hydroksylowej znajdującej się przy atomie węgla C2'. Przemianę tę katalizuje reszta histydynowa obecna w miejscu aktywnym. 1',2'-Cykliczny intermediat podatny jest na katalizowaną resztą histydynową hydrolizę, z wydzieleniem deacetylowanego substratu i 2'-O-acetylowanej pochodnej rybozy [163, 164]. Mechanizm tej przemiany pokazany jest na **Schemacie 55**.

5.4. Zestawienie informacji o HDACs

Tabela 1. Zbiór podstawowych informacji na temat HDACs [165]					
	Klasa I	Klasa IIa	Klasa IIb	Klasa III	Klasa IV
Elementy grupy	HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8	HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9	HDAC6, HDAC10	SIRT1-SIRT7	HDAC11
Umiejscowienie w ustroju	jądro komórkowe	jądro komórkowe, cytoplazma	jądro komórkowe, cytoplazma	jądro komórkowe, cytoplazma, mitochondrium	jądro komórkowe
Substraty	histony, Stat3, Bcl-6, p53, E2F-1	histony, HP-1, GATA-1, Smad7	histony, α -tubulina, Hsp90, Smad7	p53, NF-kB, POLB, Pol I, TAF, tubulina	czynniki powiązane z białkiem Rpd3
Znane inhibitory	abeksinostat, belinostat, entinostat, mocetinostat, panobinostat, fenylomaślan sodu, romidepsyna, kwas walproinowy, worynostat	abeksinostat, belinostat, panobinostat, fenylomaślan sodu, kwas walproinowy, worynostat	abeksinostat, belinostat, panobinostat, ricolinostat, worynostat	nikotynamidy	abeksinostat, belinostat, panobinostat, worynostat

5.5. Dualna inhibicja HDAC6-Hsp90

HDAC6, znany również jako deacetylaza histonowa typu 6, jest głównym czynnikiem regulującym procesy acetylowania mikrotubul. Odpowiada nie tylko za proces deacetylacji histonów, ale także białek nie-histonowych, czym różni się od innych HDACs. Odgrywa znaczącą rolę w regulacji transkrypcji i progresji cyklu komórkowego. Jego nadekspresja i przerwana integralność funkcjonalna mogą prowadzić do rozwoju niektórych typów nowotworów. Aktywność HDAC6 może mieć wpływ na ekspresję genów niektórych istotnych czynników układu odpornościowego i tych związanych z apoptozą, czyniąc go tym samym interesującym celem w immunoterapii nowotworów [166].

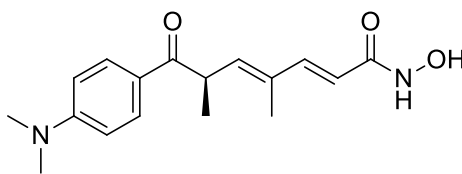
Hsp90 (ang. *heat shock protein 90*) to białko szoku cieplnego, przynależące do klasy białek chaperonowych (opiekuńczych). Odpowiedzialne jest za: prawidłowe fałdowanie, stabilizację po szoku cieplnym i wspomaganie degradacji białek obecnych w komórkach, gdzie wszystkie te procesy są związane z żywotnością komórek. Hsp90 odgrywa ważną rolę w przeżyciu i wzroście chorych komórek, zarówno w warunkach normalnych, jak i stresowych. Stres środowiskowy komórek nowotworowych, taki jak kwasica, niedotlenienie i zubożenie w składniki odżywcze, zwiększa zapotrzebowanie na Hsp90, aby dostosować komórkę do niesprzyjających warunków. Hsp90 umożliwia zmutowanym białkom zachowanie lub uzyskanie nowych funkcji, tym samym zwiększając tolerancję komórek nowotworowych na warunki otoczenia i w ten sposób unikając śmierci apoptotycznej. Kompleksy inhibitorów Hsp90 mogą być selektywnie wchłaniane w komórkach nowotworowych, służąc w ten sposób jako narzędzie do walki z procesami nowotworzenia [167].

Aktywności HDAC6 i Hsp90 są ściśle ze sobą powiązane, ponieważ Hsp90 jest substratem HDAC6, obok innych białek cytozolowych. Pomimo tego, że główna rola HDAC6 w komórkach nowotworowych związana jest z przebudową chromatyny i ekspresją genów, Hsp90 pozostaje jednym z jego celów molekularnych, mogąc być zdeacetylowanym, a tym samym aktywowany przez ten enzym. Inhibicja HDAC6 prowadzi do wzrostu poziomu acetylowanego Hsp90, co zahamowuje tworzenie stabilnych kompleksów Hsp90 z innymi białkami. Aktywność ta modyfikuje intensywność nowotworzenia i procesy metastazy, co może służyć jako dostosowana strategia w opracowywaniu leków przeciwnowotworowych [168].

5.6. Inhibitory HDACs

Małocząsteczkowe inhibitory HDACs można podzielić na cztery podstawowe kategorie: kwasy hydroksamowe, krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, benzamidy oraz peptydy cykliczne. Najlepiej poznana i przebadana klasa są pochodne kwasów hydroksamowych. Inhibitory przynależące do tej klasy, w tym trichostatyna A (ang. *trichostatin A*, TSA) oraz worynostat (ang. *suberoylanilide hydroxamic acid*, SAHA), w centrum aktywnym lokują swój długi łańcuch alifatyczny w poddomenie zwanej białkiem podobnym do deacetylaz histonowych (ang. *histone deacetylase-like protein*, HDLP), w kształcie kieszeni, blokując tym samym dostęp substratów. Grupa hydroksamowa jest zdolna do wiązania jonów cynku tworząc bidentne kompleksy z wykorzystaniem grupy karbonylowej oraz hydroksylowej. Ponadto, ugrupowanie to zdolne jest do formowania wiązań wodorowych z podjednostkami histydyny i tyrozyny, wypierając przez to wodę konstytucyjną w enzymie, w miejscu występowania jonu cynku. Układ aromatyczny w tego typu inhibitorach styka się z resztami aminokwasowymi na obrzeżu kieszeni, oddziałuje z nimi, umożliwiając tym samym zamknięcie inhibitora wewnątrz niej. Pochodne typu benzamidowego w podobny sposób chelatują jon cynku, tym razem z wykorzystaniem grupy karbonylowej oraz funkcji aminowej w łańcuchu bocznym. Sugeruje się, iż związki te wykazują zależną od czasu zdolność do inhibicji HDACs, tworząc niestabilne, upakowane struktury. Ostatnia klasa inhibitorów — peptydy cykliczne — działa przeważnie na drodze silnego oddziaływania siarka-jon cynku, korzystając z wolnych, aktywnych grup tiolowych cysteiny, a także wielu oddziaływań stabilizujących, wynikających ze struktury aminokwasowej [164]. Poniżej, w formie punktów rozdziału, przedstawiono trzy istotne inhibitory HDACs, o dużym znaczeniu w badaniach podstawowych, jak i w praktyce klinicznej.

5.6.1. Trichostatyna A (TSA)



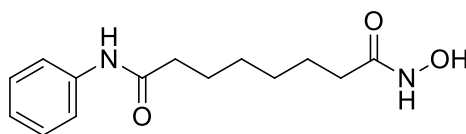
Rysunek 31. Wzór strukturalny trichostatyny A (TSA)

Trichostatyna A (**Rysunek 31**) to związek wykazujący właściwości przeciwgrzybowe, uzyskiwany na drodze fermentacji, izolowany wraz ze swymi kongenerami — trichostatyną B oraz *D*-glukopiranozydami — trichostatyną C i D. Jest czynny optycznie, a jego izomer R ((*R*)-TSA) był pierwszym zidentyfikowanym, selektywnym i odwracalnym inhibitorem HDACs. Dzięki zdolności do modyfikowania ekspresji genów, może znaleźć zastosowanie w zwalczaniu procesów nowotworowych. Inhibicja HDACs powoduje nadmierne zacetylowanie histonów, co w efekcie prowadzi do aktywacji genów regulujących zatrzymanie cyklu komórkowego, różnicowanie i apoptozę w komórkach nowotworowych. TSA efektywnie hamuje wzrost komórek nowotworowych, w stężeniach nanomolowych, nie wpływając nadto na zdrowe komórki, przez co stanowi podstawę pod projektowanie nowych leków przeciwnowotworowych, o możliwie mniejszej liczbie skutków ubocznych w porównaniu ze swoimi silniej cytotoksycznymi odpowiednikami.

Aktywność przeciwnowotworowa TSA możliwa jest poprzez kilka różnych mechanizmów. Jednym z nich jest zdolność do zwiększania poziomu białek takich jak p21WAF1/Cip1 (ang. *cyclin-dependent kinase inhibitor 1*; białko hamujące cykl komórkowy, regulujące podział komórek i działające jako mechanizm ochronny umożliwiający naprawę DNA przed jego replikacją lub inicjujące proces apoptozy w przypadku nieodwracalnych uszkodzeń), które zatrzymują wzrost komórek w pewnym stadium rozwoju (faza G1 i G2 cyklu życia komórkowego), powodując ich śmierć na drodze podniesienia poziomu genów proapoptotycznych, takich jak Bax (ang. *Bcl-2-associated X protein*; białko proapoptotyczne promujące obumieranie komórek poprzez tworzenie porów w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, prowadząc do aktywacji kaskady enzymów zwanych kaspazami), przy jednoczesnym obniżeniu poziomu białek antyapoptotycznych, takich jak Bcl-2 (ang. *B-cell lymphoma 2*; białko antyapoptotyczne hamujące aktywację kaskady kaspaz). TSA zdolna jest do modyfikowania struktury chromatyny, co w efekcie prowadzi do blokowania wzrostu komórek, dzięki czemu może okazać się skuteczny w leczeniu nowotworów, takich jak rak wątroby, okrężnicy i żołądka.

Pomimo wielu przesłanek literaturowych oraz dobrych wyników osiąganych w testach *in vitro*, TSA obarczona jest pewną pulą ograniczeń natury metabolicznej oraz fizykochemicznej. Związek ten ulega szybkiemu metabolizmowi w nerkach i wątrobie, w modelu zwierzęcym, co istotnie ogranicza jego biodostępność. Dodatkowo, obserwuje się jego niską rozpuszczalność w wodzie. Niemniej jednak, cząsteczka ta ma wysoki potencjał aplikacyjny, a zakres jego zastosowań nie ogranicza się jedynie do chorób nowotworowych [169].

5.6.2. Worynostat (SAHA)



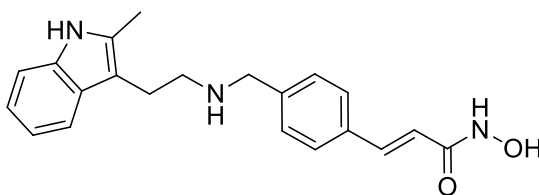
Rysunek 32. Wzór strukturalny worynostatu (SAHA)

Worynostat (**Rysunek 32**), znany również jako SAHA (ang. *suberoylanilide hydroxamic acid*, kwas suberaniłohydroksamowy), to inhibitor HDACs, który odgrywa kluczową rolę w terapii nowotworów, zwłaszcza w leczeniu chłoniaka skóry T-komórkowego (ang. *cutaneous T-cell lymphoma*, CTCL). Jest lekiem zatwierdzonym przez FDA. SAHA stosuje się, gdy CTCL utrzymuje się lub nawraca po innych terapiach. Jego mechanizm działania polega na hamowaniu enzymów HDAC klasy I i II, co prowadzi do akumulacji acetylowanych białek, w tym histonów, powodując różne efekty transkrypcyjne i nietranskrypcyjne. Wśród tych efektów wymienia się: regulację zatrzymania cyklu komórkowego, apoptozę i hamowanie angiogenezy, co czyni SAHA silnym środkiem cytostatycznym.

SAHA podaje się w dawce dobowej do 400 mg, w formie doustnej. W odniesieniu do farmakokinetyki, jego stężenie osiąmane w osoczu jest wprost proporcjonalne do przyjętej dawki, a czas półtrwania w ustroju mieści się w granicach 60 a 100 min. Nie wykazuje istotnych interakcji z innymi lekami, poza warfaryną i walproinianem sodu. Jego podstawowym metabolitem jest O-glukuronid SAHA, który ulega wydaleniu wraz z moczem. Przyjęcie SAHA wraz z pożywieniem zmniejsza negatywne efekty ze strony układu pokarmowego. Najczęstszymi skutkami ubocznymi po zażyciu są: zmęczenie, biegunka i nudności, a rzadziej — małopłytkowość i zatorowość płucna, choć raczej przy większej ilości.

Wykorzystanie SAHA wykracza poza zastosowanie kliniczne w CTCL jako, że jest badany pod kątem skuteczności w leczeniu innych nowotworów, takich jak rak prostaty, białaczka, rak piersi, czy glejak. Jego mechanizm działania może być również związany z wpływem na szlaki biochemiczne prowadzące do: zahamowania procesów powstawania nowotworu, apoptozy i wstrzymywania progresji (w tym metastazy). Wykorzystanie SAHA może być obiecujące w szerszych zastosowaniach onkologicznych, zarówno w terapiach jednoskładnikowych, jak i w farmakoterapii wielolekowej [170].

5.6.3. Panobinostat



Rysunek 33. Wzór strukturalny panobinostatu

Panobinostat (nazwa handlowa: Farydak) to kolejna pochodna zawierająca ugrupowanie kwasu hydroksamowego, będąca inhibitorem HDACs, stosowana głównie w terapii nowotworów (**Rysunek 33**). Działa poprzez modyfikowanie kilku mechanizmów komórkowych, w tym angiogenezy i odpowiedzi immunologicznych, tak kluczowych dla przeżycia komórek nowotworowych. W badaniach klinicznych panobinostat wykazał znaczną skuteczność w leczeniu nowotworów hematologicznych, takich jak CTCL i szpiczak mnogi (ang. *multiple myeloma*, MM). Stosowany w terapii wielolekowej wraz z bortezomibem i deksametazonem wykazał znaczną poprawę przeżycia wolnego od progresji (ang. *progression-free survival*, PFS) u pacjentów z nawrotowym lub opornym na leczenie MM, zwłaszcza tych, wcześniej leczonych samym bortezomibem. Jego stosowanie obciążone jest szeregiem skutków ubocznych, takich jak: trombocytopenia i kardiotoxyczność. W praktyce klinicznej, panobinostat stosuje się głównie u pacjentów, u których wystąpił nawrót choroby lub którzy są oporni na wielokrotnie podjęte, standardowe leczenie.

Mechanizm działania panobinostatu związany jest z hamowaniem HDACs, co wtórnie prowadzi do akumulacji acetylowanych histonów i białek niehistonowych, ostatecznie wpływając na ekspresję genów. Inhibicja ta może skutkować zatrzymaniem cyklu komórkowego, apoptozą i zmniejszoną proliferacją nowotworu. Badania przedkliniczne wykazały również, że panobinostat może hamować szlaki onkogenne i zwiększać wrażliwość komórek nowotworowych na chemioterapię. Ze względu na nieselektywność wiązania z HDACs (przez co jest znany jako *pan-HDAC inhibitor*) jest on ogólnie uznawany za silny inhibitor HDACs, choć o sporej toksyczności.

Pomimo sukcesu w leczeniu nowotworów hematologicznych, skuteczność panobinostatu w leczeniu guzów litych jest mniej zachęcająca. W badaniach I fazy z udziałem pacjentów z rakiem piersi i glejakiem, lek ten był skuteczny przede wszystkim w terapii skojarzonej. Choć w niektórych przypadkach przyczyniło się to do zmniejszenia guza i stabilizacji choroby, całkowite wyleczenie występowało rzadko. Wyniki te wskazują na potencjał panobinostatu w terapiach skojarzonych guzów litych, ale także podkreślają wyzwania spotykane w terapiach monolekowych [165].

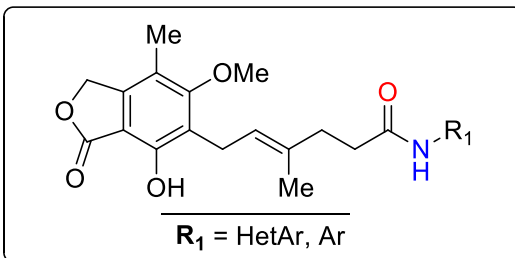
6. Dyskusja wyników

6.1. Uzasadnienie podjęcia tematu

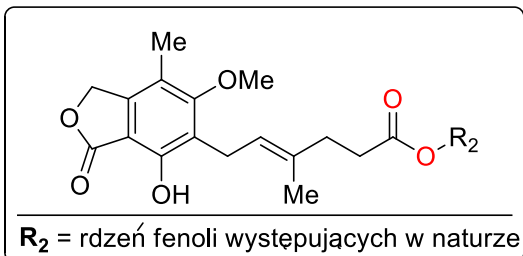
Dotychczasowe badania prowadzone w zespole dr. hab. inż. Grzegorza Cholewińskiego, w Katedrze Chemii Organicznej, opierają się na syntezie i określaniu właściwości biologicznych nowych pochodnych kwasu mykofenolowego (**MPA**). W swym sensie, zbieżne są z poszukiwaniem nowych proleków **MPA**, o zredukowanej cytotoksyczności, i ewentualnych, nowych bioaktywnościach. Redukcja ta miała być osiągnięta dzięki zmienionej farmakokinetyce projektowanych cząsteczek, z poszanowaniem zależności struktura-aktywność, niepozwalającej na znaczne modyfikacje strukturalne, jednak wprowadzającej pewną nowość do struktury związku. W praktyce, ograniczają się one do grupy estrów i amidów **MPA**, z dobudowanymi motywami strukturalnymi o samodzielnie potwierdzonych wartościach dodanych, bazując na źródłach literaturowych, lub o istotnym powinowactwie tych cząsteczek do struktury enzymu, w jego centrum aktywnym, opierając się na badaniach komputerowych.

Na podstawie postawionych celów badawczych, podjąłem pracę nad syntezą nowych pochodnych **MPA**, starając się otrzymać jak największą pulę związków, by pośród nich wyłonić cząsteczkę-kandydata, mogącą konkurować w aktywności immunosupresyjnej z **MPA**, a także wykazywać dodatkową bioaktywność, o potencjalnie korzystnym efekcie. Na podstawie wcześniej przedstawionego wstępu teoretycznego, podjąłem się znalezienia związków o możliwym charakterze immunosupresyjnym i przeciwnowotworowym. W toku prac, wyłoniłem trzy podstawowe grupy pochodnych: amidowe, estrowe oraz bioizosteryczne, a dyskusja nad ich syntezą, właściwościami biologicznymi i wynikami badań obliczeniowych, będzie prowadzona według tego porządku (**Schemat 56**).

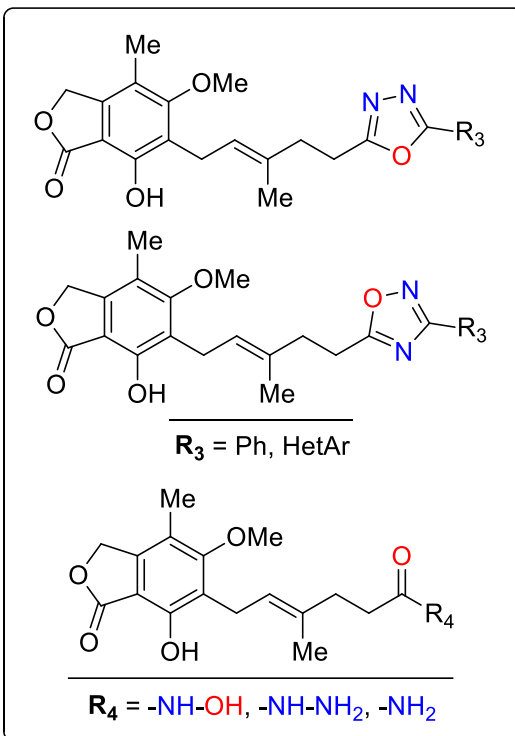
POCHODNE AMIDOWE



POCHODNE ESTROWE



POCHODNE BIOIZOSTERYCZNE



Schemat 56. Zestawienie pochodnych **MPA** omawianych w tej pracy doktorskiej

Związki heterocykliczne dzięki swym unikalnym właściwościom fizykochemicznym, a także występowaniu w zjawisku podstawienia bioizosterycznego, stanowią bazę pod nowe, amidowe pochodne **MPA**. Jak udowodniono na przykładzie koniugatu **MPA**-kwas chinowy, gdzie rolę łącznika pełnił mostek etylenodiaminowy, dobudowanie cząsteczki samodzielnie wykazującej korzystne właściwości biologiczne może spowodować obniżenie efektów toksycznych tej pierwszej, funkcjonalizowanej, lub nawet dostarczyć innych, korzystnych bioaktywności. Z racji, że wcześniej wymieniony koniugat posiada grupę amidową ze strony zarówno **MPA**, jak i kwasu chinowego, stanowi to pewną przesłankę literaturową na temat użyteczności tej klasy związków w nowych pochodnych **MPA**. Zgodnie z tym założeniem,

dobudowanie fragmentu heterocyklicznego do rdzenia **MPA** może wprowadzić do amidu efekty zarówno pochodzące od **MPA**, jak i od heterocykla. Motyw benzo[d]tiazolu, choć nie jest wiązany typowo z aktywnością immunosupresyjną, jest łatwo dostępny komercyjnie, możliwa jest jego prosta funkcjonalizacja, a także zmienia on drastycznie profil farmakokinetyczny cząsteczki. Benzo[d]oksazol, benz[d]-1*H*-imidazol, a także 1,3-diazyna to układy uzupełniające, które spełniają podobne założenia. W efekcie, możliwe jest określenie zależności struktura-aktywność dla tej grupy amidów **MPA**, która jest niezwykle istotna w procesie projektowania nowych leków.

Pewnym uzupełnieniem rozważań opartych o przegląd literatury jest dokowanie molekularne, które dzięki badaniu siły wiązania nowych ligandów z centrum aktywnym enzymu IMPDH II, odpowiedzialnego za immunosupresyjną aktywność **MPA**, może wskazywać na pewien potencjał immunosupresyjny projektowanych amidów **MPA**. W tym przypadku, siła wiązania mieściła się w granicach -9.5 a -8.7 kcal·mol⁻¹, gdzie dla wzorcowego **MPA** wynosiła ona -7.8 kcal·mol⁻¹. Ta przewaga, choć niewielka, również stanowi pewne potwierdzenie poczynionego założenia. Badanie to należy traktować z pewnym dystansem, gdyż oddziaływanie białko-ligand nigdy nie przedstawi pełnego obrazu interakcji między- i wewnątrzcząsteczkowych, które obecne są w układach rzeczywistych.

Związki fenolowe to istotna klasa cząsteczek spotykanych w naturze. Ich znaczenie rośnie wraz z rozwojem przemysłu kosmetycznego i farmaceutycznego, gdyż coraz bardziej dostrzegane są ich właściwości nutraceutyczne i adaptogenne. Warto zwrócić uwagę, iż często okazują się one być składnikami aktywnymi mieszanek ziół, które przez wieki były stosowane w medycynie ludowej, czy w Tradycyjnej Medycynie Chińskiej, co podkreśla naturalną, prozdrowotną konsekwencję ich stosowania przez ludzi i zwierzęta. Związki takie jak kurkumina, apigenina, czy resweratrol są w ostatnich latach intensywnie badane pod kątem właściwości przeciwzapalnych, przeciwutleniających, czy antybiotycznych. Rozdział poświęcony tego typu związkom stanowi przegląd literatury mający za zadanie zaznaczyć ich istotną bioaktywność i tym samym podkreślić potencjał wynikający z dobudowania ich do struktury **MPA**. Choć **MPA** nie ma jednoznacznie potwierdzonych właściwości przeciwutleniających, pomimo obecności wolnej grupy fenolowej w ramach jego struktury, to skoligowanie go z cząsteczkami wyraźnie wykazującymi ten charakter, może mieć korzystny wpływ na wypadkową aktywność biologiczną. Związki te są na ogół dobrze tolerowane przez organizm, dlatego założyłem, że nie powinny one wpływać negatywnie na jego dobrostan, przy jednoznacznie zmienionej farmakokinetyce projektowanych estrów **MPA**.

Ze względu na trudność w wyróżnieniu jednego celu molekularnego związanego z właściwościami przeciwutleniającymi, niemożliwe było przeprowadzenie badań komputerowych mogących poprzeć te założenia teoretyczne. Jest to spójne z obserwowanymi w literaturze trendami, które wskazują na testowanie projektowanych przeciwutleniaczy w warunkach rzeczywistych. Ten motyw badań biologicznych stanowi poszerzenie podstawowych właściwości immunosupresyjnych **MPA**, a być może również je tłumaczy, posiłkując się procesami redoks zachodzącymi w ustroju.

Podstawienie bioizosteryczne to termin niezwykle istotny dla nowoczesnej chemii medycznej. Jest to metoda pozwalająca na transformowanie pewnych grup funkcyjnych w inne, o podobnej charakterystyce fizykochemicznej i wypadkowej aktywności biologicznej. Przykładem takiej zamiany jest konwersja grupy amidowej w pochodną kwasu hydroksamowego, bądź układ 1,3,4-oksadiazolowy. Pod dyskusję można poddać jednokładność takiego przełożenia, jednak liczba sfunkcjonalizowanych cząsteczek i ich odpowiednio zachowana, lub zmieniona, bioaktywność, w sposób wystarczający przemawiają za stosowaniem takiej strategii. Transformowanie **MPA** w jego odpowiednik bioizosteryczny, z podłączonym układem 1,3,4-oksadiazolowym, bądź 1,2,4-oksadiazolowym, idealnie wpisuje się w tę koncepcję. Choć istnieje znaczne ryzyko utraty podstawowych właściwości **MPA**, ze względu na nieprostą drogę odzysku tej substancji w ustroju, w oparciu o metabolizm bioizosteru, możliwe jest zbadanie takiej klasy pochodnych pod kątem aktywności wobec deacetylaz histonowych (HDACs). Istotna zbieżność strukturalna takich bioizosterów z typowymi inhibitorami HDACs, dodatkowo racjonalizuje rozwój tematyki w tym kierunku. Ponadto, w literaturze odnotowano przypadek metabolizmu 1,3,4-oksadiazolu, którego skutkiem jest odtworzenie dwóch kwasów karboksylowych składających się na ten rdzeń strukturalny [18], co nie przekreśla całkowicie występowania podstawowych właściwości immunosupresyjnych w tych pochodnych **MPA**.

Poza przesłankami literaturowymi, na hamowanie HDACs przez tę nową klasę pochodnych, wskazują również badania odwrotnego dokowania. Podkreślają one istotne dopasowanie ligandów do enzymu takiego jak HDAC6 oraz jego substratu — białka Hsp90. Eksperymenty te pokazują również, że niektóre bioizostery nadal dobrze dopasowują się do enzymu IMPDH. Na podstawie tych doniesień, wykonane zostały również testy dokowania molekularnego do wskazanych wcześniej białek. W przypadku HDAC6 siła wiązania ligand-białko mieści się pomiędzy -87.84 a -76.50 kJ·mol⁻¹, zaś dla IMPDH II — w przedziale od -37.24 do -30.12 kJ·mol⁻¹. Wartości referencyjne wynoszą odpowiednio: -88.83 kJ·mol⁻¹ dla **MPA**, -81.67 kJ·mol⁻¹ dla **MMF** oraz -95.08 kJ·mol⁻¹ dla panobinostat, w odniesieniu do HDAC6. Dla IMPDH II prezentują się one następująco: -31.80 , -32.64 i -33.05 kJ·mol⁻¹. Choć dla kilku ligandów siła wiązania nie przewyższa tej uzyskanej dla **MPA**, **MMF**, czy panobinostat, są to wartości zbliżone, o tym samym rzędzie wielkości. Wyniki te stanowią przesłankę uzupełniającą, skłaniającą nasz zespół do dalszego rozwoju tematyki bioizosterów **MPA**.

Podsumowując, głównym uzasadnieniem pracy nad nowymi pochodnymi **MPA** jest próba zmodyfikowania jego efektów cytotoksycznych w ustroju poprzez zakładane modyfikacje strukturalne, które mogą pośrednio lub bezpośrednio wpływać na farmakokinetykę i farmakodynamikę. Poza przesłankami literaturowymi podkreślającymi unikatowe właściwości biologiczne związków heterocyklicznych, a także fenoli spotykanych w naturze, przeprowadziliśmy również badania obliczeniowe, które dowiodły, że ligandy wiążąc się w podobnym rzędzie wielkości wartości energii wiązania co znane inhibitory IMPDH II, czy HDAC6, mogą w istotny sposób hamować aktywność tych enzymów. Pomimo znacznej ingerencji w strukturę **MPA**, związki bioizosteryczne, pochodne 1,3,4-oksadiazolu, mogą zachować swoją

pierwotną funkcję immunosupresyjną, gdyż metabolizm tego typu heterocykli potencjalnie prowadzi do odtworzenia struktury **MPA**.

6.2. Amidowe pochodne MPA

6.2.1. Dokowanie molekularne

Dokowanie molekularne to metoda obliczeniowa pozwalająca na wstępną weryfikację związków pod kątem ich siły wiązania z białkiem, które stanowi zakładany cel molekularny. Częsteczką wiążąc się silniej w centrum aktywnym enzymu niż jego znany inhibitor, ujawnia pewien potencjał inhibicyjny wobec tej biomolekuły. Poza określeniem siły wiązania ligand-białko, możliwe jest także ustalenie sposobu wiązania w centrum aktywnym, to jest — wskazanie siły, rodzajów i liczby określonych, niekowalencyjnych oddziaływań między- i wewnątrzcząsteczkowych. Na podstawie tych danych możliwa jest też wstępna ocena rodzaju inhibicji (odwracalna, czy nieodwracalna). Jest to metoda symulacyjna, oparta o pewien model oddziaływań (białko-białko, białko-woda, woda-woda, białko-ligand, białko-woda, itd.), dlatego jej odbiór powinien być dokonywany z pewną rezerwą. Nie odda ona nigdy rzeczywistego obrazu oddziaływań występujących w komórce, jednak obecnie stanowi jedno z bardziej istotnych narzędzi wstępnej weryfikacji założeń wynikających z analizy literatury tematu.

Poniżej przedstawiona została analiza oddziaływania pewnej puli amidowych pochodnych **MPA** z enzymem IMPDH2, w jego centrum aktywnym. Analiza ta była początkowo szersza, uwzględniała większą liczbę układów heterocyklicznych, jednak zaprezentowane poniżej wyniki odnoszą się do cząsteczek otrzymanych i scharakteryzowanych. Pewne wzmianki o innych pochodnych amidowych **MPA** zostaną przytoczone w ramach analizy uzyskanych wyników. Badanie te wykonał dr inż. Mateusz Daśko z Katedry Chemii Nieorganicznej Politechniki Gdańskiej.

Tabela 2. Energia swobodna wiązania ligand-enzym obliczona dla związków **A1-A18** oraz **MPA**

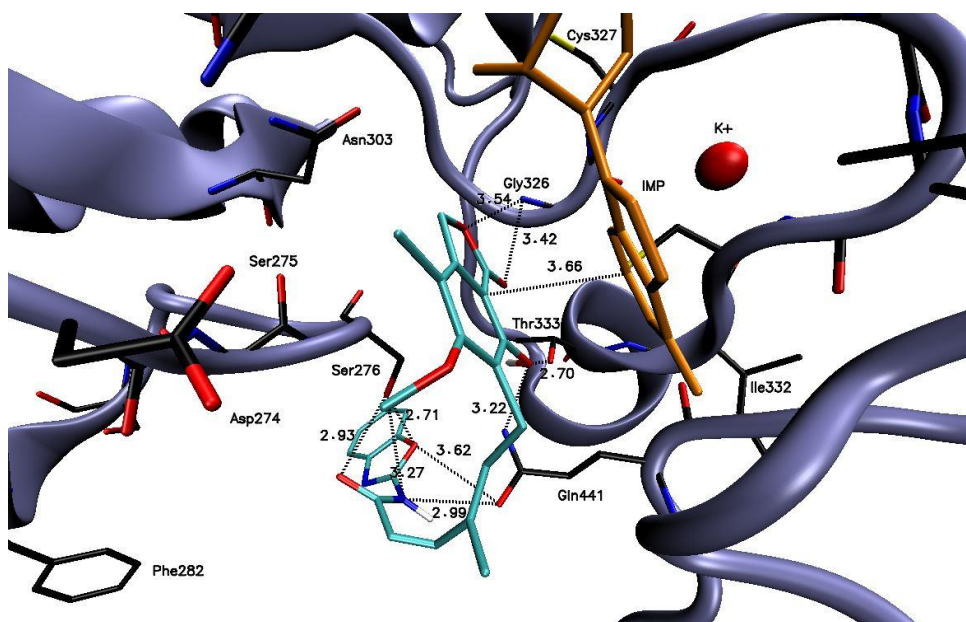
L.p.	Typ dobudowanej aminy	Symbol związku	IMPDH2 E [kcal·mol ⁻¹]
1	Heteroaromatyczny	A1	-9,3
2		A2	-9,1
3		A3	-9,4
4	Aromatyczny	A4	-9,5
5		A5	-8,9
6		A6	-9,5
7	Alifatyczny	A7	-8,7
8	Heteroaromatyczny	A8	-8,8
9		A9	-9,2
10		A10	-9,4
11		A11	-9,1
12		A12	-9,1
13		A13	-9,0
14		A14	-9,1
15		A15	-9,2
16		A16	-9,0
17		A17	-9,2
18		A18	-9,1
19	—	MPA	-7,8

W celu sprawdzenia, czy związki **A1-A18** są w stanie skutecznie wiązać się z miejscem aktywnym enzymu IMPDH2, przeprowadzono badania dokowania molekularnego. Strukturę rentgenowską enzymu IMPDH2 pobrano z Protein Data Bank (kod PDB: 1JR1) i odpowiednio przygotowano do dokowania. Procedurę dokowania zoptymalizowanych ligandów przeprowadzono przy użyciu oprogramowania AutoDock Vina 1.1.2. Uzyskane wyniki dla związków **A1-A18** wykazały, że mogą one, przynajmniej teoretycznie, wiązać się z miejscem aktywnym białka IMPDH2. Swobodne energie wiązania badanych związków kształtowały się na zadowalającym poziomie, w wąskim przedziale od -8,7 do -9,5 kcal·mol⁻¹ (**Tabela 2**), i były niższe od swobodnej energii wiązania białka z **MPA** (-7,8 kcal·mol⁻¹), używanego jako odniesienia. Najniższe wartości swobodnej energii wiązania wyznaczono dla związków **A4** i **A6** (w obu przypadkach -9,5 kcal·mol⁻¹). Pochodne amidowe zawierające motyw: tiazolu, oksazolu, imidazolu, metylooksolanu, metylochinoliny, prezentowały wartości siły wiązania na następujących poziomach: -8,5; -8,6; -8,7; -8,3/-8,5 (izomery *R/S*); -9,1 kcal·mol⁻¹. Dodatkowo, dla podstawionych benzo[d]tiazoli, **A8-A18**, wyniki mieściły się w przedziale od -8,8 do -9,4 kcal·mol⁻¹.

Wyniki tych badań obliczeniowych pozwalają na zgrubne określenie zależności struktura-aktywność dla siły oddziaływania ligand-białko, w oparciu o rdzeń heteroatomatyczny, a także położenie grupy aminowej, czy innych grup funkcyjnych.

Pośród podstawowych klas związków heterocyklicznych, największe powinowactwo do enzymu ma pochodna benzimidazolowa (**A3**), następnie, benzotiazolowa (**A1**) i benzoksazolowa (**A2**). Najwyższa, co do wartości, siła wiązania występuje dla odpowiednika pirymidynowego (**A7**). W odniesieniu do wariacji na temat miejsca podstawienia grupy aminowej, można zauważyć najsilniejsze powinowactwo do centrum aktywnego enzymu dla 6-aminobenzo[d]tiazolu (**A4**), i następnie, kolejno, 2- i 5-aminowanych wariantów (**A1** i **A5**). W przypadku układu benzoksazolowego, motyw 5-aminowany (**A6**) okazał się wiązać silniej z IMPDH2 niż analog 2-aminowany (**A2**).

Należy zauważyć, że trudno jest zaobserwować wyraźne różnice pomiędzy klasą pochodnych benzo[d]tiazolowych, zawierających różne grupy funkcyjne (**A8-A18**), jednakże pewien trend możliwy jest do określenia. Najlepsze powinowactwo, co do wartości, wobec enzymu IMPDH, mają pochodne z dwoma podstawnikami metylowymi (**A10**) i nitrowym (**A15**). Pochodne halogenowane, **A11-A13** i **A18**, nie różnią się znacząco od siebie, nawet, gdy włączony w ten zakres jest podstawnik trifluorometylowy w **A14**. Co do energii wiązania, nie widać jednoznacznej różnicy pomiędzy wariantami 4- i 6-podstawionymi.



Rysunek 34. Sposób ułożenia oraz oddziaływania międzycząsteczkowe w kompleksie **A2**-IMPDH2 w miejscu aktywnym enzymu

Na **Rysunku 34** pokazano wizualizację przypuszczalnego sposobu wiązania związku reprezentatywnego— **A2** ($-9,1 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$), w miejscu aktywnym enzymu, który wykazał najbardziej obiecującą aktywność w badaniach biologicznych. Można zauważyć, że związek ten jest bardzo dobrze dopasowany w miejscu aktywnym IMPDH, będąc otoczonym kilkoma istotnymi resztami aminokwasowymi. Analizując oddziaływania z podjednostkami aminokwasowymi w otoczeniu, można zauważyć, iż fragment pochodzący od rdzenia **MPA** znajduje się w bliskiej odległości od reszt aminokwasowych Gly326 (3,42 i 3,54 Å), Thr333 (2,70 Å) i Gln441 (3,22 Å), co sugeruje obecność oddziaływań elektrostatycznych. Ponadto, oddziaływania π - π (3,66 Å), z cząsteczkami IMP, także są obecne. Reszta benzoksazolowa w związku **A2** może również oddziaływać elektrostatycznie z kilkoma resztami aminokwasowymi, np. Ser276 (2,71, 2,93 i 3,27 Å) i Gln441 (2,99 i 3,62 Å). Wszystkie te prawdopodobne interakcje mogą stabilizować kompleks enzym-ligand, zapewniając odpowiednie dopasowanie **A2** i, w rezultacie, wyższą aktywność hamującą wobec docelowego białka.

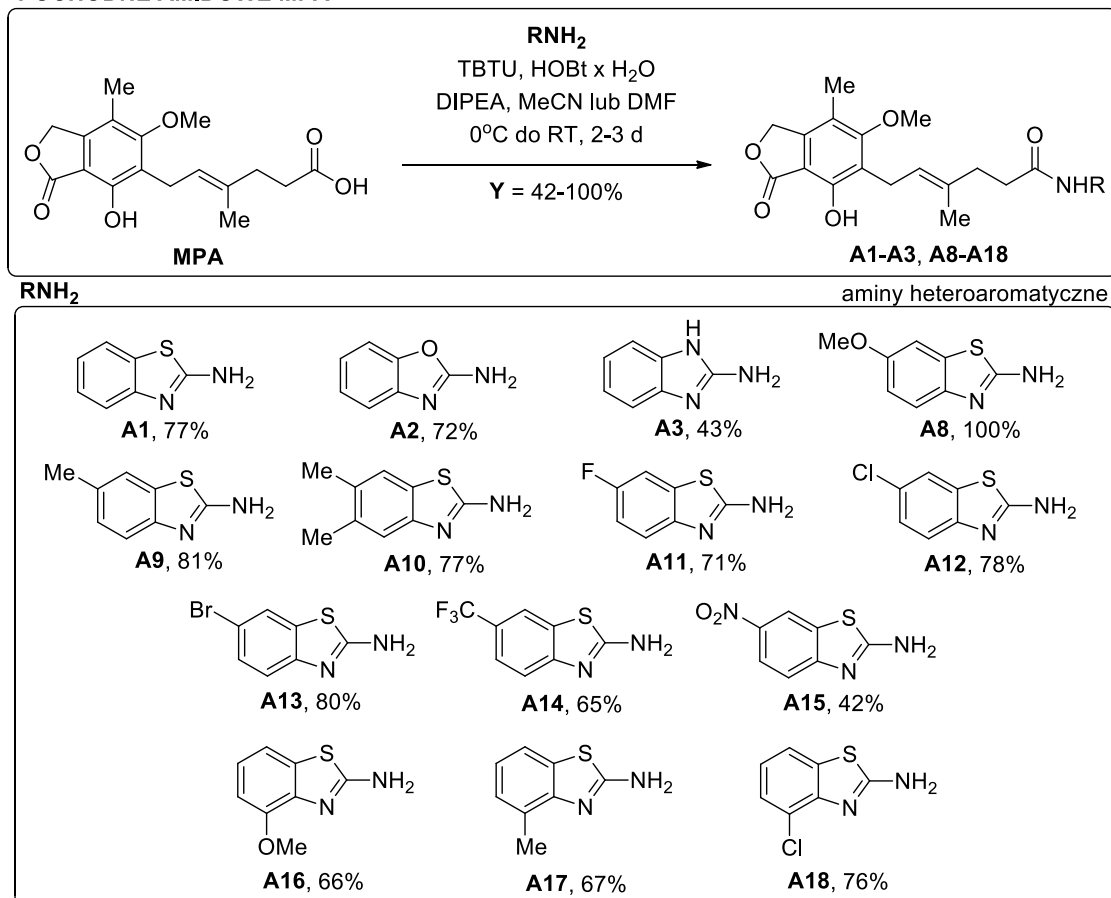
Każdorazowo przy wykonywaniu badań dokowania molekularnego, powinna być wykonywana weryfikacja tego typu rozważań struktura-aktywność, na drodze badań biologicznych. Sprawdzą to wówczas wartościowość opracowanego modelu. Choć przełożenie badań obliczeniowych na badania biologiczne nie powinno być dokonywane w sposób jednokładny, stanowi istotne narzędzie prognostyczne w sposobie i sile oddziaływań ligand-białko, a tym samym o zdolności do inhibicji określonego enzymu. Pomimo tego, że zawarte poniżej opracowanie biologiczne nie pokrywa testu enzymatycznego IMPDH2, który byłby odpowiedzią na wykonane badania dokowania molekularnego, pewną odpowiedź na uzyskane tu wyniki przyniesie test GMP.

6.2.2. Synteza

W niniejszym punkcie rozdziału znajduje się opracowanie odnoszące się do syntezy nowych, amidowych pochodnych **MPA**, substratów koniecznych do ich otrzymania, a także przeprowadzonej optymalizacji procesu syntezy związku **A1**. Badania te zostały wykonane w oparciu o sprzęt i zasoby Katedry Chemii Organicznej Politechniki Gdańskiej, a także o materiały zakupione z wewnętrznego dofinansowania (Minigrant; nr zadania: DS035136).

6.2.2.1. Amidy zbudowane z rdzenia MPA i amin heteroaromatycznych

POCHODNE AMIDOWE MPA



Schemat 57. Metoda syntezy amidów **MPA** (**A1-A3**, **A8-A18**) pochodzących od amin heteroaromatycznych

Na **Schemacie 57** zestawiono wyniki syntezy pochodnych amidowych (**A1-A3**, **A8-A18**), w których dobudowywany fragment aminowy jest pochodną układu heterocyklicznego, gdzie grupa aminowa podłączona jest bezpośrednio do fragmentu heteroaromatycznego. Podklasa ta została wyróżniona spośród wszystkich amidów z tego względu, że te pochodne charakteryzowała niska rozpuszczalność w klasycznych rozpuszczalnikach organicznych, w tym: acetonitrylu, metanolu, czy chlorku metylenu. W konsekwencji, ich metoda syntezy była niezwykle prosta, odtwarzalna, a produkt wymagał jedynie odmycia schłodzonymi rozpuszczalnikami. Struktura i czystość otrzymywanych amidów były określone przy użyciu technik NMR, MS oraz HPLC.

W celu omówienia podstawowej zależności struktury od wydajności, należy rozpocząć rozważania od 2-aminobenzo-1,3-azoli pod kątem heteroatomów. Najwyższa wydajność obserwowana jest w przypadku zastosowania 2-aminobenzo[d]tiazolu, zaś najniższa — 2-aminobenzo[d]-1*H*-imidazolu. Pomiędzy nimi ulokował się efekt reakcji z 2-aminobenzo[d]oksazolem. Najpewniej, taki rozkład wyników wynika bezpośrednio z polarności poszczególnych amin. Te, zawierające atom siarki, jako najmniej polarne, wytwarzają najsłabsze oddziaływania polarne ze składnikami w swoim otoczeniu, dzięki czemu atak nukleofilowy ich grupy aminowej jest bardziej faworyzowany. W przypadku bardziej elektroujemnych atomów azotu oraz tlenu, oddziaływania te są silniejsze, a zakładany atak nukleofila, w konsekwencji, mniej preferowany. Już na etapie przygotowania reakcji z udziałem 2-aminobenzo[d]-1*H*-imidazolu, widoczna jest słaba rozpuszczalność tego komponentu w acetonitrylu. Konieczne jest zastosowanie silniej polarnego rozpuszczalnika — DMF. Dopiero w takich warunkach, możliwe jest otrzymanie produktu amidowego. W przypadku 2-aminobenzo[d]oksazolu — substrat ten rozpuszcza się dobrze w acetonitrylu. Produkt, który daje, jest umiarkowanie rozpuszczalny w tych warunkach, stąd prawdopodobny spadek wydajności (w trakcie płukania) i ulokowanie tego wyniku. Jednoznacznie określenie co jest przyczyną takiego rozkładu wyników nie jest proste, gdyż wpływają na niego również zjawiska takie jak: tautomerizacja w ramach heterocykla (np. atom azotu cykliczny-atom azotu egzocykliczny w ramach 2-aminobenzo[d]-1*H*-imidazolu), stabilność tetraedrycznego produktu przejściowego, tworzonego w reakcji aktywowanego **MPA** z aminą, a także siła efektów polarnych (oddziaływania międzycząsteczkowe i wewnątrzcząsteczkowe, interakcje z rozpuszczalnikiem, z wodą).

Zauważalna jest korelacja pomiędzy podstawieniem 2-aminobenzo[d]tiazolu, a wydajnością otrzymywania odpowiedniego amidu **MPA**. Pochodne 6-podstawione dawały wyższe wydajności niż warianty 4-podstawione. Z kolei grupy elektronodonorowe prowadziły do wyższych wydajności niż elektronoakceptorowe, jednak tylko w przypadku klasy 6-podstawionych 2-aminobenzo[d]tiazoli. Jest to szczególnie wyraźne dla podstawnika metoksyowego (**A8** i **A16**), słabiej w przypadku podstawnika metylowego (**A9** i **A17**), zaś korelacja ta niemal zanika w przypadku podstawnika chlorowego (**A12** i **A18**). Może mieć to związek z różnymi efektami donorowo-akceptorowymi, w zależności od miejsca podstawienia. Podstawnik elektronodonowy, w pozycji 6, zdaje się mieć silny wpływ aktywujący na grupę aminową w pozycji 2, poprzez atom azotu. W przypadku pozycji 4, grupa elektronodonorowa ma wpływ dezaktywujący na grupę aminową w pozycji 2, także poprzez atom azotu. Grupa dezaktywująca (–Cl) w podobny sposób obniża nukleofilowość podstawnika aminowego, niezależnie od miejsca podstawienia. Innym obserwowanym trendem jest wzrost wydajności wraz z obniżeniem elektroujemności podstawnika halogenowego. Wydajność dla pochodnej fluorowanej (**A11**) jest najniższa, zaś dla bromowanej (**A13**) — najwyższa. Pokazuje to, że poprzez osłabienie ujemnego efektu indukcyjnego (–I), osiągana jest wyższa wydajność, najpewniej dzięki zwiększeniu nukleofilowości grupy aminowej. W przypadku podstawników silnie dezaktywujących, to jest: grupa trifluorometylowa oraz nitrowa, wydajność reakcji jest obniżona względem wzorcowego

2-aminobenzo[d]tiazolu. W przypadku pochodnej nitrowej, dodatkowym czynnikiem limitującym postęp reakcji była najpewniej niska rozpuszczalność substratu.

W ogólnym ujęciu, przemiana ta charakteryzowała się zakresem od umiarkowanych do doskonałych wydajności otrzymywania produktów, znacznie uproszczoną metodologią, a także odtwarzalnością. Choć mechanizm reakcji zakłada konieczność użycia zaledwie jednego ekwiwalentu zasady, optymalizacja tego parametru również polepszyła efektywność transformacji. Niektóre aminy heteroaromatyczne (w tym 2-aminobenzo[d]tiazol oraz jego pochodne podstawione układami o niezerowym, ujemnym efekcie indukcyjnym) charakteryzują się zmienioną zasadowością grupy aminowej w porównaniu do reszty przypadków. W efekcie, zastosowanie nadmiaru aminy trzeciorzędowej (np. DIPEA) zapewnia wytworzenie się jej soli z **MPA** i uzyskanie pH o odpowiedniej wartości. W konsekwencji wydajność zostaje podniesiona. Ponadto interesującym zabiegiem wykorzystanym w tej reakcji jest jednoczesne wprowadzenie dwóch czynników zawierających 1-hydroksybenzotriazol. Zarówno TBTU, jak i HOBt wprowadzają ten motyw strukturalny do **MPA**. Aktywacja ta biegnie w pierwszym etapie poprzez sól uroniową, która następnie przechodzi w analizowany ester aktywny (1 eq TBTU). Zastosowanie 1 ekwiwalentu HOBt·H₂O wydaje się w tym przypadku bezcelowe, jednak tłumacząc jego dodatek regułą przekory, która wskazuje, że podniesienie ilości substratu przesuwają równowagę reakcji ku produktom. Podniesienie liczby ekwiwalentów HOBt przesuwają równowagę reakcji tworzenia estru aktywnego w jego kierunku. Skutkiem takiego działania jest możliwość otrzymania pożądaných amidów **MPA** z zadowalającymi wydajnościami. Dodatkowo, strategię tę zdaje się popierać jedno źródło literaturowe, w którym autorzy wskazują, iż obecność dodatkowego czynnika kondensującego HOBt wzmacnia reaktywność i redukuje powstawanie niereaktywnego produktu pośredniego [171].

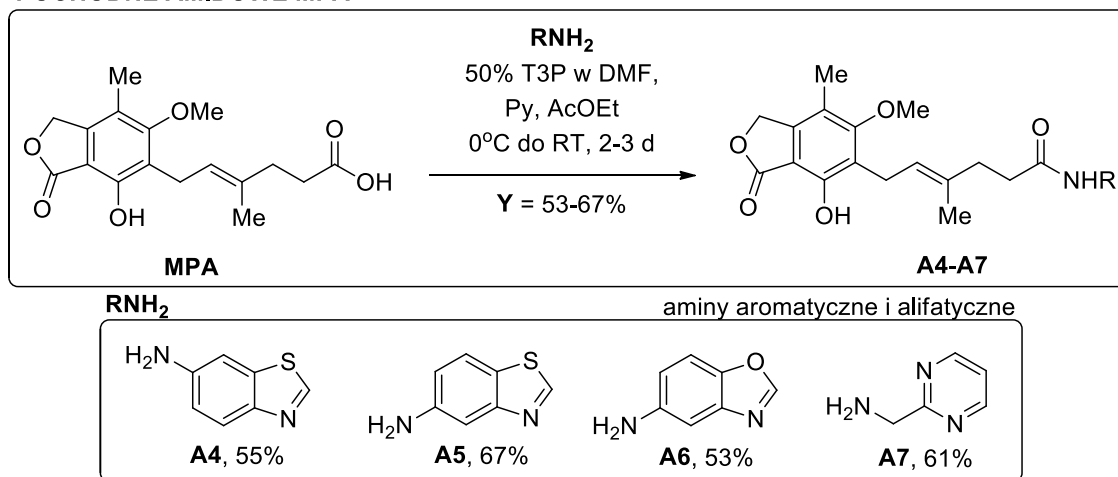
Warto nadmienić, iż **MPA** jako związek całkowicie podstawiony w swym fragmencie benzenowym, nie prezentuje żadnych sygnałów w zakresie charakterystycznym dla protonów aromatycznych w badaniach spektroskopii ¹H NMR. W konsekwencji analiza widm takich pochodnych jest niezwykle prosta i diagnostyczna. W przypadku techniki ¹³C NMR sytuacja jest podobna, gdyż przypisanie pików rozpoczyna się od wskazania tych przynależących do **MPA**, dla których wartości przesunięcia chemicznego różnią się w niewielkim zakresie pośród całej serii związków. W praktyce analiza ta sprowadza się do określenia poszczególnych atomów węgla wprowadzanych wraz z motywem heterocyklicznym. W niektórych przypadkach nie było to jednak tak wyraźne i korzystne byłoby przeprowadzenie badań uzupełniających w przyszłości (np. HSQC, HMBS).

Pozostając w tematyce spektroskopii NMR warto dodać, iż w ramach struktur benzo-1,3-azoli wyróżnia się anizotropowość wpływu pierścienia homoaromatycznego na heteroaromatyczny, i na odwrót. Przyjmuje się, że dla 2,6-dipodstawionych benzo[d]tiazoli transmisja efektu elektronowego z pozycji 2. na 6. jest o około 33% słabsza, niż w kierunku odwrotnym, to jest: z 6. na 2. Ponadto gdy podstawnik w pozycji 6 ma charakter akceptorowy, np. grupa nitrowa, siła tej transmisji jest jeszcze większa [172]. W praktyce oznacza to, że wartość przesunięcia chemicznego dla atomu węgla w pozycji 2. 2,6-dipodstawionych benzo[d]tiazoli

ulega tym silniejszemu odsłanianiu w polu magnetycznym, im silniejszy jest charakter elektronoakceptorowy podstawnika w pozycji 6. Taka zależność obserwowana jest również w tej klasie pochodnych. Każda z nich posiada w pozycji drugiej podłączoną acylowaną grupę aminową, zaś w pozycji szóstej — podstawniki o różnym charakterze elektronowym. W szeregu: MeO–, Me–, H–, F₃C–, O₂N–, wartości przesunięcia chemicznego atomów węgla 2. w heterocyklu prezentują się następująco: 156,28; 157,42; 158,52; 161,47; 163,82 ppm. Jest to zgodne z trendem przedstawionym w publikacji. Przypisanie właściwych przesunięć dla atomów węgla w pozycji 6. jest niemożliwe na podstawie zgromadzonych danych. W niektórych przypadkach przeprowadzenie dodatkowych eksperymentów opartych na korelacji przez wiązania dla jąder heteroatomów jest konieczne w celu przypisania właściwej pozycji atomu węgla/wodoru.

6.2.2.2. Amidy zbudowane z rdzenia MPA i amin aromatycznych lub alifatycznych

POCHODNE AMIDOWE MPA



Schemat 58. Metoda syntezy amidów **MPA** (**A4-A7**) pochodzących od amin aromatycznych i alifatycznych

Na **Schemacie 58** przedstawiono wyniki reakcji otrzymywania amidowych pochodnych **MPA** zawierających w swej budowie motyw aminy alifatycznej, bądź homoaromatycznej. Związki te charakteryzowały odmienne parametry fizykochemiczne niż ich odpowiedników heteroaromatycznych, które w efekcie spowodowały dobrą rozpuszczalność tych cząsteczek w klasycznych rozpuszczalnikach organicznych, takich jak: acetonitryl, metanol, czy chlorek metylenu. Konieczne było przeprowadzenie oczyszczania na kolumnie chromatograficznej.

Ze względu na to, że związki te nie dały pożądaných produktów z wykorzystaniem układu TBTU/HOBt, sięgnięto po typową technikę używaną w zespole prof. Grzegorza Cholewińskiego, pozwalającą na pozyskanie amidów **MPA**. Bezwodnik kwasu propanofosfonowego (T3P) w przeszłości przysłużył się do uzyskania zadowalających wyników syntezy aminokwasowych pochodnych **MPA** [173]. Także i w tym przypadku, otrzymanie zakładanych anilidów oraz pochodnej 1,3-diazyny było możliwe, z zadowalającymi wydajnościami.

Analizując zgrubnie wpływ położenia grupy aminowej na ogólną efektywność reakcji można zauważyć, że zdolności akceptorowe π -amfoterycznego układu 1,3-tiazolowego są wyraźniej zaznaczone, gdy mamy do czynienia z wariantem 6-podstawionym, niż



5-podstawionym. Przepływ elektronów poprzez układ sprzężonych wiązań podwójnych jest silnie ukierunkowany, gdy podstawnik aminowy znajduje naprzeciwko atomu azotu (**A4** i **A5**). Zamiana atomu siarki na atom azotu w **A6** poskutkowała ponownie obniżeniem wydajności. Ten heteroatom, dzięki swej wysokiej elektroujemności, na drodze efektu indukcyjnego, powoduje podwyższenie gęstości elektronowej w ramach pierścienia 1,3-oksazolu, a tym samym obniżenie nukleofilowości grupy aminowej.

6.2.2.3. Inne syntezy

Inne techniki otrzymywania amidów

Tabela 3. Zestawienie wyników reakcji otrzymywania A1 w różnych warunkach syntezy

L. p.	Warunki prowadzenia syntezy	Wydajność [%]
1	chloromrówczan <i>i</i> -butylu, Et ₃ N, acetonitryl, -15°C do RT, 96 godzin	17
2	chloromrówczan etylu, Et ₃ N, octan etylu, -15°C do RT, 24 godziny	21
3	TBTU, HOBt·H₂O, DIPEA, acetonitryl, 0°C do RT, 20 godzin	64
4	DEPBT, DIPEA, acetonitryl, RT, 72 godziny	38
5	EDCI, HOSu, acetonitryl, RT, 24 godziny	9
6	T3P, pirydyna, acetonitryl, 0°C do RT, 24 godziny	0
7	EEDQ, acetonitryl, RT, 48 godzin	0
8	chlorek oksalilu, DMF (kat.), acetonitryl, 0°C do RT, 72 godziny	0
9	TiCl ₄ , pirydyna, -20°C do 85°C, 2 godziny	0

Wykaz skrótów: Et₃N — trietyloamina. RT — temperatura pokojowa, TBTU — tetrafluoroboran 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametylouroniowy, HOBt·H₂O — monohydrat 1-hydroksybenzotriazolu, DIPEA — diizopropyletyloamina, DEPBT — 3-(dietoksyfosforyloksy)-1,2,3-benzotriazyn-4(3*H*)-on, EDCI — chlorowodorek 1-etylo-3-(3-(dimetyloamino)propylo)karbodiimidu, HOSu — *N*-hydroksysukcynoimid, T3P — bezwodnik kwasu propanofosfonowego, EEDQ — *N*-etoksykarbonylo-2-etoksy-1,2-dihydrochinolina, DMF — *N,N*-dimetyloformamid.

W Tabeli 3 zaprezentowano zbiór metod, które zastosowałem w czasie prób otrzymywania serii amidowych pochodnych **MPA**, a dokładnie — pochodnej 2-aminobenzo[d]tiazolu. Choć reakcja otrzymywania amidów pierwszorzędowych jest przemianą bezpośrednią, jednoetapową, to nie jest możliwa do przeprowadzenia we wszystkich znanych warunkach aktywacji elektrofilowej grupy karboksylowej, co związane jest z charakterem nukleofilowym stosowanych amin, pH roztworu, rodzajem rozpuszczalnika, czy czasem prowadzenia reakcji. Obrany powyżej kierunek optymalizacji warunków reakcji wynikał wprost z dostępności materiałów.

Ze wskazanych danych można wywnioskować, że im większą zawadę steryczną posiada wprowadzany podstawnik w ramach tworzonego mieszanego bezwodnika, bądź estru aktywnego, tym wydajność otrzymywania amidu jest większa. Warto zauważyć, że najwyższe wydajności uzyskano właśnie dla estrów aktywnych pochodzących od 1-hydroksybenzotriazolu (TBTU/HOBt) i 3-hydroksy-1,2,3-benzotriazyn-4(3*H*)-onu (DEPBT), zaś niższą dla pochodnej *N*-hydroksysukcynoimidu. Chloromrówczan izobutylu okazał się być bardziej efektywnym czynnikiem kondensującym w tej reakcji niż jego odpowiednik etylowy. Choć w reakcji z EEDQ również tworzy się bezwodnik mieszany, to niebezpośredniość jego powstawania, uniemożliwia

uzyskanie pożądanego produktu. Tę ogólną prawidłowość można wiązać z łatwością do eliminacji wysoce zawadzonego podstawnika w wytworzonym intermediacie tetraedrycznym, powstałym po reakcji formy aktywnej kwasu karboksylowego z odpowiednią aminą.

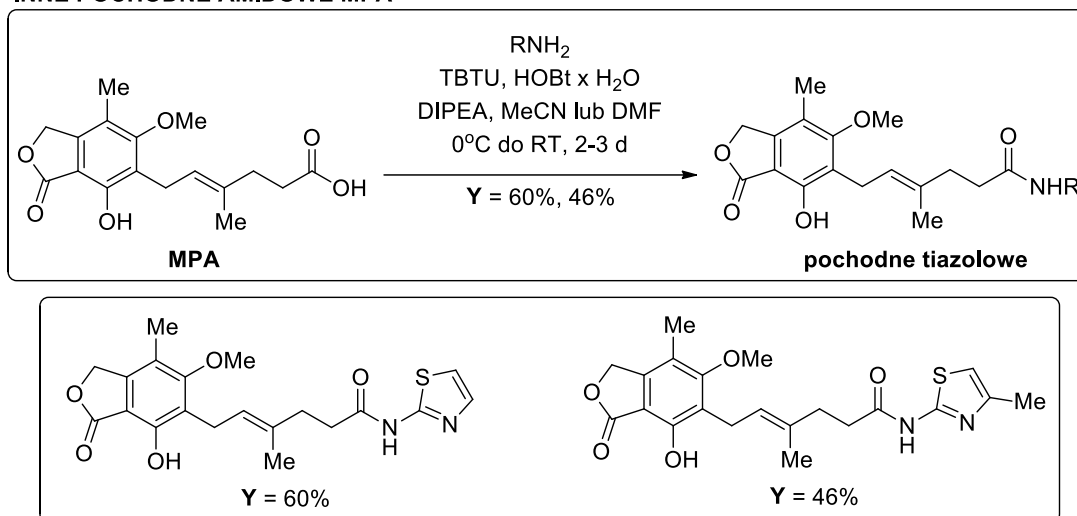
Niepowodzeniem zakończyły się również próby przeprowadzenia reakcji aktywowanej grupy karboksylowej w **MPA** z aminą, przy użyciu bezwodnika kwasu propanofosfonowego (T3P) oraz metod opartych o chlorek kwasowy (chlorek oksalilu/DMF i chlorek tytanu(IV)/pirydyna). Ta ostatnia może wymagać szczególnie długiego czasu aktywacji funkcji karboksylowej, silnie sterylnych warunków, a także ochrony grup funkcyjnych z ruchliwym protonem (tu: grupa fenolowa) [174, 175]. Chlorek tytanu(IV), jako niezwykle reaktywny kwas Lewisa może wchodzić w interakcję z wiązaniem podwójnym w **MPA**, co sugerowało niemal natychmiastowe wybarwienie mieszaniny reakcyjnej. Dodatkowo, może on prowadzić do otwarcia pierścienia laktonowego **MPA**.

Szczególnie atypowa efektywność reakcji obserwowana jest w przypadku aktywacji T3P. W literaturze obecny jest przykład, w którym możliwe jest otrzymanie amidów **MPA** będących pochodnymi aminokwasów, w środowisku T3P i trietyloaminy, bez ochrony funkcji fenolowej [173, 176]. Wskazuje to na zgoła odmienną nukleofilność stosowanych amin, inną kinetykę reakcji, a także różny wpływ efektów sterycznych i elektronowych w reagentach. W obecnym przykładzie, nukleofilowość aminy heteroaromatycznej może być obniżana przez potencjalnie akceptorowy charakter heterocykla π -amfoterycznego. Poprzez rozbudowany układ sprzężonych wiązań podwójnych, grupa aminowa staje się bardziej miękkim nukleofilem w porównaniu ze wspomnianą pochodną aminokwasową, czy też nawet z aminami aromatycznymi (*vide A4-A7*). Niemniej jednak, jednoznaczne określenie powodu takiej selektywności jest niełatwe, gdyż na stabilność produktu przejściowego wpływa również sam rozpuszczalnik, jak i temperatura prowadzenia procesu.

Warto dodać, iż najbardziej obiecująca metoda korzystająca z układu TBTU/HOBt daje lepsze efekty niż opisana w literaturze procedura oparta o CDI, której wydajność wynosi 60% [177]. Stosowana w niniejszej pracy metoda pozwala dodatkowo na przeprowadzenie tej transformacji w niższej temperaturze i bez konieczności używania DMF, który jest trudny do usunięcia z mieszaniny poreakcyjnej.

Otrzymywanie innych pochodnych amidowych

INNE POCHODNE AMIDOWE MPA

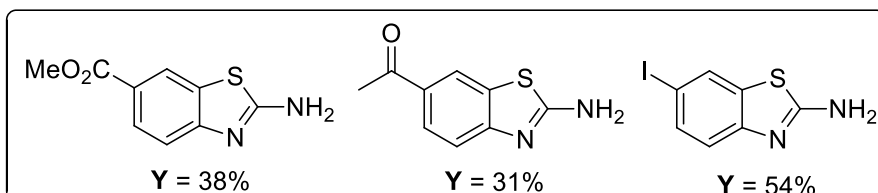
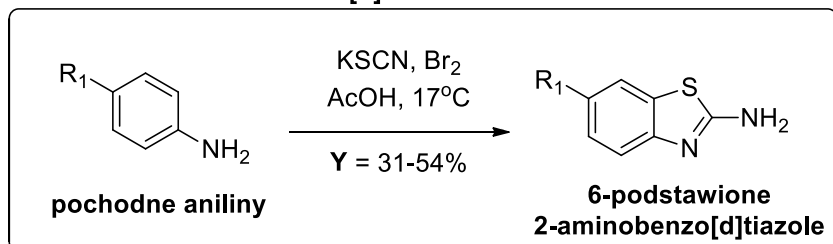


Schemat 59. Wyniki reakcji otrzymywania amidowych pochodnych **MPA** zawierających motyw tiazolu

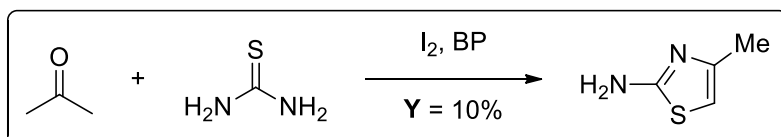
Badając zakres opracowanej przeze mnie metody syntezy amidów **MPA**, z powodzeniem udało się otrzymać dwie pochodne amidowe **MPA**, gdzie rolę aminy heteroaromatycznej pełniły odpowiednio: 2-aminotiazol oraz 2-amino-4-metylotiazol (otrzymany) (**Schemat 59**). Zastosowana została metoda aktywacji TBTU/HOBt, tak jak w przypadku odpowiedników 2-aminobenzo[d]tiazolowych. Rozpuszczalność otrzymanych produktów jest zbieżna z tą obserwowaną dla uprzednio otrzymanych, heteroaromatycznych analogów siarkowych. Tak samo jak wcześniej, jedyną wymaganą metodą oczyszczania mieszaniny poreakcyjnej jest sączenie i następcze odmywanie osadu schłodzonym acetonitrylem, metanolem i chlorkiem metylenu. Produkty zostały scharakteryzowane przy pomocy techniki ^1H NMR, wskazując na wysoką czystość i rozróżnialność poszczególnych sygnałów.

Związki tego typu zostały już wcześniej opisane w literaturze chemicznej [175, 177]. Wydajność reakcji 2-aminotiazolu z **MPA** w obecności CDI wynosiła 62%, zaś dla 2-amino-4-metylotiazolu — 68% [177]. Otrzymany wynik dla pierwszej z pochodnych jest zatem zbieżny z doniesieniami publikacyjnymi, jednak dla drugiej jest on nieznacznie obniżony. Może to wynikać z niejednakowej metody otrzymywania, a także utraty części związku w trakcie odmywania. Choć pochodną amidową **MPA** i 2-aminotiazolu otrzymano również metodą chloromrówczanową, z 85% wydajnością, to w tym przypadku zastosowano ochronę wolnej grupy fenolowej [175]. Wydajność ta nie stanowi o całym procesie otrzymywania. Należy mieć na uwadze, że usuwanie grup siliilowych często nie biegnie z wysoką wydajnością. Autorzy [175] nie zaprezentowali, ponadto żadnych danych eksperymentalnych związanych z tymi transformacjami, dlatego porównanie to ma charakter jedynie przybliżony.

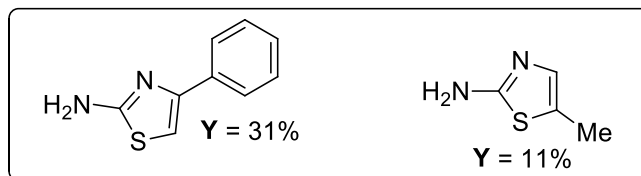
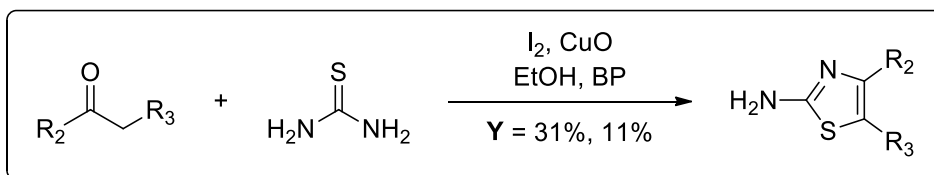
SYNTEZA 2-AMINOBENZO[d]TIAZOLI



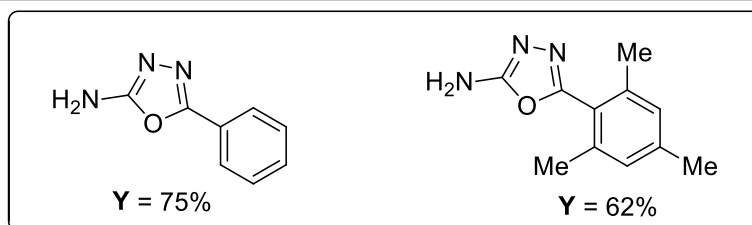
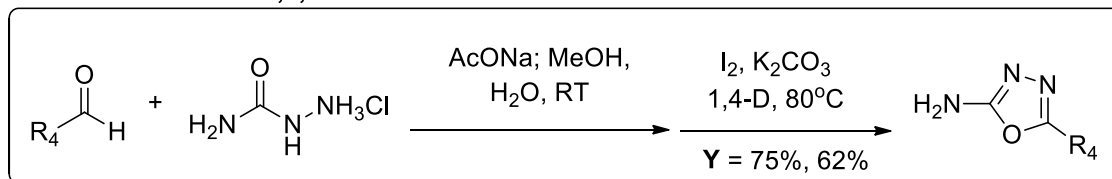
SYNTEZA 2-AMINO-4-METYLOTIAZOLU



SYNTEZA INNYCH 2-AMINOTIAZOLI



SYNTEZA 2-AMINO-1,3,4-OKSADIAZOLI



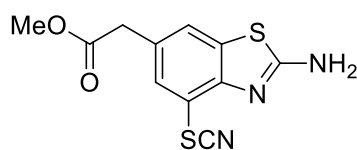
Schemat 60. Zestawienie wyników syntezy amin heteroaromatycznych

Aminy heteroaromatyczne są jednymi z kluczowych substratów w bezpośredniej syntezie amidów **MPA (A1-A18)**. Pomimo, iż zaprojektowane struktury można uzyskać z wykorzystaniem dostępnych handlowo odczynników, podjąłem próby samodzielnych syntez odpowiednich amin w poszerzonym zakresie (**Schemat 60**). Chociaż nie każda z otrzymanych przeze mnie amin

została przyłączona do **MPA**, próby te miały na celu ukazanie kierunków potencjalnego zwiększenia puli docelowych amidów, umożliwiających niekiedy modyfikacje strukturalne niezależnie od ofert handlowych. Przedstawione tu zagadnienia i metody są niezwykle istotne z punktu widzenia chemii medycznej, gdyż tak jak już wspomniano, układy heterocykliczne posiadają unikatowe właściwości fizykochemiczne i są elementem strategii zwanej podstawieniem bioizosterycznym, ważnym w poszukiwaniu nowych związków biologicznie aktywnych.

Pierwszą wybraną klasą amin heteroaromatycznych były 2-aminobenzo[d]tiazole. Z tego powodu, że zdecydowana większość uzyskanych wcześniej amidów **MPA** zawierała ten motyw heterocykliczny w swej strukturze, był to wybór niemal oczywisty. Ze względu na dostępność substratów oraz brak zastosowania modeli pochodnych karbonylowych oraz pochodnej jodowanej w poprzednich badaniach, postanowiłem otrzymać te związki.

Choć istnieją metody bardziej efektywne i ekologiczne, dostępność reagentów przeważała na korzyść transformacji prowadzonej w oparciu o anion rodankowy oraz brom cząsteczkowy, w lodowatym kwasie octowym [178]. Pomimo odtworzenia warunków reakcji przedstawionych w cytowanej publikacji, wydajności tych przemian znacząco odbiegała od tej podanej w literaturze. Głównym problemem prezentowanych w literaturze warunków tej transformacji jest temperatura jej prowadzenia. Autorzy często zalecają utrzymywanie temperatury reakcji poniżej 10°C w trakcie wkraplania roztworu bromu w kwasie octowym. Jest to istotna nieścisłość, gdyż badacze nie uwzględniają temperatury krzepnięcia lodowatego kwasu octowego, która wynosi około 16-17°C, lub nie wskazują jednoznacznie jego stężenia. Przyjęło się, iż pojęcie *glacial acetic acid*, tłumaczone jako lodowaty kwas octowy, oznacza stężenie masowe równe niemal 100% tej substancji. Istnieje wariant zwany esencją octową, w którym stężenie masowe kwasu octowego wynosi 80% i ma on już inną charakterystykę fizykochemiczną. Niemożliwe jest zatem prowadzenie tej reakcji w przytoczonych warunkach, gdyż spowoduje to wykrystalizowanie rozpuszczalnika i niemożliwość mieszania układu. Niehomogeniczność mieszaniny sprawia, że wkraplany roztwór bromu cząsteczkowego punktowo przegrzewa reagenty, prowadząc do uzyskania produktów ubocznych i nietypowego zabarwienia odzyskiwanych produktów. W tym przypadku, choć błąd logiczny został wyeliminowany, wydajność znacząco spadła. Niemniej, planowane 6-podstawione 2-aminobenzo[d]tiazole zostały otrzymane z sukcesem, a ich czystość była zadowalająca, co określono przy pomocy techniki ^1H NMR. Metod otrzymywania tych cząsteczek nie optymalizowano. Były prowadzone próby przeprowadzenia reakcji kondensacji pomiędzy pochodną jodowaną a **MPA**, jednak nie powiodły się one (warunki reakcji takie same jak w przypadku pozostałych 2-aminobenzo[d]tiazoli).



Rysunek 35. Wzór strukturalny 2-(2-amino-4-tiocyanobenzo[d]tiazol-6-ylo)octan metylu

W trakcie próby przeprowadzenia 4-aminofenylooctanu metylu w odpowiednią pochodną 6-podstawioną (co nie jest opisane w części eksperymentalnej), zauważono, że powstaje produkt inny niż zakładany. Zła kontrola temperatury wynikająca z balansowania na granicy krzepnięcia kwasu octowego powoduje, że reakcja staje się zbyt gwałtowna. Analiza ^1H i ^{13}C NMR, a także technika HSQC pozwoliły wywnioskować, że tworzy się 2-(2-amino-4-tiocyanobenzo[d]tiazol-6-ylo)octan metylu (jego wzór strukturalny podano na **Rysunku 35**). Stałe sprzężenia pików aromatycznych wskazywały na sprzężenie dalekiego zasięgu (około 1,2 Hz), stąd wynika wniosek o pozycji podstawienia. Sytuacja ta podkreśla istotność problemu kontroli temperatury w przytoczonych warunkach, a także daje przesłanki co do zachodzenia mechanizmu substytucji elektrofilowej w układzie aromatycznym, jakiemu ulega wygenerowany w reakcji bromu cząsteczkowego i anionu rodankowego elektrofil.

Kolejnym potencjalnym kierunkiem poszerzenia puli amidów **MPA** było otrzymanie 2-aminotiazoli, jako odpowiedników benzo[d]tiazoli, bez dokondensowanego pierścienia, w syntezie tej pierwszej grupy cząsteczek. Choć w literaturze chemicznej związki takie są opisane [175, 177], nie prowadzono jednak systematycznych badań nad zależnością struktura-aktywność dla takiej klasy, w szerszym ujęciu grup heterocykli.

W trakcie otrzymywania 2-aminotiazoli posiłkowałem się transformacjami biegnącymi z udziałem tiomocznika i odpowiedniego związku karbonylowego. Ze względu na chęć uniknięcia pracy z toksycznym bromem, postanowiłem skorzystać z metod bazujących na cząsteczce jodu i zachodzącej w układzie reakcji α -jodowania *in situ*, którego produkt reaguje *in statu nascendi* z obecną cząsteczką tiomocznika [179] lub podejścia zakładającego dodatek tlenku miedzi(II) [180]. Dzięki tym metodom, udało mi się uzyskać 3 pochodne 2-aminotiazolu, podstawione w pozycji 4 lub 5, choć z bardzo niskimi wydajnościami. Jest to jednak spójne ze słabymi efektami reakcji w cytowanych pracach. Na obniżenie wydajności mógł wpływać również fakt, że nie zawsze zachowywane były warunki sterylne, a dodatek wody może wpływać na przebieg reakcji [180]. Metod otrzymywania tych cząsteczek nie optymalizowano. Udało się przeprowadzić reakcję kondensacji pomiędzy jedną z przygotowanych amin, 2-amino-4-metylotiazolem, a **MPA**, co zostało opisane wyżej.

Ostatnią klasą omawianych w tym miejscu amin heteroaromatycznych są 2-amino-1,3,4-oksadiazole. Koncepcja przeprowadzenia kondensacji pomiędzy **MPA**, a tym rodzajem amin zrodziła się w momencie uzyskania wyników badań biologicznych, które wyszły szczególnie korzystnie dla pochodnej benzoksazolowej, **A2** (*vide infra*), w której obecne są dodatkowe atomy tlenu i azotu.

Skorzystałem z metodologii oksydatywnej cyklizacji, w której produkt przejściowy — semikarbazon — ulega reakcji z cząsteczką jodu, w obecności zasady, co prowadzi do produktu cyklicznego [145]. Prostota reakcji, a także dostępność reagentów sprawiły, że wybrałem ten wariant. Produkty udało się otrzymać z umiarkowanie dobrymi wydajnościami, a ich struktury określić przy pomocy techniki ^1H NMR. Obecność pików pochodzącego od grupy aminowej, a także zanik sygnałów typu amidowego wskazywały na utworzenie zakładanego produktu. Metod otrzymywania tych cząsteczek nie optymalizowano. Nie udało się przeprowadzić reakcji

kondensacji pomiędzy tymi aminami a **MPA** w warunkach przyjętych dla innych amin heteroaromatycznych, najpewniej ze względu na ich słaby charakter nukleofilowy.

6.2.3. Badania biologiczne

W niniejszym punkcie rozdziału znajduje się opracowanie odnoszące się do badań biologicznych nowych, amidowych pochodnych **MPA**. Eksperymenty te obejmują: analizę cytotoksyczności, właściwości antyproliferacyjnych, a także określenie cyklu apoptozy i mechanizmu działania (test GMP), które związane są z potraktowaniem komórek PBMC i T-Jurkat otrzymanymi wcześniej związkami. Badania te zostały wykonane w oparciu o sprzęt i zasoby Zakładu Immunologii Klinicznej i Transplantologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, a także o materiały zakupione z wewnętrznego dofinansowania (działania statutowe; nr zadania: 02–10022/272). Eksperymenty te oraz opracowanie wyników wykonała dr hab. inż. Dorota Iwaszkiewicz-Grześ z Zakładu Immunologii Klinicznej i Transplantologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

6.2.3.1. Aktywność cytotoksyczna w odniesieniu do linii komórek T-Jurkat oraz PBMCs

Tabela 4. Cytotoksyczność amidowych pochodnych **MPA** wobec komórek PBMC i T-Jurkat, ustalone w oparciu o test XTT

Symbol związku	PBMCs		T-Jurkat	
	IC ₅₀ [μM]	Przeż. [%]	IC ₅₀ [μM]	Przeż. [%]
A1	74,570 ± 0,040*	—	—	68
A2	15,923 ± 0,009	—	1,326 ± 0,002	—
A3	94,538 ± 0,047	—	—	74
A4	24,639 ± 0,015	—	37,789 ± 0,002	—
A5	45,730 ± 0,023	—	75,040 ± 0,005	—
A6	55,487 ± 0,028	—	31,407 ± 0,002	—
A7	70,480 ± 0,035	—	10,739 ± 0,003	—
A8	93,196 ± 0,047 (↓)	—	51,124 ± 0,008	—
A9	94,600 ± 0,047 (↓)	—	85,700 ± 0,004	—
A10	129,408 ± 0,064	—	—	51
A11	139,858 ± 0,070* (↓)	—	—	56
A12	62,975 ± 0,031* (↓)	—	12,833 ± 0,008*	—
A13	63,173 ± 0,032*	—	58,069 ± 0,002	—
A14	81,482 ± 0,041*	—	34,749 ± 0,003	—
A15	137,633 ± 0,069* (↓)	—	12,717 ± 0,005	—
A16	54,578 ± 0,027 (↓)	—	—	69
A17	— (↓)	65	—	82
A18	74,426 ± 0,037*	—	10,261 ± 0,001	—
MPA	10,522 ± 0,015	—	0,509 ± 0,008	—

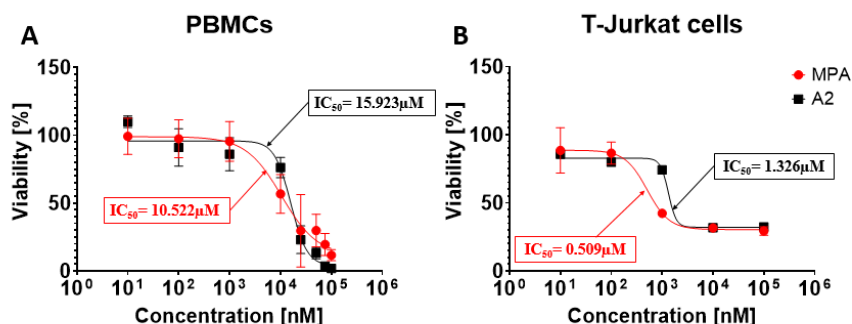
Istotność statystyczna wyników została obliczona na podstawie testu T-studenta; wyniki istotne statystycznie oznaczono: * (p < 0,05), z **MPA** jako związkiem odniesienia; (↓) — związek wytrącający się; przeż. = przeżywalność.

W Tabeli 4 zestawione zostały wartości współczynników IC₅₀ dla testowanych pochodnych **MPA** (**A1-A18**), które osiągnięto działając nimi na komórki PBMC i T-Jurkat, w warunkach testu XTT. W odniesieniu do eksperymentów na linii komórek PBMC, każda ze analizowanych pochodnych prezentowała niższą cytotoksyczność od odnośnikowego **MPA**. Podobne wnioski można wysnuć na podstawie prób wykonanych na linii komórek T-Jurkat, jednak pochodna **A2** posiada najbliższe co do wartości, właściwości cytotoksyczne podobne do **MPA**. W związku z ograniczoną rozpuszczalnością związków: **A8**, **A9**, **A11**, **A12**, **A15**, **A16** i **A17**

w pożywce, trudno było określić wiarygodne wyniki pomiarów na PBMCs. W przypadku linii komórek T-Jurkat, wartości współczynnika IC_{50} dla niektórych związków były także niemożliwe do określenia, i w tym wypadku określono procent przeżywalności komórek w najwyższym badanym stężeniu, w oparciu o technikę wykluczenia błękitu trypanowego (dla **A1**, **A3**, **A10**, **A11**, **A16** i **A17**). Test ten oparty jest na zmiennej przyswajalności tego barwnika przez komórki z uszkodzoną błoną komórkową i komórki zdrowe.

Pomimo trudności w jednoznacznym odbiorze otrzymanych wyników, możliwe jest określenie ogólnej tendencji w zależności właściwości cytotoksycznych od rodzaju (struktury) wbudowanego do rdzenia **MPA** członu heteroaromatycznego. Każdy z dodanych rdzeni powodował jednoznaczne obniżenie cytotoksyczności pochodnej w stosunku do odnośnikowego **MPA**, nawet o kilka rzędów wielkości w wymiarze współczynnika IC_{50} . Położenie grupy aminowej w układzie heterocyklicznym również nie pozostaje bez znaczenia — pochodne **A1**, **A4** i **A5** wskazują, że 6-aminowane benzotiazole są najsilniej toksyczne wobec komórek PBMC spośród pozostałych wariantów. Podobną korelację można zaobserwować w przypadku benzoksazoli (**A2** i **A6**). Choć zależność rodzaju podstawnika w funkcjonalizowanych benzotiazolach, na ten parametr biologiczny jest niełatwa do określenia, możliwe jest znalezienie trendu wskazującego na to, że grupy o charakterze donorowym obniżają cytotoksyczność pochodnych (**A13**, **A14** i **A10** w odniesieniu do **A18**). W podobny sposób można określić tendencje w przypadku pomiarów na linii T-Jurkat, gdzie wskazuje ona na to, że im silniej akceptorowy charakter ma grupa, tym ponownie, cytotoksyczność jest mniejsza (porównano **A8**, **A9** i **A15**). Pochodne halogenowane wpływają na wzrost cytotoksyczności (**A12-A14**), a przybór elektroujemności pierwiastka wzmacnia tę odpowiedź biologiczną. Warto także odnotować, iż pochodne 6-podstawione i 4-podstawione (**A12** i **A18**) nie różnią się znacząco w tym kontekście.

Najważniejszym wnioskiem płynącym z tych eksperymentów jest fakt, iż pochodna **A2** jest najsilniej cytotoksyczna, zarówno wobec komórek PBMC, jak i T-Jurkat, choć nadal słabiej niż odnośnikowy **MPA**. Pozostałe amidy są już wyraźniej mniej toksyczne i możliwe jest zgrubne określenie dla nich zależności struktura-aktywność (rodzaj podstawnika, położenie grupy aminowej). Podstawniki bogate w elektrony zdają się wzmacniać cytotoksyczność analizowanych pochodnych, jednak ta tendencja wymagałaby dodatkowego potwierdzenia, gdyż ograniczona rozpuszczalność pochodnych ogranicza wiarygodność wyniku.



Rysunek 36. Krzywa zależności odpowiedź-dawka determinująca wartość współczynnika IC_{50} dla **MPA** i **A2**. (A) Odpowiedź ludzkich PBMCs po 96 godzinach inkubowania i (B) odpowiedź linii komórek T-Jurkat po 48 godzinach inkubowania w pożywce, z następczym zadaniem ich odczytnikiem XTT na 24 godziny; oba rodzaje komórek były hodowane w obecności różnych stężeń badanych związków (100; 75; 50; 25; 10; 1; 0,1 i 0,01 μM ; **MPA** (czerwone); **A2** (czarne)). Każdy punkt pomiarowy odpowiada trzem niezależnym eksperymentom, a ilościowo — średniej arytmetycznej $\pm$ odchylenie standardowe. Wykaz znaczeń: *T-Jurkat cells* — komórki T-Jurkat; *viability* — przeżywalność; *concentration* — stężenie molowe.

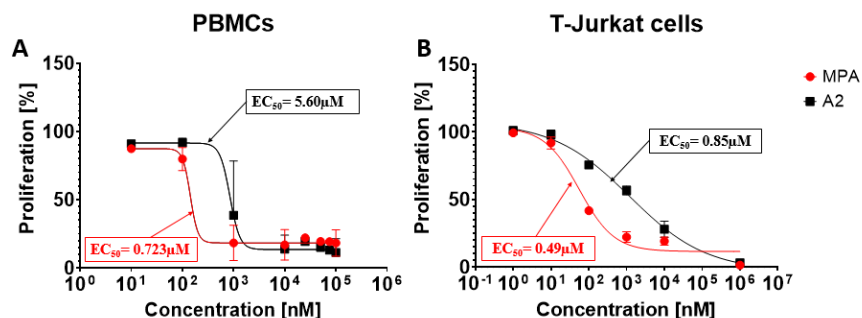
Na **Rysunku 36** zaprezentowano krzywą odpowiedzi biologicznej (przeżywalność w funkcji stężenia) dla kilku stężeń **MPA** i **A2** w odpowiednim medium. Na tej podstawie określona została wartość współczynnika IC_{50} dla obu substancji. Tak jak wspomniano już wcześniej, **A2** jest mniej cytotoksyczny wobec obu linii komórkowych, co także widać na tych wykresach, niż referencyjny **MPA**.

6.2.3.2. Aktywność antyproliferacyjna w odniesieniu do linii komórek T-Jurkat oraz PBMCs

Tabela 5. Aktywność antyproliferacyjna amidowych pochodnych **MPA** wobec komórek PBMC i T-Jurkat, ustalone w oparciu o test VPD450

Symbol związku	PBMCs		T-Jurkat	
	EC_{50} [μM]	Proliferacja [%]	EC_{50} [μM]	Proliferacja [%]
A1	—	82	—	—
A2	$5,601 \pm 0,022$	—	$0,850 \pm 0,004$	—
A3	$119,600 \pm NAN^{**}$	—	—	55
A4	$62,260 \pm 0,010$	—	$14,730 \pm 0,074$	—
A5	$76,980 \pm 0,010^*$	—	$36,050 \pm 0,180$	—
A6	$58,270 \pm 0,021$	—	$13,840 \pm 0,069$	—
A7	$29,450 \pm 0,025$	—	$9,510 \pm 0,047$	—
A8	$133,500 \pm 0,007^*(\downarrow)$	—	$22,040 \pm 0,110$	—
A9	$136,200 \pm 0,011(\downarrow)$	—	$22,720 \pm 0,113$	—
A10	$85,240 \pm 0,012^{**}$	—	$26,690 \pm 0,133$	—
A11	$83,070 \pm 0,012^{**}(\downarrow)$	—	$63,210 \pm 0,316$	—
A12	$38,370 \pm 0,017(\downarrow)$	—	$12,160 \pm 0,061$	—
A13	$39,470 \pm 0,013$	—	$12,640 \pm 0,063$	—
A14	$30,710 \pm 0,008$	—	$12,580 \pm 0,063$	—
A15	$44,590 \pm 0,013(\downarrow)$	—	$13,370 \pm 0,067$	—
A16	$46,290 \pm 0,011(\downarrow)$	—	—	73
A17	$82,140 \pm NAN^{***}(\downarrow)$	—	—	69
A18	$14,700 \pm 0,020$	—	$11,280 \pm 0,056$	—
MPA	$0,723 \pm 0,011$	—	$0,490 \pm 0,002$	—

Istotność statystyczna wyników została określona na podstawie testu T-studenta; wyniki istotne statystycznie oznaczono: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) lub *** ($p < 0.001$), z **MPA** jako związkiem odniesienia; NAN — niemożliwe do określenia; ($\downarrow$) — związek wytrącający się.



Rysunek 37. Krzywa zależności odpowiedź-dawka determinująca wartość współczynnika EC_{50} dla **MPA** i **A2**. **(A)** Ludzkie PMBCs, znakowane barwnikiem VPD 450, były hodowane w obecności różnych stężeń badanych związków (100; 75; 50; 25; 10; 1; 0,1 i 0,01 μM ; **MPA** (czerwone) i **A2** (czarne)), a następnie stymulowane przeciwciałami przeciwko CD3 i CD28, osadzonymi na drobinach magnetycznych, przez 72 godziny. **(B)** Komórki T-Jurkat, znakowane barwnikiem VPD 450, były inkubowane w obecności różnych stężeń badanych związków (100; 10; 1; 0,1 i 0,01 μM ; **MPA** (czerwony); **A2** (czarny)) przez 48 godzin. Proliferacja komórek była analizowana z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Wyniki wyrażono w postaci średniej arytmetycznej $\pm$ odchylenie standardowe. Wykaz znaczeń: *T-Jurkat cells* — komórki T-Jurkat; *proliferation* — proliferacja; *concentration* — stężenie molowe.

Aktywność antyproliferacyjną **MPA** oraz testowanych, amidowych pochodnych, była określana przy pomocy techniki wybarwiania barwnikiem VPD 450 (ang. *violet proliferation dye 450*) w oparciu o zliczanie przy pomocy cytometru przepływowego. Metodologia ta została wybrana z tego względu, że stosowany barwnik fluorescencyjny charakteryzuje się niską cytotoksycznością, a także możliwe jest obserwowanie wygaszania fluorescencji przy podziale komórkowym [181].

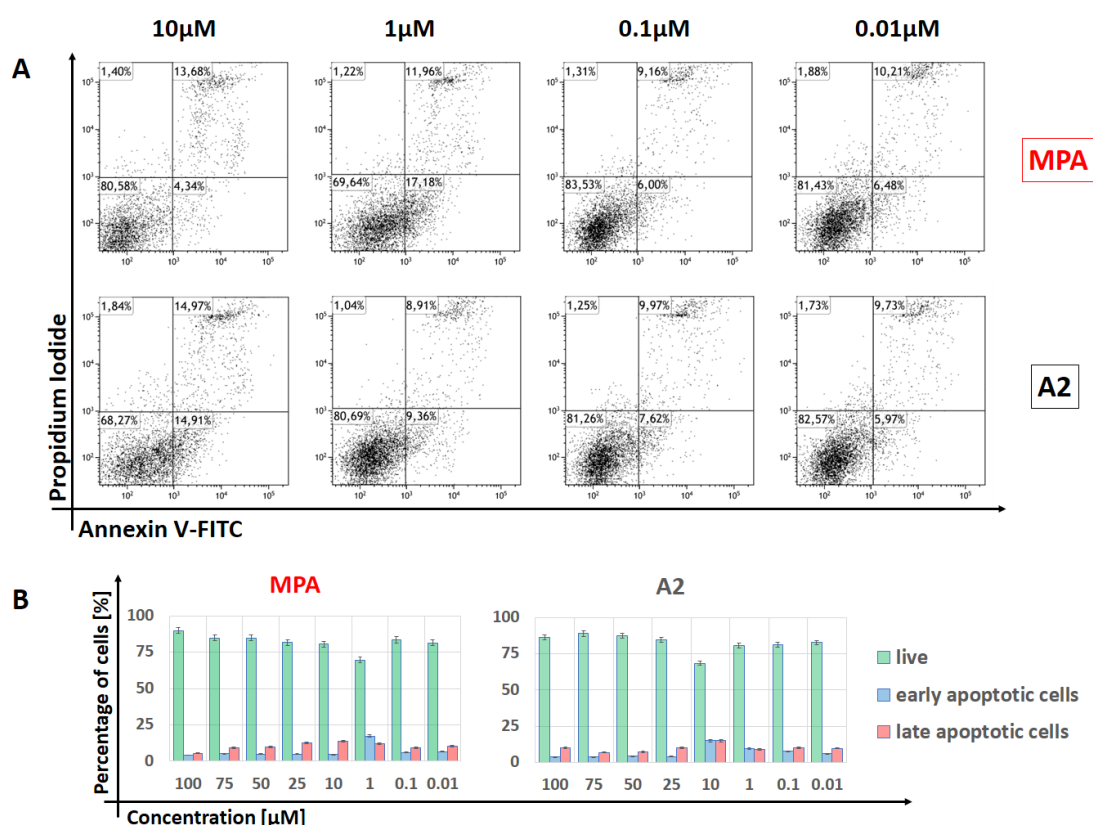
Wyniki tych eksperymentów zaprezentowane są w dwójnasób, to jest, w formie tabeli (**Tabela 5**) oraz krzywej odpowiedzi biologicznej, zależnej od stężenia (**Rysunek 37**). Wynika z nich, że wszystkie pochodne mają wartość współczynnika EC_{50} większą, niż referencyjnego **MPA**, zarówno wobec komórek PMBC i T-Jurkat. Najlepszą aktywną antyproliferacyjną wykazuje pochodna **A2**, z wartością EC_{50} równą 5,601 μM (PBMCs) i 0,850 μM (T-Jurkat). Biorąc jednak pod uwagę, że każdy z analizowanych amidów jest mniej cytotoksyczny niż związek odniesienia, może stanowić to przyczynek do wyznaczenia odpowiedniego kandydata-cząsteczkę pod dalsze badania biologiczne. Ponadto, w przytoczonych warunkach dodatek DMSO i czynnika solubilizującego (Tween-20) nie spowodował zmiany w proliferacji komórek, co pozwala przypuszczać, iż prezentowana powyżej aktywność antyproliferacyjna jest zależna jedynie od obecności **MPA**, czy też jego amidowych pochodnych (**A1-A18**).

Ponownie jak w przypadku **Tabeli 4**, zależności struktura-aktywność ma jedynie charakter przybliżony. W warunkach linii komórek PMBC możliwe jest zauważenie, że pochodna benzo[d]tiazolu, aminowanego w pozycji 6 prezentuje silniejsze właściwości antyproliferacyjne niż jej 5-podstawiony odpowiednik (**A4** i **A5**). Niestety, niemożliwe było określenie aktywności pochodnej **A1**, mogącej uzupełnić ten analizowany szereg. W przypadku pochodnych benzo[d]oksazolu, **A5** zaprezentował pogorszoną aktywność antyproliferacyjną niż jego odpowiednik **A2**, wskazując ponownie, że położenie grupy aminowej ma kluczowe znaczenie dla bioaktywności tych cząsteczek. W przypadku derywatów podstawionych, możliwe jest wyraźne

oddzielenie aktywności biologicznej wariantów halogenowanych od reszty pochodnych. Pochodne: **A12** (6-Cl), **A13** (6-Br), a także **A14** (6-CF₃) przejawiają podwyższone zdolności do hamowania proliferacji PBMCs, w odniesieniu do **A8** (6-OMe) i **A9** (6-Me), zaś pochodna fluorowana **A11**, nie wpisuje się w ten trend. Położenie grupy metoksyowej, bądź atomu chloru, wpływa także na bioaktywność, jako że **A16** i **A18** prezentują wyraźnie lepsze właściwości niż odpowiadające im **A8** i **A12**. Podobny trend jest zachowany także dla wyników badań na linii komórek T-Jurkat.

Podsumowując, zaprezentowane powyżej eksperymenty biologiczne pokazały, iż żaden z uzyskanych amidów nie przewyższa swą aktywnością związku referencyjnego (**MPA**), choć jedna z pochodnych, **A2**, wykazuje zbieżność wartości współczynnika EC₅₀, na obu liniach komórkowych. Daje to pewien prognostyk co do istoty obecności atomów tlenu i azotu w dobudowywanym fragmencie, w procesach immunosupresji, a także stanowi fundament pod dalszą analizę funkcjonalizowanych układów benzo[d]oksazolowych. Choć zależności struktura-aktywność są ponownie niejasne, można wskazać, iż podstawniki o charakterze akceptorowym są zdolne do wpływania na wartość EC₅₀ bardziej, niż o innym charakterze elektronowym.

6.2.3.3. Analiza apoptozy komórkowej na PMBCs



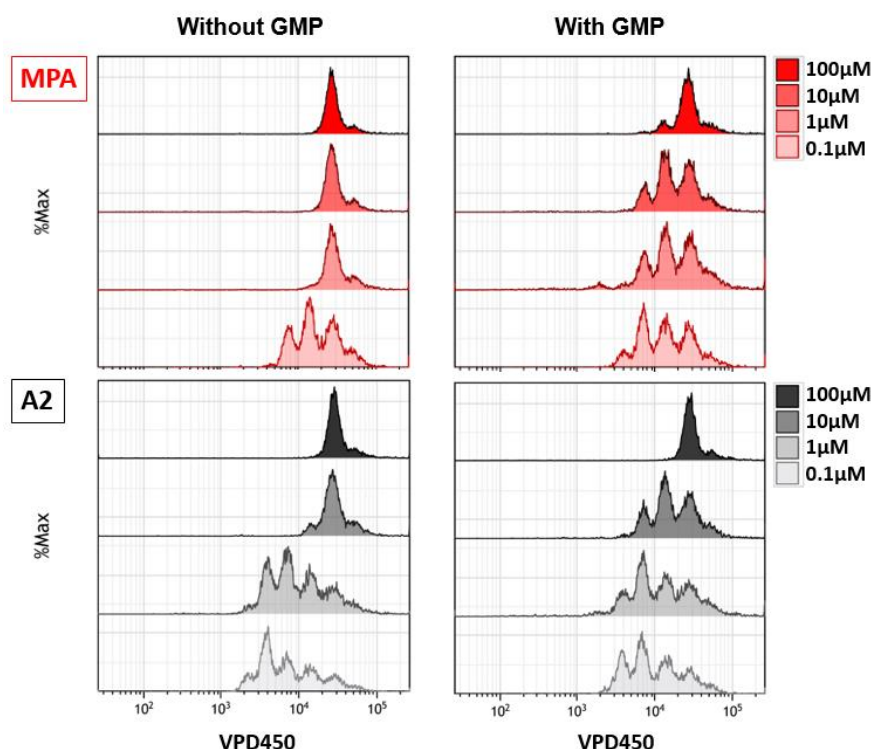
Rysunek 38. Analiza apoptozy komórkowej PMBCs w układzie barwiącym aneksyna V/jodek propidyny z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. **(A)** Diagram korelacyjny przedstawiający komórki potraktowane różnymi stężeniami badanych związków (10; 1; 0,1 i 0,01 μM; **MPA** i **A2**) przez 72 godziny, i wybarwione układem aneksyna V/FITC i jodkiem propidyny (PI). **(B)** Diagram słupkowy przedstawiający udział procentowy danego rodzaju komórek w określonym stężeniu substancji; trzy grupy komórek wyróżnialne po analizie kolorymetrycznej (fluorymetrycznej): komórki żywe (aneksyna-PI-); komórki w fazie wczesnej apoptozy (aneksyna+PI-) i komórki będące w fazie późnej apoptozy (aneksyna+PI+). Wykaz znaczeń: *propidium iodide* — jodek propidyny; *annexin V-FITC* — układ barwiący oparty na aneksynie V i barwniku fluorescencyjnym FITC; *percentage of cells* — udział procentowy komórek; *concentration* — stężenie molowe; *live* — komórki żywe, *early apoptotic cells* — komórki we wczesnej fazie apoptozy; *late apoptotic cells* — komórki w późnej fazie apoptozy.

Na **Rysunku 38** przedstawione zostały efekty działania **MPA** i **A2**, w różnych stężeniach, na komórki PMBC, w układzie barwiącym aneksyna V-jodek propidyny (PI). Metodologia ta pozwala na określenie w jakim stadium programowanej śmierci znajduje się komórka. Rozumowanie jest następujące — komórki żywe (lewa dolna ćwiartka) nie są barwione zarówno przez aneksynę V, jak i PI, gdyż w układzie nie występuje fosfatydyloseryna, świadcząca o zniszczeniu błony komórkowej, barwiona tym pierwszym składnikiem, a PI niezdolny do migracji przez błonę, nie wybarwia DNA w jądrze komórkowym. Faza wczesnej apoptozy (prawa dolna ćwiartka) związana jest z zewnętrzną ekspozycją fosfatydyloseryny i jej wybarwienie przez aneksynę V i z brakiem ubarwienia przez PI. Trzecia faza, czyli faza późnej apoptozy (prawa górna ćwiartka) charakteryzowana jest przez wzrost intensywności zabarwienia przez oba barwniki. W fazie nekrozy (lewa górna ćwiartka), w związku z brakiem występowania czynnika błonowego (uległa ona już całkowitej degradacji), barwieniu ulega jedynie DNA w jądrze komórkowym przez PI. Wyższe wartości na poszczególnych osiach oznaczają większą

ekspozycję na fosfatydyloserynę, czyli wyższy poziom związania aneksyny V (wczesna i późna apoptoza), lub większy poziom uszkodzenia błony komórkowej, czyli silniejszą fluorescencję związanego PI (późna apoptoza i martwica) [182]. Fluorescencja mierzona przez cytometr przepływowy wskazuje na poziom sygnału związany z daną cechą komórki (np. ekspozycję fosfatydyloseryny lub przepuszczalność błony dla PI) i nie reprezentuje bezpośrednio liczby komórek w odpowiedniej fazie programowanej śmierci komórkowej. Liczba ta jest reprezentowana pośrednio przez gęstość punktów w danym obszarze diagramu, wskazując ile komórek ma podobne właściwości fluorescencyjne.

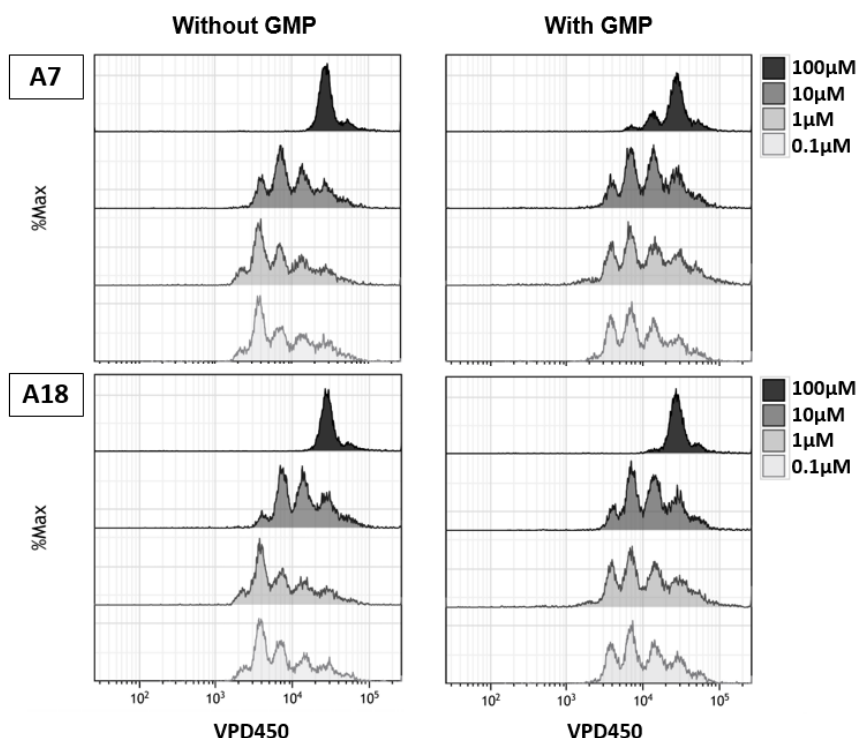
Jak zaprezentowano na powyższej grafice, traktowanie komórek PBMC roztworami **MPA** i **A2** przez 96 godzin powoduje, że w fazie późnej apoptozy komórki znajdują się przy zastosowanym stężeniu bliskim wartości EC_{50} (0,723 μ M dla **MPA**; 5,601 μ M dla **A2**). W przypadku **MPA** o stężeniu 10 μ M, można zaobserwować obecność ponad 13% komórek późnej apoptozy, ale tylko około 4% komórek wczesnej apoptozy. Sytuacja ta ulega istotnej zmianie w przypadku 10-krotnie niższego stężenia, gdzie stwierdza się ponad 17% komórek wczesnej apoptozy i ponad 11% późnej apoptozy. Choć znaczny wzrost udziału komórek wczesnej apoptozy przy spadku stężenia **MPA** z 10 μ M na 1 μ M wskazuje raczej na artefakt pomiarowy, nie zmienia to faktu, że z porównania efektów **MPA** i **A2** wynika, że **A2** działa w sposób bardziej przewidywalny, ale mniej agresywny, co jest zgodne z jego niższą cytotoksycznością. W ogólnym ujęciu, efekty obu związków są wynikiem zachodzących mechanizmów biologicznych (np. indukcja apoptozy), a nie niespecyficznej toksyczności przy wyższych stężeniach.

6.2.3.4. Test GMP



Rysunek 39. Aktywność proliferacyjna PBMCs znakowanych barwnikiem VPD 450 w obecności różnych stężeń badanych związków (100; 10; 1 i 0,1 mM; **MPA** (czerwone) i **A2** (czarne)), stymulowanych przeciwciałami przeciwko CD3 i CD28, i w końcowej fazie badań — inkubowanych z dodatkiem lub brakiem dodatku 50 μ M GMP, przez 72 godziny. Proliferacja komórek była analizowana przy użyciu cytometrii przepływowej. Próba ta jest zwana testem GMP w niniejszym opracowaniu. Wykaz znaczeń: *without GMP* — bez dodatku GMP, *with GMP* — z dodatkiem GMP.

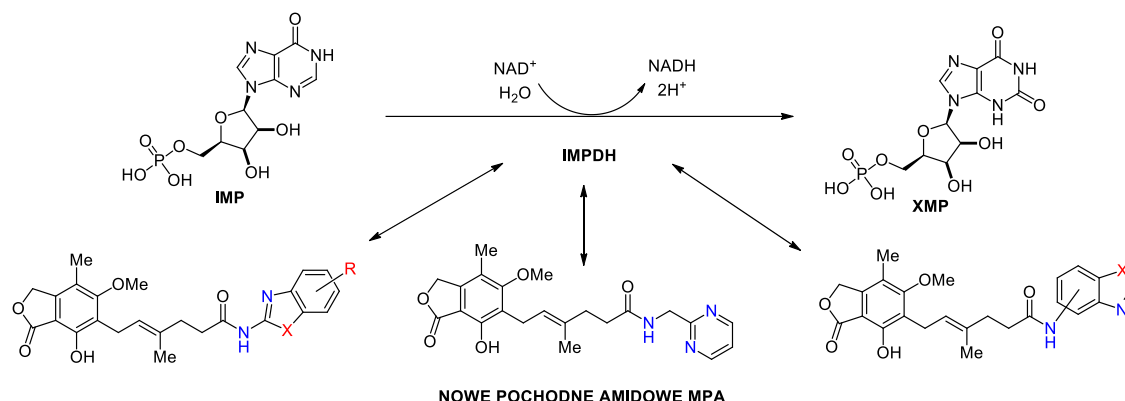
Test GMP pozwala na ocenę jak stabilny jest poziom proliferacji zdrowych komórek, tu: PBMCs, przy jednoczesnej obecności badanego inhibitora IMPDH, a także źródła guanozyny. Zakłada się, że wraz ze wzrostem stężenia inhibitora, intensywniejszym staje się hamowanie proliferacji komórek PBMC. Stabilność poziomu proliferacji oparta jest na odwracalnej naturze inhibicji enzymu IMPDH. Jeśli testowany związek nie wpływa na proliferację komórek, przy jednoczesnym dodatku GMP, tak jak to ma miejsce w przypadku **MPA** (czy też **MMF**), związek ten może być uznany za inhibitor IMPDH, działający w podobny sposób do kwasu mykofenolowego [183]. Jest to specyficzna metoda określania jakościowych zdolności inhibicji IMPDH przez różne związki (derywaty **MPA**), w oparciu o dobrze scharakteryzowany inhibitor.



Rysunek 40. Aktywność proliferacyjna PBMCs znakowanych barwnikiem VPD 450 w obecności różnych stężeń badanych związków (100; 10; 1 i 0,1 mM; **A7** i **A18**), stymulowanych przeciwciałami przeciwko CD3 i CD28, i w końcowej fazie badań — inkubowanych z dodatkiem lub brakiem dodatku 50 μM GMP, przez 72 godziny. Proliferacja komórek była analizowana przy użyciu cytometrii przepływowej. Próba ta jest zwana testem GMP w niniejszym opracowaniu. Wykaz znaczeń: *without GMP* — bez dodatku GMP, *with GMP* — z dodatkiem GMP.

Na **Rysunkach 39 i 40** wykazano, że niezależnie od zmiany stężenia inhibitora, przy stałym stężeniu GMP, proliferacja komórek jest zachowana na podobnym poziomie. Test ten był przeprowadzony dla głównych klas pochodnych amidowych, to jest: benzo[d]tiazoli (**A18**), benzo[d]oksazoli (**A2**) oraz pirymidyny (**A7**). Można zatem przypuszczać, iż transformowanie **MPA** w tego typu amidy, nie zahamuje całkowicie spodziewanych właściwości antyproliferacyjnych. Choć nie jest to najlepsza z możliwych prezentacji graficznych wyników testu GMP, jej ulepszony wariant zostanie przedstawiony w kolejnym podrozdziale.

6.2.4. Podsumowanie



Rysunek 41. Abstrakt graficzny podsumowujący pracę nad nowymi pochodnymi amidowymi **MPA**

Niniejsza praca eksperymentalna składała się z trzech części: dokowania molekularnego, syntezy oraz badań biologicznych nowych pochodnych amidowych **MPA**. Związki te zostały przebadane pod kątem siły wiązania w centrum aktywnym enzymu IMPDH, wykazując wyższe powinowactwo do tego białka niż odnośnikowy **MPA**. Następnie, przeprowadzono syntezę tych osiemnastu analizowanych cząsteczek (**A1-A18**) z wykorzystaniem aktywacji w układzie uroniowo-1-hydroksybenzotriazolowym, a także korzystając z bezwodnika kwasu propanofosfonowego. Metody te charakteryzowała na ogół umiarkowanie dobra i doskonała wydajność, a prostota wykonania zasługuje na szczególne podkreślenie. Nie było konieczne stosowanie dodatkowych grup ochronnych dla wolnej grupy fenolowej. Następnie, pochodne te przebadano pod kątem cytotoksyczności, właściwości antyproliferacyjnych, a także mechanizmu działania i fazy apoptozy komórkowej, w oparciu o linie komórek PBMC i T-Jurkat, gdzie pochodna **A2** zaprezentowała najbardziej obiecujące właściwości. Choć kilka analizowanych związków charakteryzowała silnie ograniczona rozpuszczalność w warunkach testów, możliwe było zgrubne określenie zależności struktura-aktywność w oparciu o charakter elektronowy podstawników, położenie grupy aminowej, a także rodzaj heteroatomu. Wprowadzenie tych układów heterocyklicznych do rdzenia **MPA** spowodowało istotne obniżenie pierwotnej cytotoksyczności tej cząsteczki, bez zmiany podstawowego mechanizmu działania (inhibicja IMPDH). Obniżona cytotoksyczność tych cząsteczek w stosunku do zdrowych komórek daje pewną przesłankę, iż związki te mogą w przyszłości posłużyć jako punkt wyjścia przy projektowaniu chemoterapeutyków. Niekiedy, jednoczesne obniżenie cytotoksyczności i aktywności proliferacyjnej może doprowadzić do uzyskania pozytywnego wyniku, tak jak opisywano to w przypadku amidowego koniugatu: **MPA**-kwas chinowy [42].

Na podstawie tej klasy pochodnych **MPA**, wysnuto wnioski o istotności atomu azotu i tlenu w aktywności immunosupresyjnej, a także o możliwości wykorzystania takiej klasy związków w inhibicji deacetylaz histonowych [41, 164]. Stanowi to więc podwaliny pod otrzymywanie pochodnych bioizosterycznych **MPA**, zaprezentowanych w ostatnim podrozdziale.



Na **Rysunku 41** znajduje się abstrakt graficzny, który podsumowuje omawianą tematykę i przeprowadzone badania.

6.3. Estrowe pochodne MPA

6.3.1. Synteza

W niniejszym punkcie rozdziału znajduje się opracowanie odnoszące się do syntezy nowych, estrowych pochodnych **MPA**, a także niektórych substratów koniecznych do ich otrzymania. Badania te zostały wykonane w oparciu o sprzęt i zasoby Katedry Chemii Organicznej Politechniki Gdańskiej, a także o materiały zakupione z wewnętrznego dofinansowania (Minigrant; nr zadania: DS035136).

6.3.1.1. Estry zbudowane z rdzenia MPA oraz komponentu fenolowego

Na **Schemacie 61** znajduje się zestawienie wyników reakcji otrzymywania estrowych pochodnych **MPA** z wykorzystaniem metody Steglich'a. Pochodne te zostały podzielone na dwie podklasy: **MP** — metoksylované fenole (ang. *methoxylated phenols*) i **P** — fenole (ang. *phenolics*). Podział ten jest czysto techniczny, pozwalający na bardziej przystępne rozdzielenie pochodnych i tym samym na prostszy ich odbiór. W klasie **MP** znajdują się pochodne: **MP1** — gwajakol, **MP2** — syryngol, **MP3** — aldehyd syryngowy, **MP4** — wanilina, **MP5** — dehydrozingron, **MP6** — zingeron, **MP7** — ferulan metylu, **MP8** — eugenol i **MP9** — izoeugenol. W podgrupie **P**: **P1** — sezamol, **P2** — tymol, **P3** — bakuchiol, **P4** — o-kumaran metylu, **P5** — 4-hydroksybenzaldehyd, **P6** — dehydroframbinon, **P7** — keton malinowy. Dobór niniejszych substratów oparty był o analizę źródeł literaturowych, a częścią wspólną właściwości dobranych związków fenolowych była ich aktywność przeciwutleniająca i, często, przeciwzapalna. W opracowaniu teoretycznym tej pracy znajduje się szczegółowe omówienie właściwości poszczególnych fenoli pochodzenia naturalnego.

Synteza tej klasy estrowych pochodnych **MPA** była możliwa dzięki zastosowaniu protokołu reakcji Steglich'a [184, 185]. Metoda ta oparta jest na łatwo dostępnych reagentach, a także nie wymaga zastosowania ochrony wolnej grupy fenolowej **MPA**. Niewątpliwie, ugrupowanie to może stanowić nukleofil konkurencyjny wobec używanych związków fenolowych, jednak produktu zakładanej makrolaktonizacji nie obserwuje się. Możliwe jest, że związek ten powstaje, jednak w czasie obróbki ekstrakcyjnej ulega hydrolizie do **MPA**. Ta sytuacja przekłada się na istotnie zredukowaną wydajność przedstawionych tu przemian. Zastosowanie protokołu reakcji Mukaiyamy [186] dla wybranych fenoli, także dało oczekiwane produkty, jednak w podobnym wymiarze wydajności. Dodatkowo ta druga metoda generuje trudne do usunięcia żółte wybarwienia pochodzące od tworzącego się piryd-2-onu, jako produktu ubocznego, a stopień konwersji reagentów dla wielu słabo nukleofilowych fenoli był zerowy. Podjęta została także próba oparta o chlorki kwasowe, tu: estryfikacja Yamaguchiego [187], jednak nie doprowadziła do zamierzonego produktu.

Efektem poszukiwania najbardziej optymalnej metody syntezy estrowych pochodnych **MPA** była reakcja wykorzystująca cząsteczkę **MPA** z chronioną grupą fenolową. Do osłony

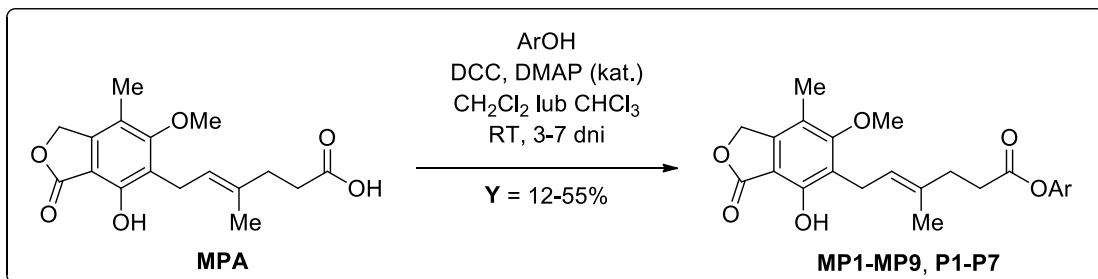
wykorzystano motyw *t*-butylodimetylosililowy (TBDMS). Pochodna ta w warunkach reakcji Stechlicha dała zdecydowanie wyższą wydajność otrzymywania pochodnej dehydrozingeronu, na poziomie 70%, jednak późniejsze usuwanie ochrony sililowej, pod wpływem roztworu fluorku tetrabutyloamoniowego (TBAF) w THF, doprowadziło do znacznej redukcji wydajności ze względu na dodatkowy etapy syntezy. Końcowy efekt był taki sam, jak opisywano wcześniej dla **MPA**, bez ochrony funkcji fenolowej. Warto też dodać, iż w obecności grupy sililowej przeprowadzano już wcześniej syntezę estrowych i akrydynowych pochodnych **MPA** [174]. Wydajności tych przemian były na poziomie 40-60%.

Podobnie niską wydajność reakcji otrzymano w przypadku syntezy pochodnej kurkuminowej **MPA**, wynosiła ona 16% [188]. W tym wariancie użyto aktywacji EDCI w obecności DMAP (także reakcja Steglicha) jako katalizatora, w acetonie jako rozpuszczalniku, w obniżonej temperaturze. Czas reakcji był wyjątkowo krótki i wynosił 30 min. Najpewniej autorzy chcieli zapobiec podwójnemu acylowaniu kurkuminy. Ponadto, wskazują oni na podobnie niskie wydajności otrzymywanych koniugatów **MPA** i kurkuminy w literaturze. Warto dodać, iż EDCI jest lepszą alternatywą wobec DCC, ze względu na niższą toksyczność powstających produktów ubocznych, a także na prostsze ich usuwanie z mieszaniny poreakcyjnej. Wybór DCC wynikał wprost z dostępności tego odczynnika w czasie prowadzenia reakcji.

Niniejsza metoda nie była dalej optymalizowana. Na tę sytuację miało wpływ kilka różnych czynników. Jako pierwszy z nich wymieniam priorytet badań biologicznych. Istotą całego wątku badawczego było wykazanie, czy określone estry mają właściwości przeciwutleniające. Ponadto, różnorodność strukturalna stosowanych fenoli uniemożliwiłaby mi przeprowadzenie poprawnej optymalizacji metody syntezy, w rozsądnym wymiarze czasowym. Już samym prognostykiem wskazującym na różną reaktywność tych związków naturalnych była niemożność otrzymania niektórych estrów **MPA** wykorzystując metodę Mukaiyamy. Badania te mają charakter eksploracyjny, dlatego istotne jest uzyskanie jak największej puli związków, w jak najkrótszym czasie. Choć wykorzystanie **MPA** z ochroną sililową na grupie fenolowej, w reakcji sprzęgania ze związkiem fenolowym, daje pewne nadzieje co do podwyższenia wydajności przemiany, wykonany eksperyment nie potwierdził, iż jest to ścieżka bardziej wydajna.

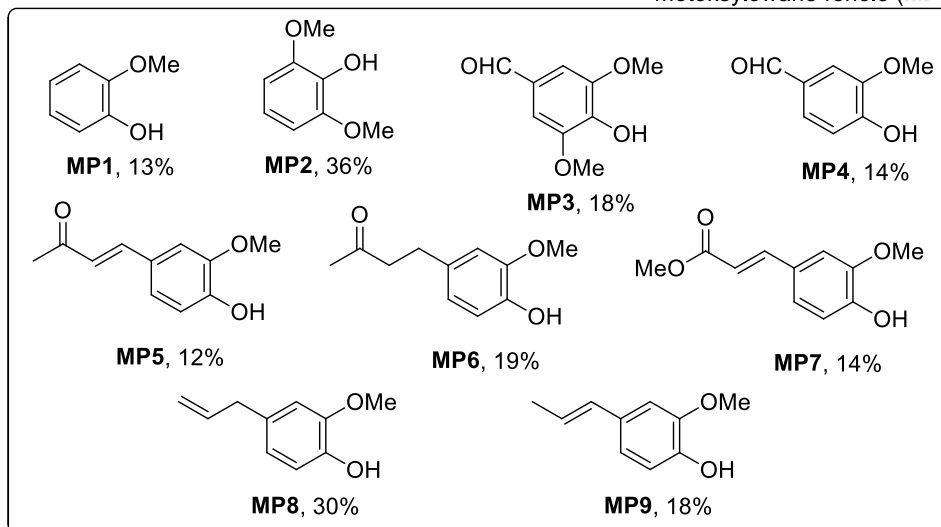
Choć wyznaczenie jasnego trendu uzależniającego wydajność otrzymywania produktu od struktury związku fenolowego nie jest możliwe, pewne zależności mogą zostać zaobserwowane. Warto mieć na uwadze, że korelacje te mogą być obarczone sporym błędem. W ramach podgrupy **MP**, wydajność reakcji rośnie wraz ze wzrostem liczby podstawników metoksyłowych (**MP1**, **MP2** i **MP3**). Spadek wydajności notowany jest przy dodaniu grupy o charakterze akceptorowym do układu aromatycznego w sposób: bezpośredni (**MP2** i **MP3**), a także niebezpośredni (**MP5** i **MP7** oraz **MP6**, **MP8** i **MP9**). Z drugiej zaś strony, w podklasie **P**, trudno jest dostrzec jakiegokolwiek zależności wynikające ze spadku nukleofilowości grupy fenolowej. Dla obu klas efekt steryczny również może mieć pewne znaczenie.

ESTRYFIKACJA STEGLICHA



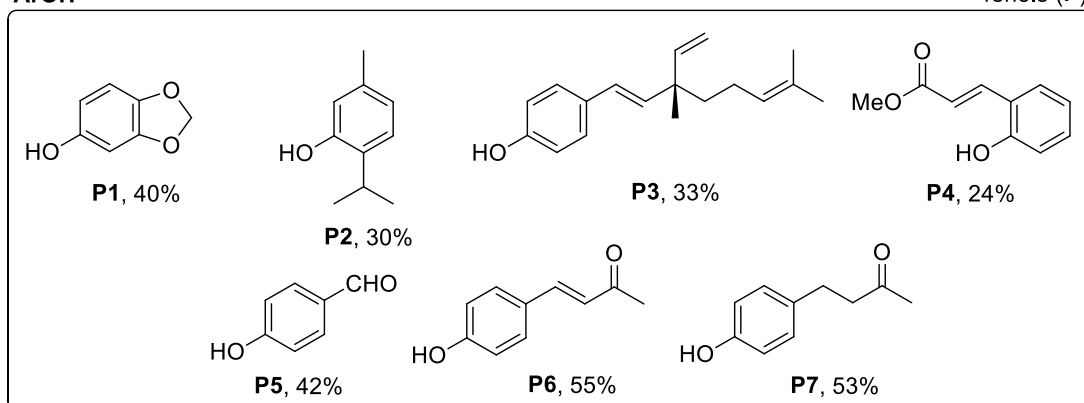
ArOH

metoksylowane fenole (MP)



ArOH

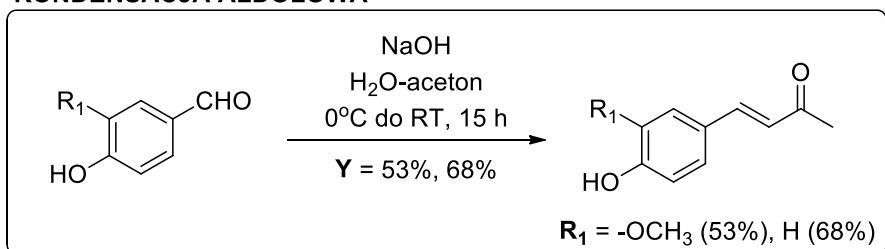
fenole (P)



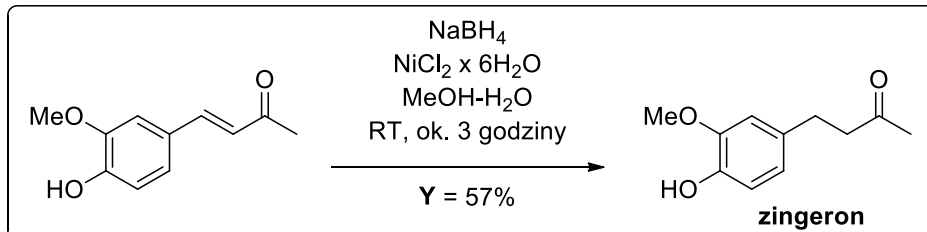
Schemat 61. Zestawienie wydajności procesów otrzymywania estrów **MPA** wg procedury estryfikacji Steglicha

6.3.1.2. Synteza wybranych komponentów fenolowych

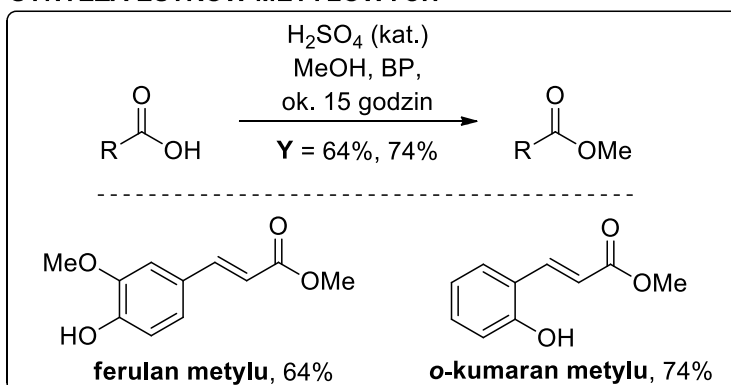
KONDENSACJA ALDOLOWA



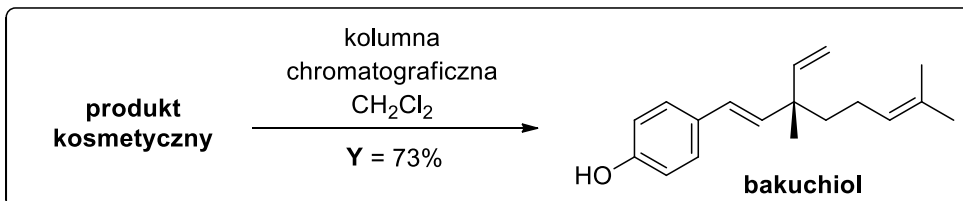
SELEKTYWNA REDUKCJA



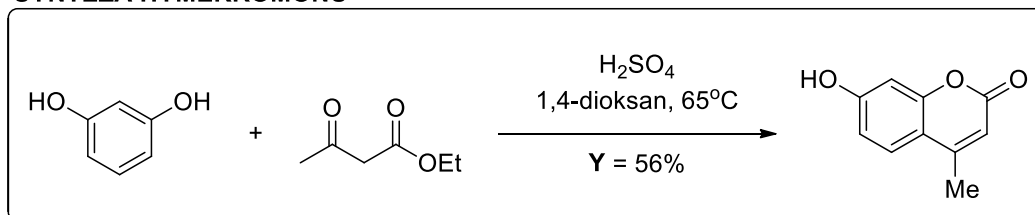
SYNTEZA ESTRÓW METYLOWYCH



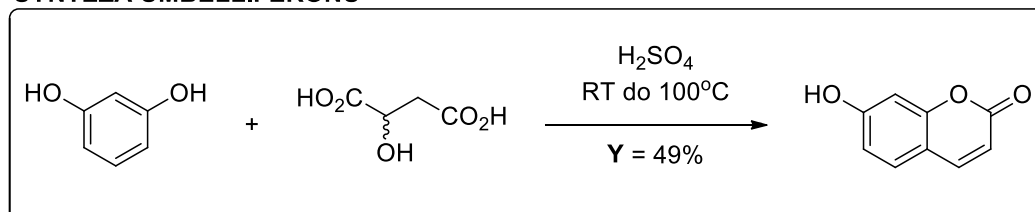
IZOLACJA CHROMATOGRAFICZNA



SYNTEZA HYMEKROMONU



SYNTEZA UMBELLIFERONU



Schemat 62. Zestawienie wyników otrzymywania związków fenolowych

Istotnym założeniem niniejszego opracowania jest fakt, iż związki fenolowe spotykane są w naturze, a dokładnie w ziołach i ich mieszkach, a także w konkretnych częściach roślin. Sugerowałby to, że pozyskiwanie ich jest dokonywane metodą izolacji z materiału biologicznego. Ze względu na to, że często nie jest to proces zachodzący z wysoką wydajnością, konieczne było opracowanie drogi alternatywnej opartej na syntezie organicznej lub na izolacji z półproduktów. Bardziej szczegółowo opisano to już wcześniej w rozdziale 3. Fenolowe związki pochodzenia naturalnego.

Potrzeba otrzymania wskazanych na **Schemacie 62** związków wynika wprost z przeprowadzonego rachunku ekonomicznego. Prostota reakcji, a także wysoka dostępność substratów skłoniły mnie do powzięcia tej drogi, jednocześnie redukując koszt pozyskania tych substancji od dostawców komercyjnych.

Analizę chciałbym rozpocząć od przykładów syntezy dehydrozingeronu oraz dehydroframbinonu, które wtórnie posłużyły w reakcji otrzymywania **MP5** i **P6**. Jest to przykład klasycznej kondensacji aldolowej, która biegnie pomiędzy dwoma związkami karbonyłowymi, gdzie cząsteczką pozbawioną protonu α jest aldehyd aromatyczny, wanilina lub 4-hydroksybenzaldehyd, zaś cząsteczką pełniącą wtórnie rolę nukleofila jest aceton, a dokładniej — jego forma deprotonowana. Rolę zasady pełnił w tej reakcji roztwór wodorotlenku sodu, a rozpuszczalnikiem zdolnym do solubilizacji aldehydu był aceton. Cząsteczka ta pełni również rolę substratu.

Reakcja ta przynależy do zbioru klasycznych transformacji związków organicznych i jest szeroko opisywana w skryptach związanych z preparatyką organiczną oraz literaturze chemicznej [78, 189, 190].

Obniżenie wydajności procesu transformacji kwasów karboksylowych w ich estry metylowe, tu: ferulan metylu i o-kumaran metylu, wynika z zastosowania silnego kwasu jako katalizatora. Zarówno substraty, jak i omawiane produkty, podatne są na polimeryzację i wybarwienie pod wpływem skrajnych warunków pH. Powoduje to konieczność oczyszczania surowych produktów technikami chromatograficznymi, bądź krystalizacji, które obniżają całkowitą wydajność procesu. Na ten efekt obniżenia efektywności reakcji może mieć również wpływ dostęp światła, a także ekspozycja na tlen z powietrza, które przy stosunkowo długim czasie prowadzenia przemiany prowadzą do powstania produktów ubocznych. W literaturze można natknąć się na zarówno na rezultaty reakcji podobne do osiągniętych tutaj przeze mnie, jak i na zdecydowanie lepsze co do wydajności [191-194]. Metody te nie były optymalizowane, a otrzymane produkty posłużyły do otrzymywania estrów **MP7** i **P4**.

Na szczególną uwagę zasługuje proces izolacji bakuchiolu z surowego preparatu kosmetycznego. Ze względu na to, iż prowadzone reakcje estyfikacji nie należą do wydajnych, konieczne było użycie większych ilości związków fenolowych. Zakupiona we wczesnym etapie planowania próbka bakuchiolu o masie 250 mg, nie wystarczyła do otrzymania ostatecznej ilości estru. Możliwe było przeprowadzenie dwóch syntez z jej udziałem oraz posłużyła za wzorzec analityczny. Konieczne było pozyskanie bakuchiolu inną drogą. W oficjalnym kanale dostępu, 250 mg bakuchiolu kosztowało 432 PLN [195] (w sklepie Merck — 1910 PLN [196]). W obliczu takiej

sytuacji, zakupiony został surowy składnik kosmetyczny, w postaci gęstego, brązowego oleju, w ilości 1 g, za około 20 PLN [197]. Dzięki oczyszczaniu metodą chromatografii cieczowej, na kolumnie, możliwa była znaczna redukcja kosztów przeprowadzenia tego eksperymentu. Choć wstępny koszt zakupu próbki z oficjalnego źródła nie został ominięty, przykład ten wskazuje jak istotne w pracy badawczej jest szukanie alternatywnych źródeł surowców. Związek ten został scharakteryzowany przy pomocy techniki ^1H NMR, a następnie użyty bez dodatkowej obróbki w syntezie estru **P3**. Związek ten podatny jest na działanie światła i żółknie w czasie dłuższego przechowywania, dlatego ta niskonakładowa metoda jego pozyskania wypada niezwykle korzystnie w zestawieniu ze źródłami komercyjnymi.

Analizowana była również metoda ekstrakcji bakuchiolu z ziaren rośliny Bakuchi (*Psoralea corylifolia*), korzystając z techniki ekstrakcji w aparacie Soxhleta. Zakładając, że 250 g surowego materiału kosztuje 48 PLN [198], a wydajność uzyskania surowego ekstraktu (eter naftowy) wynosi 12,92% [89], możliwe byłoby otrzymanie 32,30 g surowego oleju. Daje to koszt 1,49 PLN za 1 g ekstraktu. Rozważając dalej wyniki uzyskane w publikacji [89], metoda separacji tam zastosowana pozwoliłaby na odzyskanie 6,68% czystego bakuchiolu z jego ekstraktu, co daje 2,16 g tej substancji. Metoda ta wypada jednak mniej korzystnie niż przedstawiony wcześniej przykład izolacji z ekstraktu kosmetycznego, ze względu na wyższe koszty wstępne oraz ryzyko bardziej obfitego zanieczyszczenia surowego preparatu po ekstrakcji. Niemniej stanowi to dobrą alternatywę wobec zakupu bakuchiolu w oficjalnym kanale dystrybucji.

Kolejnym krokiem w poszerzeniu klasy związków fenolowych dobudowywanych do rdzenia **MPA** były syntezы hymekromonu i umbelliferonu. Jako naturalnie występujące pochodne kumaryny, idealnie wpisywałyby się w tematykę tego wątku, jednak niemożliwe byłoby przeprowadzenie ich kondensacji z **MPA** według przytoczonych wcześniej warunków. Niemniej jednak, zostały one przeze mnie otrzymane w oparciu o reakcję kondensacji Pechmanna, której głównym założeniem jest otrzymanie rdzenia kumarynowego (2*H*-chromen-2-onu).

Pierwszym uzyskanym związkiem z tej klasy był hymekromon. Jego otrzymywanie prowadziłem w warunkach rozpuszczalnikowych, w obecności 1,4-dioksanu. Niektóre metody nie wymagają jego użycia [199], jednak zdecydowałem się na ten wariant ze względu na potencjalnie lepsze rozprowadzanie ciepła w takim medium oraz chęć ochrony substratu — resorcyny — przed nadmiernym stężeniem kwasu siarkowego(VI), który ma właściwości utleniające. Reakcję tą charakteryzowała stosunkowo niska wydajność w porównaniu do źródeł literaturowych [200], a wynikać to mogło z: zawodnienia i zanieczyszczenia substratów, a także problemu kontroli temperatury. W pierwszym etapie reakcji, konieczne jest połączenie wszystkich jej składników w obniżonej temperaturze. Należy mieć na uwadze, że temperatura krzepnięcia 1,4-dioksanu to około 12°C, dlatego odbieranie ciepła nie jest możliwe w sposób efektywny. Chciałbym też nadmienić, iż wydajność tej reakcji w pracy [200] wynosi ponad 98%. Autorzy jednak schładzają roztwór resorcyny w 1,4-dioksanie z wykorzystaniem łaźni lodowej, przed wkropleniem kwasu siarkowego(VI), co czyni tak wysoką wydajność mało prawdopodobną. Jest to problem podobny do tego opisywanego w przypadku otrzymywania 2-aminobenzo[d]tiazoli w podrozdziale punktu rozdziału 6.2.2.3. Inne syntezы, gdzie autorzy schładzali układ poniżej temperatury krzepnięcia

lodowatego kwasu octowego. Niemniej jednak produkt udało się otrzymać, a jego struktura została określona z wykorzystaniem techniki ^1H NMR. Metody tej syntezy nie optymalizowano.

Ostatnim związkiem otrzymanym w ramach tej klasy pochodnych był umbelliferon. Tym razem, reakcja Pechmanna obejmuje także dekarboksylację jednego z substratów — kwasu jabłkowego. Zakłada się, iż w warunkach reakcji tworzy się kwas formylooctowy, który reaguje już w klasyczny sposób z rezorcyną. Drastyczne warunki reakcji spowodowały powstanie wielu produktów ubocznych, a także produktów degradacji substratów. Choć związek był oczyszczony metodą krystalizacji, nie doprowadziło to do usunięcia wszystkich zanieczyszczeń. Pomimo tego, związek próbowałem także dobudować do rdzenia **MPA**, jednak bez powodzenia. Analiza produktu niniejszej reakcji została dokonana z wykorzystaniem techniki ^1H NMR. Przykładowe warunki tej transformacji przedstawione są w [201]. Metody tej przemiany nie optymalizowano.

Choć nie zostało to ujęte na wcześniejszych grafikach, próbowałem również otrzymać pochodne **MPA** i: resweratrolu [202], a także kapsaicyny [203], metodą estryfikacji Steglicha oraz Mukaiyamy. Nie było to możliwe, najpewniej ze względu na zbyt słabo nukleofilowy charakter grupy fenolowej kapsaicyny oraz konkurencyjność trzech grup fenolowych obecnych w strukturze resweratrolu. Mieszaniny poreakcyjne analizowane techniką TLC wskazywały na zerowy stopień konwersji substratów. Pomysł ten został zaniechany ze względu na brak postępu w otrzymaniu pożądaných produktów. Najprawdopodobniej, konieczne by było użycie innej metody aktywacji, np. chlorek kwasowy, jednak z koniecznością ochrony wolnych grup fenolowych. Alternatywnie, możliwe by było zastosowanie pterostilbenu zamiast resweratrolu, jednak z oczekiwaną zmianą bioaktywności [204].

6.3.2. Test DPPH

Poniżej, w **Tabeli 6**, podano wyniki kolorymetrycznego testu DPPH opartego o aktywność typowo chemiczną. Wyniki zaprezentowano w formie współczynnika IC_{50} , który stanowi o tym, że wskazana wartość stężenia danej substancji powoduje zmiatanie rodnika DPPH w 50%.

Tabela 6. Wyniki testu DPPH otrzymane dla badanych estrów i związków odnośnikowych

Typ pochodnej	Symbol związku	IC_{50} [mM]
Pochodne estrowe	MP1	$23,788 \pm 0,411^i$
	MP2	$3,724 \pm 0,230^b$
	MP3	$12,239 \pm 0,252^e$
	MP4	$6,403 \pm 0,311^c$
	MP5	(↓)
	MP6	$14,902 \pm 0,340^{b,c}$
	MP7	$3,643 \pm 0,113^b$
	MP8	$6,902 \pm 0,225^c$
	MP9	$0,373 \pm 0,041^a$
	P1	$43,570 \pm 0,380^l$
	P2	$11,667 \pm 0,113^d$
	P3	$20,100 \pm 0,258^h$
	P4	$0,308 \pm 0,031^a$
	P5	$28,225 \pm 0,357^j$
	P6	$35,844 \pm 0,403^k$
	P7	$0,124 \pm 0,000^a$
Związki odniesienia	MPA	$15,733 \pm 0,144^f$
	MMF	$18,962 \pm 0,279^g$
	RES	$0,131 \pm 0,000^a$
	Trolox	$0,008 \pm 0,000^a$
	Witamina C	$0,545 \pm 0,000^a$

Wartości odchylenia standardowego, za którymi znajduje się ta sama litera (a-l), oznaczają brak znaczącej różnicy w próbie, w odniesieniu do testu statystycznego Tukeya ($p < 0,05$); (↓) — związek wytrącający się.

Badane związki zdolne są do zmiatania stabilnego rodnika DPPH w sposób proporcjonalny do użytego stężenia. W wymiarze ilościowym, ich zdolność do zmiatania tej drobinę jest zadowalająca, co można odnieść to typowych związków odnośnikowych: Troloxu ($IC_{50} = 0,008$ mM) i kwasu askorbowego ($IC_{50} = 0,545$ mM). Ponadto, jako uzupełniającą referencję wykorzystano resweratrol, o dobrze udokumentowanych właściwościach antyoksydacyjnych [205, 206]. Naturalną konsekwencją badania pochodnych **MPA** jest także odnoszenie ich parametrów do tych osiąganych właśnie przez **MPA** ($IC_{50} = 15,733$ mM) oraz jego proleku — **MMF** ($IC_{50} = 18,962$ mM), który także przynależy do klasy estrów. Pochodnymi o najbardziej zaznaczonej aktywności antyoksydacyjnej były związki: **P7** ($IC_{50} = 0,124$ mM), **P4** ($IC_{50} = 0,308$ mM) oraz **MP9** ($IC_{50} = 0,373$ mM), istotnie przewyższając w tej własności odnośnikowy **MPA** i **MMF**. Warto zaznaczyć, iż te wskazane estry są także bardziej aktywne niż kwas askorbowy, witamina C, który jest znanym, naturalnym antyoksydantem zaangażowanym w wiele procesów biochemicznych, a szczególnie tych opartych o zjawisko stresu oksydacyjnego [48, 206]. Pozostałe związki prezentowały umiarkowaną zdolność do zmiatania rodnika DPPH.

Choć każda ze wskazanych pochodnych posiada elementy odpowiedzialne za stabilizację rodnika, takie jak: izolowany lub sprzężony system wiązań nienasyconych (aromatyczny i niearomatyczny), wolną grupę fenolową, grupę aldehydową, a także grupę metoksyłową (w ujęciu ogólnym — grupę donującą elektrony do układu) [47, 207], niemożliwe jest określenie zależności struktura-aktywność. Żadna ze wskazanych funkcjonalności nie przeważa nad inną w tym zestawieniu.

W grupie najbardziej obiecujących, potencjalnych antyoksydantów, mianowicie: **MP9**, **P4** i **P7**, te pierwsze dwa zawierają dodatkowe (poza **MPA**) wiązania nienasycone i grupę funkcyjną oddziałującą z pierścieniem aromatycznych poprzez efekty elektronowe. Ostatnia zaś, nie posiada żadnych układów sprzężonych, które mogłyby stabilizować rodnik, jedynie posiadając grupę ketonową w łańcuchu bocznym.

Analizując jednak przykład odwrotny, niemający istotnie zaznaczonej właściwości antyoksydacyjnej, można zauważyć, że związek **P3** mając szereg wiązań nienasyconych, nie wykazuje takiej aktywności na zakładanym poziomie. Przykład **P1** stanowi o tym, że obecność samego pierścienia aromatycznego nie predefiniuje właściwości antyoksydacyjnych, wpływając jedynie w niewielkim stopniu na stabilizację rodnika w tej klasie pochodnych **MPA**.

Powyższe rozważania podkreślają jednak złożoność właściwości redoks obserwowanych w związkach wielofunkcyjnych tego typu, które są efektem nakładania się, bądź znoszenia, wielu czynników strukturalnych oraz energetycznych.

Warto też dodać, iż na ostateczny wynik wartości IC_{50} może mieć też wpływ hydroliza badanych estrów. Na przekór tej hipotezie staje jednak fakt, iż związki te nie ulegają degradacji w trakcie ich oczyszczania na powietrzu, zatężania ich roztworów na wyparce próżniowej, ani w warunkach analizy NMR, czy HPLC, ani w czasie przechowywania w $-15^{\circ}C$. Jest zatem mało prawdopodobne, iż ten czynnik fałszywie obniżał wartość tego współczynnika w testach DPPH, prowadzonych w roztworach metanolowych, w temperaturze pokojowej, przy nieobecności światła.

6.3.3. Badania biologiczne

W niniejszym punkcie rozdziału znajduje się opracowanie odnoszące się do badań biologicznych estrowych pochodnych **MPA**. Eksperymenty te pokrywają: analizę cytotoksyczności wobec komórek AsPC-1, T-Jurkat i PBMC, właściwości antyproliferacyjnych w odniesieniu do linii komórek T-Jurkat i PBMC, a także analizę mechanizmu działania w oparciu o test GMP (komórki PBMCs). Badania te zostały wykonane w oparciu o sprzęt i zasoby Zakładu Immunologii Klinicznej i Transplantologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, a także o materiały zakupione z wewnętrznego dofinansowania (działania statutowe; nr zadania: 02-10022/272). Eksperymenty te oraz opracowanie wyników wykonała dr hab. inż. Dorota Iwaszkiewicz-Grześ z Zakładu Immunologii Klinicznej i Transplantologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

6.3.3.1. Aktywność cytotoksyczna w odniesieniu do linii komórek AsPC-1

W Tabeli 7 zgromadzone zostały wartości współczynnika IC_{50} osiągnięte przez najbardziej obiecujące, w teście DPPH, związki antyoksydacyjne, w odniesieniu do **MPA**, **MMF** i gemcytabiny (**GEM**). Wartość ta oznacza stężenie związku **P4**, **P7** lub **MP9** (a także odnośników), przy którym rozwój komórek AsPC-1 zostaje zahamowany w 50%. Zredukowana liczba związków testowanych w warunkach tej linii komórkowej wynika z chęci minimalizacji kosztów i zbadania cząsteczek o największym, prawdopodobnym potencjale przeciwutleniającym. Graficzna reprezentacja wyników Tabeli 7 znajduje się na Rysunku 42.

Tabela 7. Cytotoksyczność najbardziej obiecujących antyoksydantów i gemcytabiny (jako związek odniesienia) wobec linii komórek AsPC-1, wyrażona w postaci współczynnika IC_{50} ($n = 3$).

Linia komórek AsPC-1	
Symbol związku	IC_{50} [μM]
P4	$2,867^{**} \pm 0,049$
P7	$2,453^{**} \pm 0,092$
MP9	$3,812^{**} \pm 0,517$
MPA	$1,740 \pm 0,259$
MMF	$2,029 \pm 0,042$
GEM	$0,025^{***} \pm 0,001$

Istotność wyniku została obliczona z wykorzystaniem dwustronnie niesparowanego testu T; wyniki uznaje się za istotne statystycznie w oparciu o następujące kryteria: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), i *** ($p < 0.001$), z **MPA** jako odniesieniem.

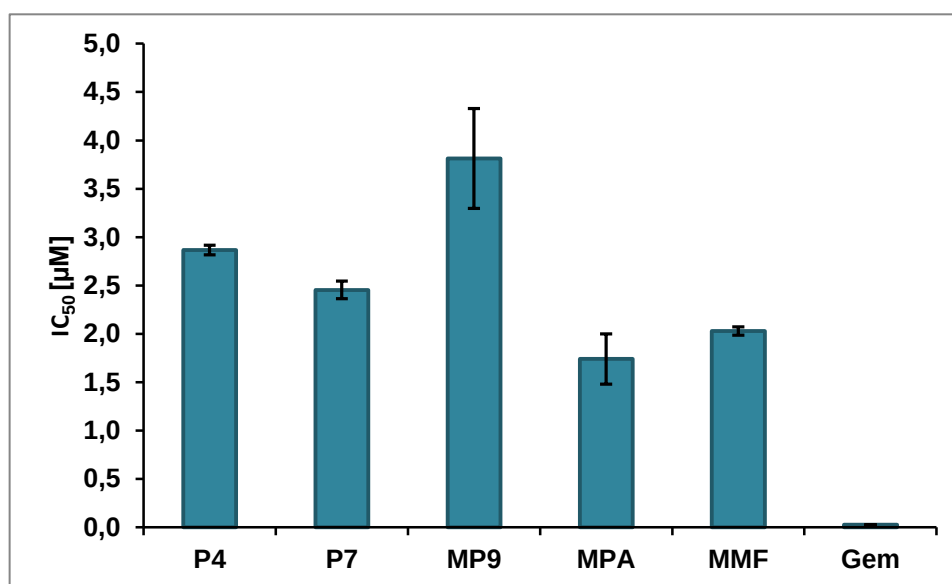
Wyniki niniejszych badań wskazują, że każda z testowanych pochodnych wykazuje właściwości cytotoksyczne wobec komórek AsPC-1 w tym samym rzędzie wielkości co związki odniesienia, jednak dwa rzędy wielkości słabiej niż gemcytabina. Ten ostatni związek jest znanym chemoterapeutykem używanym w leczeniu raka trzustki. Należy podkreślić, że te eksperymenty nie były przeprowadzone z myślą o przewyższeniu właściwości przeciwrakowych gemcytabiny przez estrowe pochodne **MPA**, a są one próbą odnalezienia nowych zastosowań cząsteczek opartych o rdzeń **MPA**, ze wskazaniem aktywności opartej o modyfikowanie komórkowych procesów redoks. Linia komórek nowotworowych raka trzustki, AsPC-1, została wybrana z tego powodu, że jej proliferacja wiązana jest z reaktywnymi formami tlenu (ROS) i wrażliwością na wolne rodniki [208, 209].

Na podstawie tych testów nie można wnioskować, iż grupy funkcyjne stabilizujące rodnik (np. system sprzężonych wiązań podwójnych) przekładają się bezpośrednio na aktywność cytotoksyczną wobec komórek raka trzustki, gdzie stres oksydacyjny gra kluczową rolę w patogenezie tej choroby. Choć keton malinowy ma udowodnione właściwości przeciwutleniające [210], jego estry nie muszą ich posiadać, najpewniej przez utratę wolnej grupy fenolowej, która jest istotna z punktu widzenia procesów rodnikowych, co dodatkowo sugeruje brak decydującego wpływu możliwej hydrolizy. W przypadku cząsteczki **P7**, to właśnie obecność rdzenia **MPA** najpewniej odpowiada za tę aktywność.

Warto nadmienić, że procesy redoks zachodzące w komórkach, włączając w to wcześniej wymieniony stres oksydacyjny, związane są z równowagą pomiędzy tworzeniem wolnych rodników, a ich zmiataniem [210]. Stąd obecność potencjalnie pro-oksydacyjnych grup

ketonowych (w odniesieniu do układów chinonowych [47]) nie wyklucza istotności tego typu grup funkcyjnych w aktywności antyoksydacyjnej. Nieznacznie wyższe wartości cytotoksyczności, osiągnięte dla pochodnej o-kumaranu metylu (**P4**, $IC_{50} = 2,867 \mu M$) oraz izoeugenolu (**MP9**, $IC_{50} = 3,812 \mu M$), w odniesieniu do pochodnej ketonu malinowego (**P7**, $IC_{50} = 2,453 \mu M$), w pewnym ograniczonym zakresie, potwierdzają to rozumowanie.

Warto zauważyć, że niektóre niekorzystne skutki uboczne powodowane przez **MPA** mogą przynajmniej częściowo wynikać z wywoływanego przez niego stresu oksydacyjnego [28]. Dlatego też, choć nie zaobserwowano korelacji pomiędzy działaniem przeciwutleniającym w teście DPPH a działaniem cytotoksycznym badanych koniugatów **MPA** wobec komórek AsPC-1, związki te mogą potencjalnie dostarczyć chemoterapeutyków o zmniejszonej toksyczności, podobnej do ketonów malinowych, które badano jako inhibitory ROS w terapiach cyklofosamidowych [211].



Rysunek 42. Graficzna reprezentacja hamowania proliferacji (IC_{50}) komórek AsPC-1, poprzedzona działaniem najbardziej obiecujących antyoksydantów i gemcytabiny (jako związek odniesienia) przez 72 godziny ($n = 3$).

6.3.3.2. Aktywność cytotoksyczna w odniesieniu do linii komórek T-Jurkat oraz PMBCs

Poniżej, w Tabeli 8, znajdują się wyniki badań cytotoksyczności wszystkich estrowych pochodnych **MPA** (**MP1-MP9**, **P1-P7**), oraz związków referencyjnych, wobec komórek PMBC i T-Jurkat, w warunkach kolorymetrycznego testu XTT. Przedstawione wartości prezentują stężenie związku, przy którym dochodzi do zahamowania przeżywalności komórek w 50%. Choć związki te pierwotnie miały być badane w kontekście aktywności antyoksydacyjnej, wykonanie testów właściwości antyproliferacyjnej (wobec linii T-Jurkat w odniesieniu do zdrowych komórek) wydaje się być zasadne, gdyż jest to klasa estrów opartych o rdzeń **MPA**. Dodatkowo, na Rysunku 43 znajduje się graficzna reprezentacja analizy tej bioaktywności dla wybranych pochodnych **MPA**.

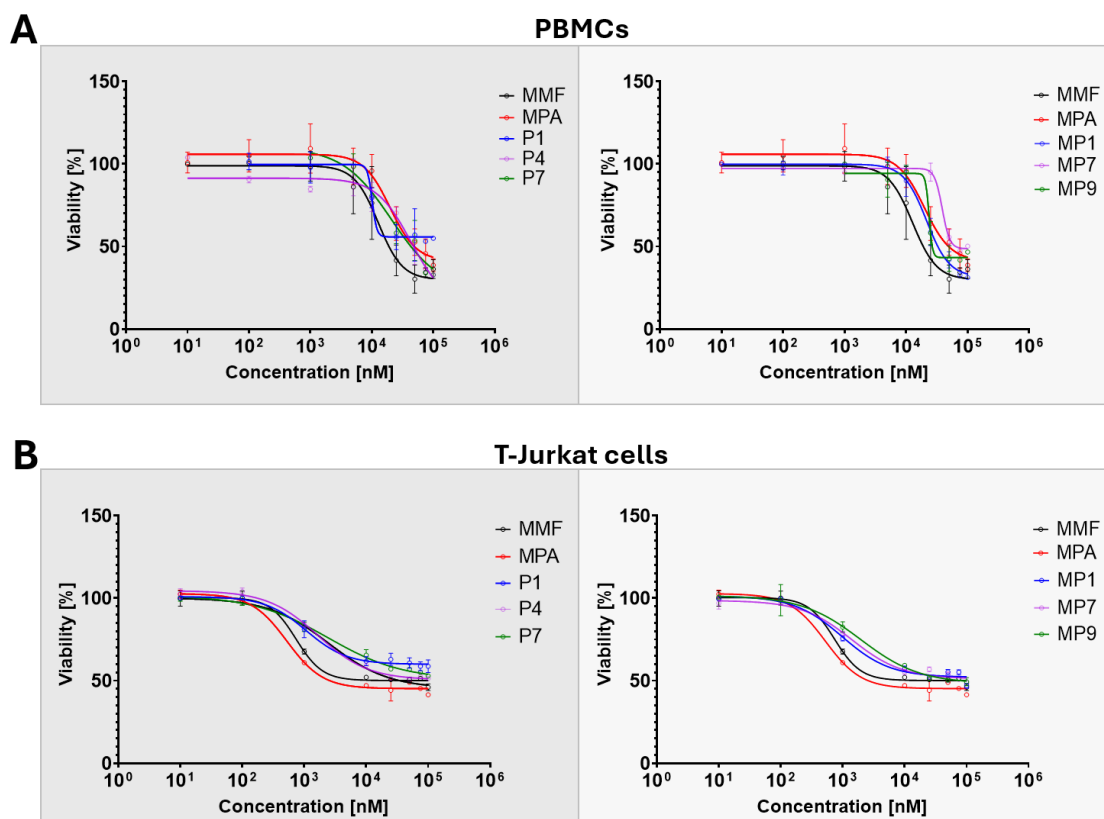
Tabela 8. Cytotoksyczność estrowych pochodnych **MPA**, ustalone w oparciu o test XTT wobec komórek PBMC i T-Jurkat

Symbol związku	IC ₅₀ [μM]		IS [—]
	PBMCs	T-Jurkat	
MP1	14,782 ± 0,016	0,982 ± 0,005	15,051
MP2	22,519 ± 0,039	1,748 ± 0,006	12,883
MP3	10,588 ± 0,040	4,443 ± 0,007	2,383
MP4	23,484 ± 0,015	5,330 ± 0,005	4,406
MP5	30,698 ± 0,024	2,325 ± 0,004	13,203
MP6	14,715 ± 0,045	—	—
MP7	30,433 ± 0,044	1,406 ± 0,004	21,645
MP8	17,782 ± 0,011	1,705 ± 0,002	10,429
MP9	21,153 ± 0,015	1,964 ± 0,002	10,770
P1	125,475 ± 0,025	1,073 ± 0,002	116,938
P2	16,349 ± 0,010	2,473 ± 0,004	6,611
P3	14,117 ± 0,007	—	—
P4	25,887 ± 0,017	1,658 ± 0,003	15,613
P5	9,948 ± 0,046	1,582 ± 0,003	6,288
P6	8,836 ± 0,020	—	—
P7	50,294 ± 0,019	2,410 ± 0,002	20,869
MPA	18,732 ± 0,030	0,527 ± 0,040	35,558
MMF	16,613 ± 0,041	0,740 ± 0,034	22,456

IS — selektywność wewnętrzna; zdefiniowana jako stosunek wartości IC₅₀ PBMCs do IC₅₀ komórek T-Jurkat.

W odniesieniu do testu XTT wykonanego dla komórek PBMC pod wpływem badanych związków można zaobserwować, iż niemal połowa estrów jest silniej cytotoksyczna niż odnośnikowe **MPA** i **MMF**. W eksperymentach wykonanych na linii komórek T-Jurkat sytuacja jest zgoła odwrotna i wszystkie z analizowanych cząsteczek są mniej cytotoksyczne, zwykle posiadając współczynnik IC₅₀ o rząd wielkości mniejszy niż związki referencyjne. Pochodna gwajakolowa, **MP1**, ma ten parametr zbliżony z tym osiąganym dla **MPA**. Warto nadmienić, że istotnie zredukowana cytotoksyczność estrów **MP4**, **MP3**, **P2** i **P7**, wobec komórek T-Jurkat jest także obserwowana, a większość z nich zawiera ugrupowanie aldehydowe, bądź ketonowe w swej strukturze. Trendu tego nie można jednak potwierdzić, gdyż wartość współczynnika IC₅₀ dla **P5** jest stosunkowo niska, zatem nie powinno się wiązać obecności grupy karbonylowej z właściwościami immunosupresyjnymi w tej serii związków.

Wysoka wartość IC₅₀ wobec PBMCs, a także niska wartość IC₅₀ wobec komórek T-Jurkat, może świadczyć o selektywności estrowych pochodnych **MPA** w kierunku komórek białaczkowych. Należy to odebrać w ten sposób, że koniugat taki jest słabo cytotoksyczny wobec zdrowych komórek, a wysoce wobec komórek białaczkowych. Istotnie wysokie wartości wewnętrznego współczynnika selektywności (ang. *internal selectivity*, IS) obserwuje się dla **P1**, **MP7**, **P7**, **P4** i **MP1**, wskazując na ich potencjał immunosupresyjny. Pochodna sezamolowa, **P1**, wypada w tym zestawieniu najlepiej, trzykrotnie przewyższając parametr IS dla **MPA** i 5-krotnie dla **MMF**.



Rysunek 43. Krzywe zależności odpowiedź-dawka determinujące wartość współczynnika IC_{50} dla estrowych pochodnych **MPA**, w odniesieniu do **MPA** i **MMF**. (A) PBMCs inkubowano przez 96 godzin, zaś (B) komórki T-Jurkat w ciągu 48 godzin, w obecności różnych stężeń badanych związków (100; 50; 25; 10; 1; 0,1 i 0,01 μM ; **MPA**, **MMF**, pochodne estrowe **MPA**). Wykresy podzielono ze względu na typ pochodnej (**MP** lub **P**). Po wskazanym wcześniej okresie inkubacji, dołki zadano odczynnikiem XTT nad 24 godziny.

Każdy punkt pomiarowy odpowiada trzem niezależnym eksperymentom, a ilościowo — średniej arytmetycznej $\pm$ odchylenie standardowe. Wykaz znaczeń: *T-Jurkat cells* — komórki T-Jurkat; *viability* — przeżywalność; *concentration* — stężenie molowe.

6.3.3.3. Aktywność antyproliferacyjna w odniesieniu do linii komórek T-Jurkat oraz PMBCs

W Tabeli 9 zaprezentowano wyniki testu opartego o barwnik VPD 450, w odniesieniu do komórek PMBC i T-Jurkat, w czasie działania na nie pochodnymi estrowymi oraz **MPA** i **MMF**. Efekty te wyrażone są przy pomocy współczynnika EC_{50} , który stanowi o tym, że przy określonym stężeniu następuje zahamowanie proliferacji komórek o 50%. Dodatkowo wyznaczony został wskaźnik IS, który wskazuje na selektywność pochodnej wobec tych dwóch linii komórkowych, wewnątrz próby. Graficzna prezentacja wyników tego testu dla wybranych estrów została przedstawiona na Rysunku 44.

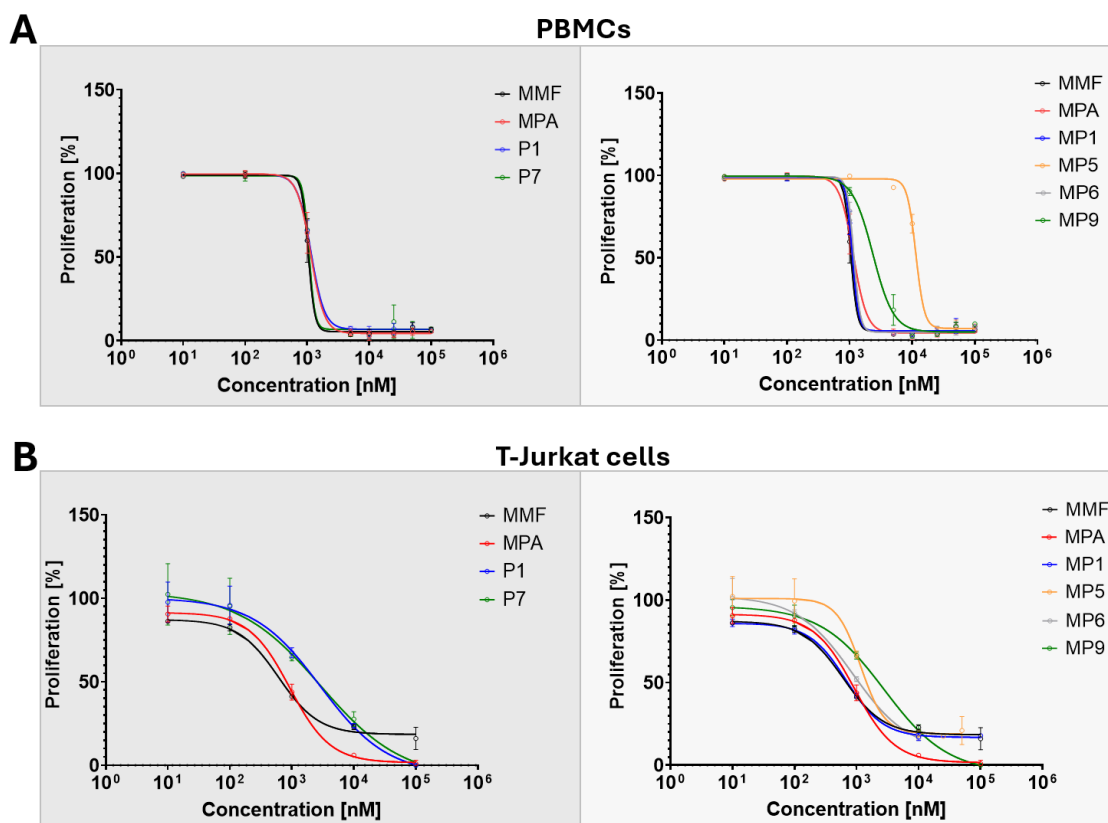
Tabela 9. Aktywność antyproliferacyjna estrowych pochodnych **MPA**, ustalona w oparciu o test VPD450 wobec komórek PBMC i T-Jurkat

Symbol związku	EC ₅₀ [μM]		IS [—]
	PBMCs	T-Jurkat	
MP1	1,106 ± 0,004	0,780 ± 0,034	1,418
MP2	5,395 ± 0,006	2,642 ± 0,035	2,042
MP3	13,742 ± 0,005	4,458 ± 0,040	3,083
MP4	2,900 ± 0,005	7,509 ± 0,036	0,386
MP5	11,406 ± 0,003	1,082 ± 0,036	10,542
MP6	1,162 ± 0,003	0,662 ± 0,031	1,755
MP7	7,734 ± 0,007	4,923 ± 0,034	1,571
MP8	1,154 ± 0,003	1,735 ± 0,023	0,665
MP9	2,356 ± 0,003	1,836 ± 0,043	1,283
P1	1,152 ± 0,004	2,012 ± 0,042	0,573
P2	1,417 ± 0,003	4,477 ± 0,033	0,317
P3	1,052 ± 0,004	1,340 ± 0,035	0,780
P4	4,865 ± 0,004	3,526 ± 0,045	1,380
P5	1,656 ± 0,003	2,357 ± 0,023	0,703
P6	2,215 ± 0,004	2,840 ± 0,033	0,780
P7	1,047 ± 0,006	2,226 ± 0,044	0,470
MPA	1,154 ± 0,006	0,924 ± 0,034	1,249
MMF	1,037 ± 0,006	0,609 ± 0,030	1,704

IS — selektywność wewnętrzna; zdefiniowana jako stosunek wartości EC₅₀ PBMCs do EC₅₀ komórek T-Jurkat.

Z przeprowadzonych eksperymentów wynika, że zdecydowana większość (12 z 16 wobec PBMCs i 14 z 16 wobec linii komórek T-Jurkat) pochodnych ma wartości EC₅₀ wyższe niż te osiągane przez **MPA**. Żadna ze wskazanych pochodnych nie przewyższa właściwości **MMF** w tych dwóch rodzajach eksperymentów. Warto jednak podkreślić, że niektóre z nich hamują stosunkowo efektywnie proliferację tego drugiego rodzaju komórek. Są nimi pochodne: **MP6** (0,662 μM), **MP1** (0,780 μM) i **MP5** (1,082 μM). W odniesieniu do PBMCs, sześć z szesnastu estrów (**P7**, **P3**, **MP1**, **P1**, **MP8** i **MP6**) prezentują wartości EC₅₀ na podobnym poziomie co **MPA** i **MMF**, co zbieżne jest także z poprzednią analizą co do cytotoksyczności. Pozostałe związki mają jednak aktywność antyproliferacyjną o co najmniej jeden rząd wielkości słabszą niż analizowane związki odnośnikowe.

Im wyższa jest wartość współczynnika IS, tym większa jest prawdopodobna skuteczność wobec komórek T-Jurkat, a mniejsza wobec PBMCs. Wskazuje to na swoistą selektywność wobec komórek raka w stosunku do komórek pochodzących od zdrowego dawcy. Najwyższa wartość tego parametru obserwowana jest w przypadku pochodnych **MP5**, **MP3**, **MP2**, **MP6** i **MP7**. Istotnie niższe wartości IS dla estrów z grupy P (**P1-P7**) wskazuje na wyraźniej zaznaczony charakter cytotoksyczny tych pochodnych, gdyż silniej, w tym zestawieniu oddziałują na zdrowe komórki.



Rysunek 44. Krzywa zależności odpowiedź-dawka determinująca wartość współczynnika EC_{50} dla estrowych pochodnych **MPA**. **(A)** Ludzkie PMBCs, znakowane barwnikiem VPD 450, były hodowane w obecności różnych stężeń badanych związków (100; 50; 25; 10; 1; 0,1 i 0,01 μ M; **MPA**, **MMF** i pochodne estrowe), a następnie stymulowane przeciwciałami przeciwko CD3 i CD28, osadzonymi na drobinach magnetycznych, przez 72 godziny. **(B)** Komórki T-Jurkat, znakowane barwnikiem VPD 450, były inkubowane w obecności różnych stężeń badanych związków (100; 10; 1; 0,1 i 0,01 μ M; **MPA**, **MMF** i pochodne estrowe) przez 48 godzin. Prolifercja komórek była analizowana z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Wyniki wyrażono w postaci średniej arytmetycznej $\pm$ odchylenie standardowe. Wykaz znaczeń: *T-Jurkat cells* — komórki T-Jurkat; *proliferation* — proliferacja; *concentration* — stężenie molowe.

6.3.3.4. Wskaźnik Selektywności (SI)

W tym punkcie rozdziału, w **Tabeli 10**, zaprezentowano parametr zwany indeksem selektywności (ang. *selectivity index*, SI), który jest współczynnikiem opisującym zależność pomiędzy dwoma różnymi badaniami (zewnętrzny współczynnik selektywności). Po wyznaczeniu tego parametru, możliwe jest przybliżone oszacowanie, czy badany związek jest bardziej cytotoksyczny wobec danych komórek, czy efektywny na drodze aktywności antyproliferacyjnej. Im wyższa jego wartość, tym niższe ryzyko zaobserwowania efektu cytotoksycznego wobec zdrowych komórek (tu: PBMC) i większa siła działania na komórki raka (tu: linia T-Jurkat).

Tabela 10. Wskaźnik selektywności (SI) określony dla wartości międzyseryjnej cytotoksyczności i aktywności antyproliferacyjnej

Symbol związku	SI [—]	
	PBMCs	T-Jurkat
MP1	13,365	1,259
MP2	4,174	0,662
MP3	0,770	0,997
MP4	8,098	0,710
MP5	2,691	2,149
MP6	12,664	—
MP7	3,935	0,286
MP8	15,409	0,983
MP9	8,978	1,070
P1	108,919	0,533
P2	11,538	0,552
P3	13,419	—
P4	5,321	0,470
P5	6,007	0,671
P6	3,989	—
P7	48,036	1,083
MPA	16,232	0,570
MMF	16,020	1,216

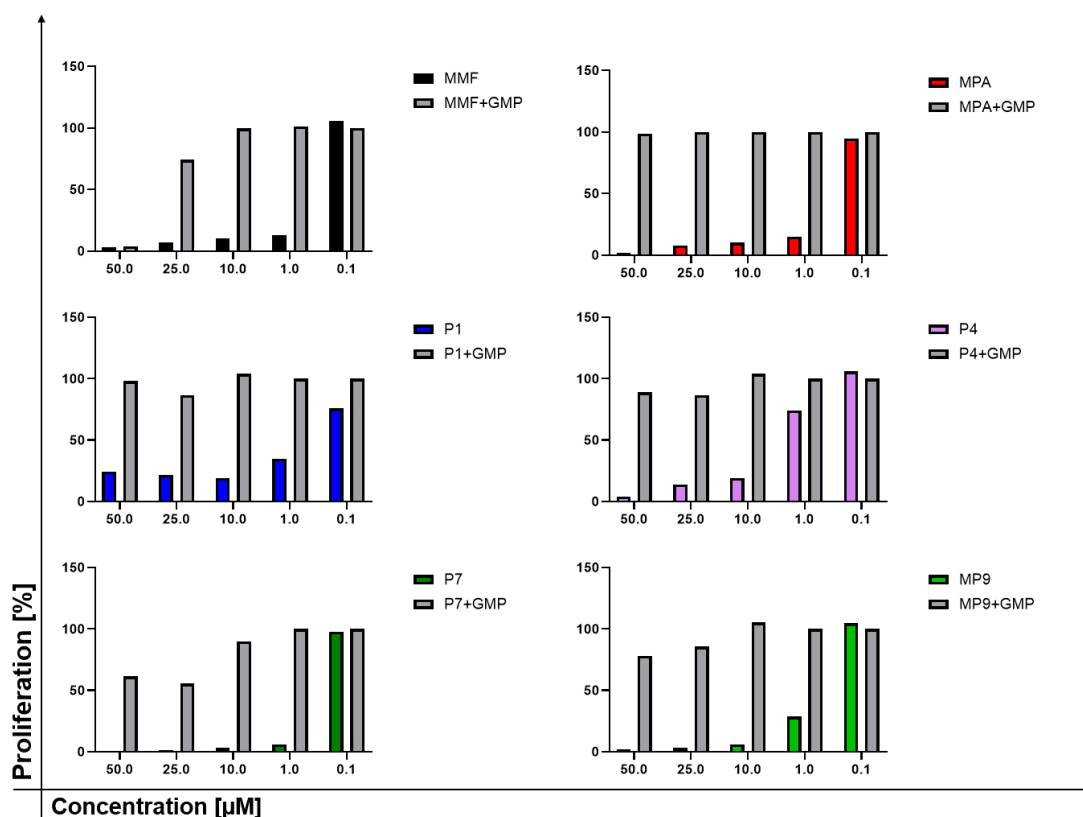
SI — wskaźnik selektywności; selektywność zewnętrzna; zdefiniowany jako stosunek wartości współczynnika IC₅₀ do EC₅₀ określony osobno dla eksperymentów z wykorzystaniem PBMCs i linii komórek T-Jurkat

Z analizy powyższych wartości wynika, iż **P1**, **P7** i **MP8** mają wyraźnie wyższe wartości parametru SI, wynikające z badań na PBMCs niż pozostałe pochodne. W przypadku wyników na linii komórek T-Jurkat — nie obserwuje się wyraźnie wysokich wartości tego parametru, chociaż dla **MP5**, **MP1** i **P7** są najwyższe, porównując do **MPA** i **MMF**.

Dla tej grupy pochodnych określony został także współczynnik selektywności, SI, który stanowi o możliwości dalszego wykorzystania pochodnych w dalszych badaniach biologicznych. Ogólnie przyjmuje się, że im wyższa wartość SI tym związek potencjalnie wykazuje korzystniejsze właściwości terapeutyczne (ang. *druglikeness*). Najwyższe wartości zaobserwowano dla pochodnej **P1** i **P7** (w odniesieniu do PBMCs) i **MP5**, **MP1** oraz **P7** (wobec komórek T-Jurkat).

Motyw strukturalny ketonu malinowego, obecny w estrze **P7** ponownie wyróżnia się, gdyż wartość współczynnika SI jest wysoka w przypadku obu typów komórek. Dodatkowo, pochodna sezamolu **P1** ze względu na swój niemal 7-krotnie wyższy potencjał niż **MPA** i **MMF**, daje pewne przesłanki o tym, że związek ten jest bezpieczny wobec zdrowych komórek, jednocześnie utrzymując aktywność antyproliferacyjną w kierunku komórek raka (linia T-Jurkat). Dzięki tej analizie, **P1** został powzięty do dalszych eksperymentów, tym razem w teście GMP.

6.3.3.5. Test GMP



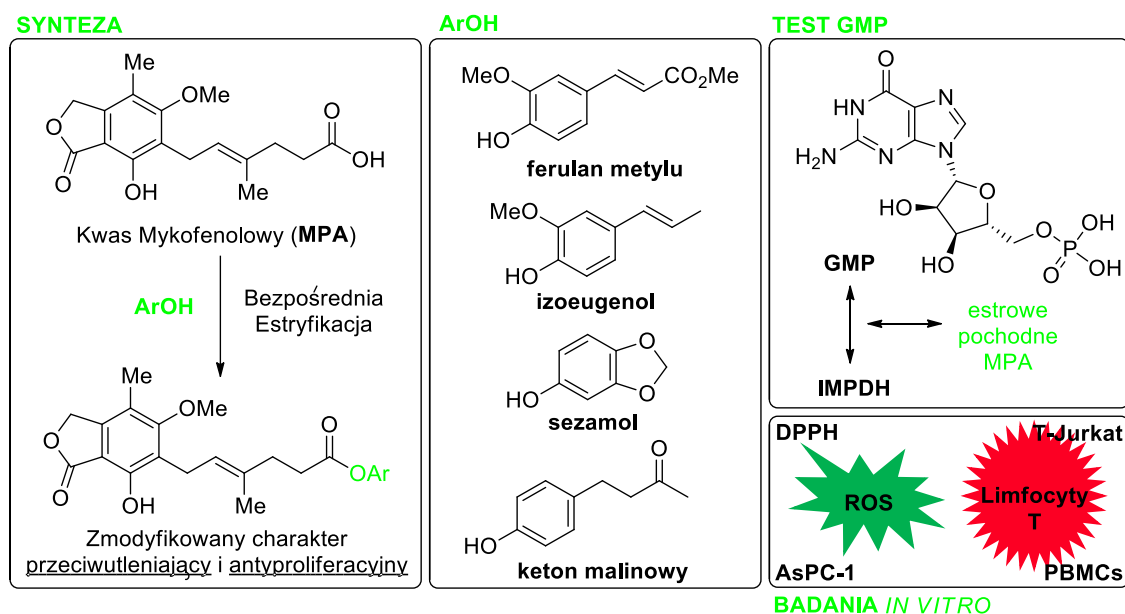
Rysunek 45. Aktywność antyproliferacyjna **MPA**, **MMF** i szeregu estrowych pochodnych **MPA**. Wybarwione VPD 450 PBMCs, w obecności różnych stężeń związków (50; 25; 10; 1 i 0,1 μM; **MPA**, **MMF** i pochodne estrowe), stymulowane przeciwciałami przeciwko CD3 i CD28, hodowano z dodatkiem lub z brakiem dodatku 50 μM GMP przez 72 godziny. Proliferacja komórek była oceniana przy użyciu cytometrii przepływowej. Próba ta jest zwana testem GMP w niniejszym opracowaniu. Wykaz znaczeń: *proliferation* — proliferacja; *concentration* — stężenie molowe.

Na **Rysunku 45** przedstawiono zależną od stężenia aktywność proliferacyjną PBMCs, w obecności GMP. Zasadę funkcjonowania i interpretację testu GMP przedstawiono już wcześniej (6.2.3.4. Test GMP).

Choć syntezowane związki pierwotnie miały mieć właściwości antyoksydacyjne, ich pierwotna aktywność immunosupresyjna wynikająca z obecności rdzenia strukturalnego **MPA**, nadal jest obserwowana. Na podstawie tego założenia, test GMP został wykonany dla najbardziej obiecujących przykładów, to jest pochodnych: **P7**, **P4**, **MP9**, a także **P1**, które wykazały uprzednio dobrą aktywność antyoksydacyjną w teście DPPH lub tak jak w przypadku pochodnej **P1** — najlepszy rezultat badań na komórkach PBMC oraz T-Jurkat (najwyższa wartość współczynnika selektywności). W istocie, pochodne te zachowują się w ten sam, zależny od stężenia sposób w tym eksperymencie, w porównaniu do znanych inhibitorów IMPDH, jakimi są **MPA** i **MMF**. Można te dane odczytać w ten sposób, że ta klasa estrowych pochodnych **MPA** działa według tego samego mechanizmu działania co znane związki referencyjne. Choć trudno wiązać to z aktywnością antyoksydacyjną, własności immunosupresyjne, co do mechanizmu, zostały jednak zachowane.



6.3.4. Podsumowanie



Rysunek 46. Abstrakt graficzny podsumowujący pracę nad nowymi pochodnymi estrowymi **MPA**.

Podsumowując, otrzymane estrowe pochodne, podobnie jak wzorcowe **MPA** i **MMF**, pełnią rolę inhibitora **IMPDH** w testach na **PBMCs**. Wbudowanie struktury fenolu pochodzenia naturalnego w rdzeń **MPA** ma wpływ na właściwości przeciwutleniające, co wykazano testem **DPPH**, jednak w większości wypadków niedostatecznie silnie. Najbardziej obiecujące przeciwutleniacze okazały się mieć właściwości cytotoksyczne na podobnym poziomie co **MPA** i **MMF**, w warunkach linii komórkowej **AsPC-1**. Wysoka wartość współczynnika **SI** dla **P1** i **P7** nie jest jednak zbieżna z wynikami osiągniętymi dla tych związków w teście **DPPH**, co wskazuje na ich aktywność, przede wszystkim, immunosupresyjną, podobną do **MPA**, a nie przeciwutleniającą.

Badania te stanowią zaledwie wstęp do analizy aktywności przeciwutleniającej. Potencjalne kierunki kontynuacji tych badań obejmują weryfikację w testach biologicznych (np. **GPx**, **SOD**), a także innych testach typowo chemicznych (np. test **ABTS**), aby przybliżyć się do zrozumienia mechanizmu działania, a także nakreślić w jakim stopniu właściwości antyoksydacyjne wpływają na bazową aktywność immunosupresyjną pochodnych **MPA**. Koncept niniejszych badań przedstawiony został podsumowany w formie abstraktu graficznego na **Rysunku 46**.

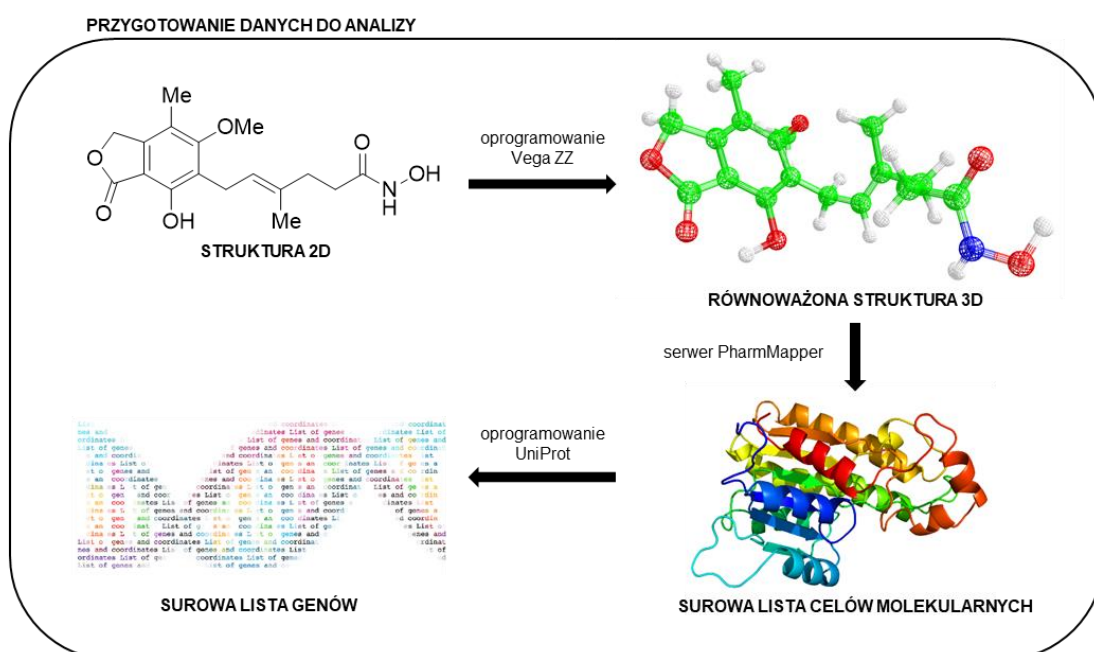
6.4. Bioizosteryczne pochodne **MPA**

6.4.1. Odwrotne dokowanie

W związku z próbą odejścia od klasycznej właściwości **MPA** jaką jest aktywność immunosupresyjna, konieczne było znalezienie nowego celu molekularnego dla projektowanej klasy cząsteczek bioizosterycznych. Analiza wyników badań nad amidowymi pochodnymi **MPA** podkreśliła istotność atomów tlenu i azotu w terminalnym fragmencie rdzenia **MPA**, a dokładniej

— jego grupy karboksylowej. To doprowadziło mnie do klasycznych inhibitorów HDACs i potencjalnych bioizosterów opartych o dostępny syntetycznie rdzeń 1,3,4- oraz 1,2,4-oksadiazolu, a także o prostsze układy np. kwas hydroksamowy, amid pierwszorzędowy, czy hydrazyd. Narzędzie jakim jest odwrotne dokowanie umożliwiło mi zweryfikowanie moich założeń teoretycznych, gdyż dzięki niemu wskazywane są nowe cele molekularne dla ligandów o znanej budowie.

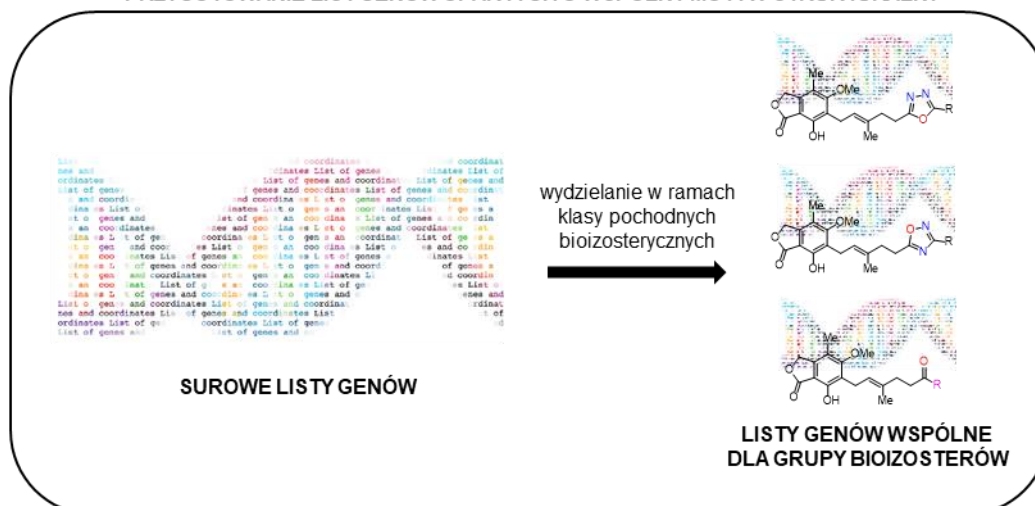
Serwer PharmMapper umożliwił mi bezpłatne przeanalizowanie 18 cząsteczek pod kątem ich dopasowania do enzymów tam zdeponowanych. Efektem tego działania jest otrzymanie surowej listy celów molekularnych, która rozróżnia poszczególne cząsteczki pod kątem ich stopnia dopasowania do danego białka. Lista ta stanowi podstawę pod dalsze rozważania.



Rysunek 47. Algorytm przygotowania danych do analizy w ramach odwrotnego dokowania na podstawie MPA-CO-NH-OH

Opracowanie wyników odwrotnego dokowania było wykonane w następujący sposób — uzyskaną listę 1000 celów molekularnych przepisano na listę genów kodujących te białka, a następnie uzupełniono braki wynikające z różnych notacji zapisu. W efekcie stworzyłem listę genów dla poszczególnych ligandów (**Rysunek 47**), którą należało w jakiś sposób zawęzić. W związku z tym, że istotną cechą wspólną analizowanych cząsteczek jest ich określony rdzeń strukturalny, wydzielono część wspólną każdej z wygenerowanych list dla klasy: 1,3,4-oksadiazoli, 1,2,4-oksadiazoli, a także bioizosterów niecyklicznych (**Rysunek 48**). W dalszej kolejności przeanalizowano takie zbiory z wykorzystaniem oprogramowania Cytoscape, a efekty są podsumowane w ostatnim wierszu każdej sekcji **Tabeli 11**.

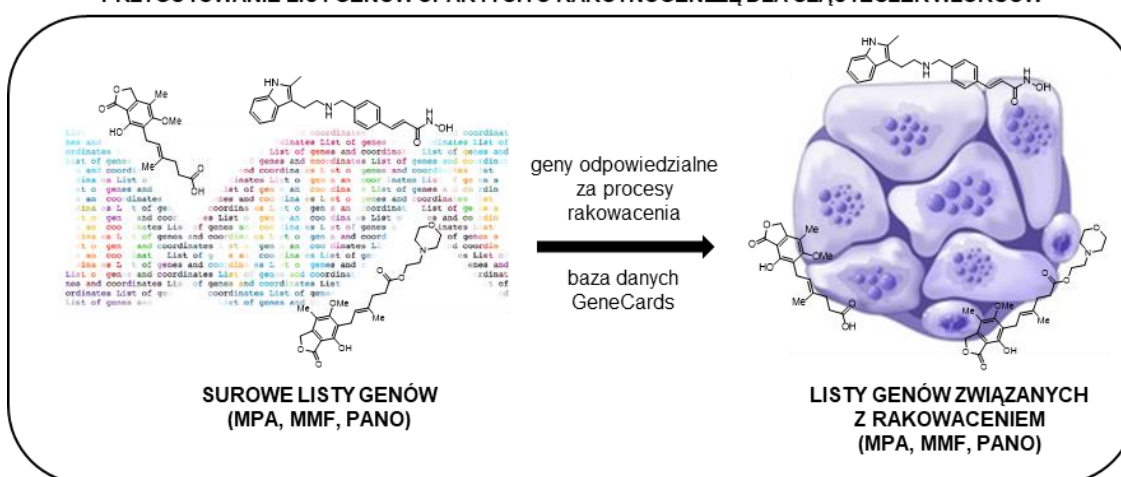
PRZYGOTOWANIE LIST GENÓW OPARTYCH O WSPÓLNY MOTYW STRUKTURALNY



Rysunek 48. Wydzielenie list genów w ramach jednego motywu strukturalnego

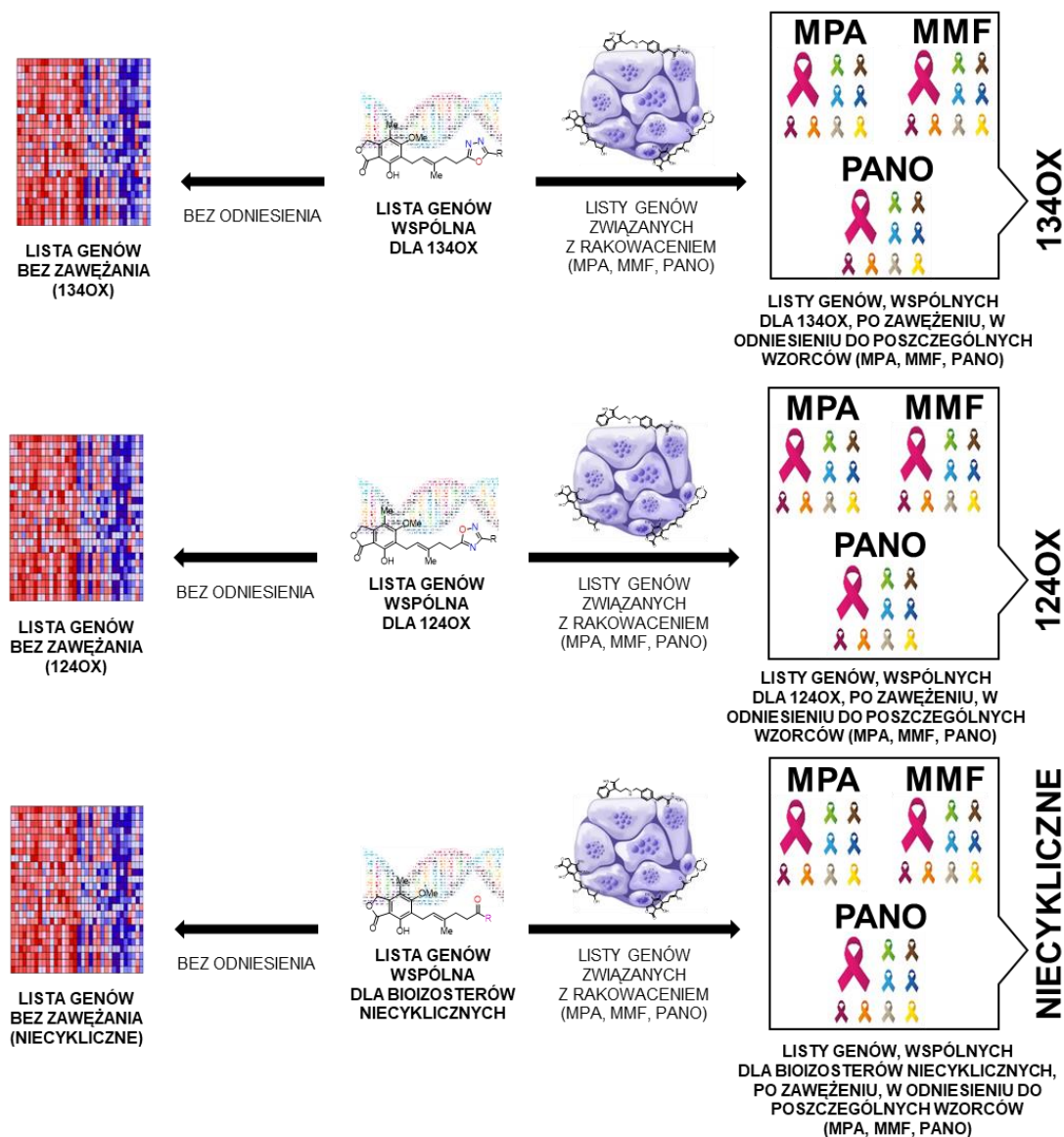
W związku z tym, że nieodzownym związkiem referencyjnym w analizie otrzymywanych przeze mnie pochodnych jest **MPA**, ustaliłem osobno listę jego celów molekularnych (1000), a następnie listę genów, która później została zawężona w oparciu o geny związane z karcynogenezą (źródłem tych informacji była baza danych GeneCards). Listy takie wykonałem również dla **MMF** jako istotnego klinicznie proleku **MPA**, a także dla **Panobinostatu**. Ten ostatni jest wynikiem rozważań natury teoretycznej na podstawie źródeł literaturowych, które wskazały, iż istotna jest zbieżność strukturalna pochodnych amidowych **MPA** z typowymi inhibitorami HDACs. Związek ten jest znany z bycia nieselektywnym inhibitorem tej ostatniej klasy enzymów, dlatego idealnie wpisuje się w te rozważania. Podsumowaniem tej aktywności jest **Rysunek 49**. Ze względu na to, że listy związane z karcynogenezą mają charakter roboczy, nie wydzieliłem ich na rysunku. Każdy ze związków referencyjnych ma jednak swoją osobną listę.

PRZYGOTOWANIE LIST GENÓW OPARTYCH O KARCINOGENEZĘ DLA CZĄSTECZEK WZORCÓW



Rysunek 49. Wydzielenie list genów powiązanych z procesami karcynogenezy dla poszczególnych związków referencyjnych

W efekcie powstały zbiory genów związanych z daną klasą bioizosterów oraz odpowiednim związkiem referencyjnym, a także uwspólnione zostało zestawienie pochodzące od danej cząsteczki odnośnika i wspólnych celów molekularnych dla wszystkich związków. Ta metodologia analizy została przedstawiona na **Rysunku 50**.



Rysunek 50. Podsumowanie sposobu analizy (zawężania) poszczególnych wyników w ramach odwrotnego dokowania

Powyższe podejście ma na celu zachowanie możliwie jak największej liczby cech indywidualnych dla poszczególnych grup cząsteczek, które niewątpliwie są tracone poprzez uwspólnianie oraz procedury limitujące w ramach stosowanych oprogramowań. Oczywiście, możliwa jest analiza każdego z ligandów z osobna, jednak jest ona wysoce czasochłonna, a i celem tego badania jest wskazanie wspólnego celu molekularnego dla tej klasy cząsteczek. Alternatywnym podejściem do analizy poszczególnych związków jest interpretacja z wykorzystaniem narzędzia DAVID, jednak nie będzie ono tutaj omawiane szczegółowo, przy czym zgrubny opis metodologii analizy podany jest w części eksperymentalnej.

Najważniejsze cele molekularne wynikające z niniejszego podejścia zostały przedstawione w **Tabeli 11**.

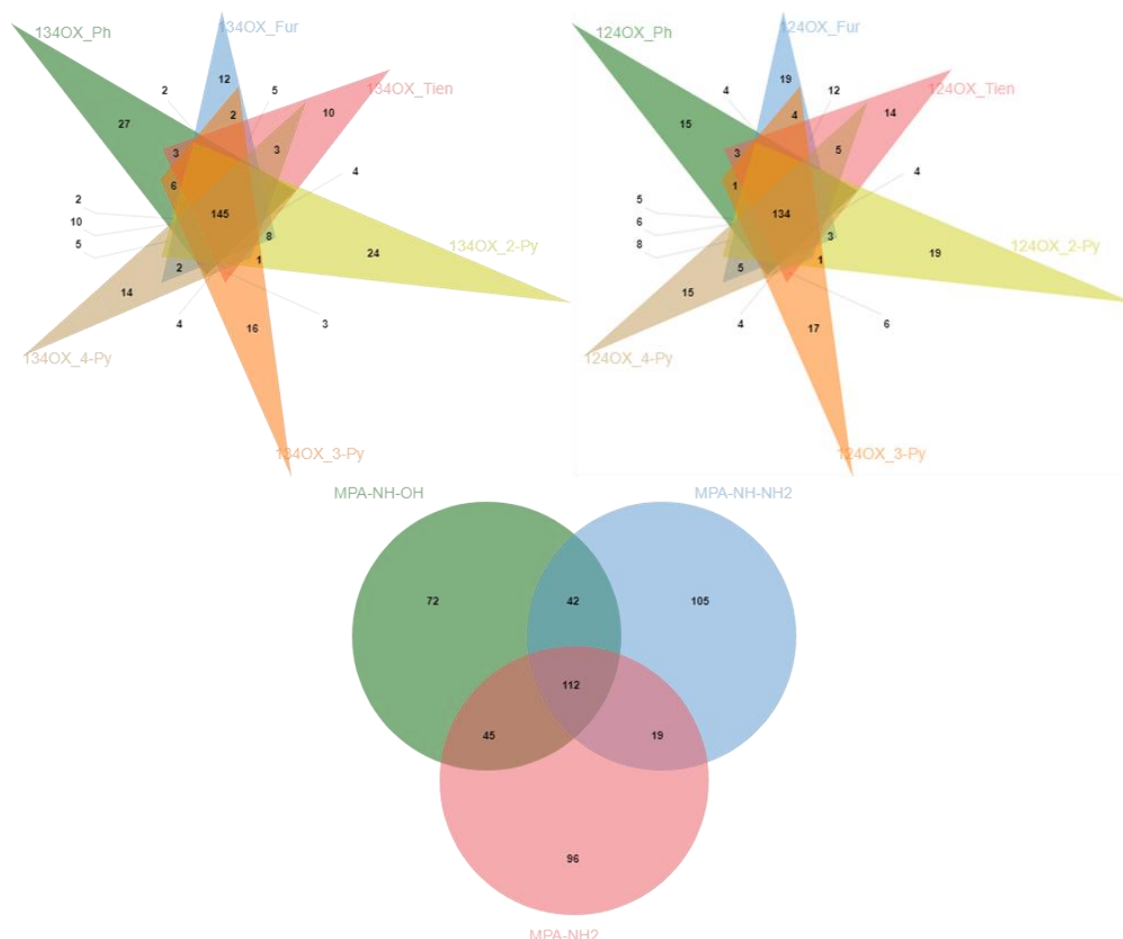
Tabela 11. Zestawienie wyników odwrotnego dokowania dla pochodnych bioizosterycznych **MPA**

	Typ pochodnych bioizosterycznych		
	134OX	124OX	Niecykliczne
Bez odniesienia	TP53, HSP90AA1 , H3C12 , HDAC6	—	—
	—	HSP90AA1 , CD4, H3C12 , HDAC6	—
	—	—	H2AX, B2M, HLA-G, IMPDH1
	EXOSC9, B2M, HLA-E		
W odniesieniu do MPA	HSP90AA1 , H3C12 , B2M, HDAC6	—	—
	—	HSP90AA1 , H3C12 , B2M, HDAC6	—
	—	—	B2M, RAC1, H2AX , IMPDH1
	B2M, HIBCH, HLA-E		
W odniesieniu do MMF	TP53, HSP90AA1 , ESR1, HDAC6	—	—
	—	HSP90AA1 , ESR1, CDK2, HDAC6	—
	—	—	EXOSC3, B2M, HIBCH, IGF1R
	EXOSC9, B2M, HLA-G, HIBCH		
W odniesieniu do PANO	TIP53, HSP90AA1 , EXOSC9, HDAC6	—	—
	—	HSP90AA1 , CD4, ALB, HDAC6	—
	—	—	EXOSC3, B2M, HIBCH, IMPDH1
	EXOSC9, B2M, HIBCH, HLA-E		

Z powyższego zestawienia wynika jasno, iż uwspólnianie danych dla wszystkich grup bioizosterów każdorazowo usuwa HDAC6, jego substrat — Hsp90AA1, a także IMPDH z listy celów molekularnych. Wynika to z faktu, iż pochodne cykliczne nie oddziałują tak efektywnie z IMPDH, jak warianty niecykliczne. Podobna sytuacja jest w przypadku inhibicji HDAC6 — warianty niecykliczne mniej efektywnie oddziałują z tym enzymem, niż te cykliczne. Z tego właśnie powodu analiza ta została możliwie poszerzona (niezredukowana) na odpowiednim etapie.

Na **Rysunku 51** przedstawiono diagram Venna, dla poszczególnych podgrup bioizosterów, który pomógł w wyodrębnieniu części wspólnej w ramach każdej z nich. Największą

utratę celów molekularnych notuje się w grupie bioizosterów niecyklicznych. Poprzez stratę rozumie się cele indywidualne, które w procesie zawężania są odrzucane. Niemniej jednak wygenerowana zostaje taka liczba białek, która pozwala na swobodną analizę oraz późniejsze ograniczanie puli, zgodnie ze stopniem powiązania celów ze sobą (parametr *Degree*). Cele indywidualne nie są jednak omawiane w tym opracowaniu.



Rysunek 51. Diagramy Venna dla poszczególnych klas bioizosterów

Najcenniejszym wnioskiem płynącym z tej analizy jest fakt, iż zgodnie z oczekiwaniami, bioizostery cykliczne są najlepiej dopasowane do HDAC6 oraz Hsp90AA1, a te niecykliczne — do IMPDH1. Niemniej jednak, każdy z tych celów molekularnych jest istotny dla niniejszego opracowania. Poza tym, stosunkowo często pojawiają się takie proteiny jak: TP53, H3C12, B2M, czy EXOSC9.

TP53 to gen supresorowy nowotworów, kodujący białko p53, które reguluje cykl komórkowy, indukuje apoptozę i wspiera naprawę DNA w odpowiedzi na stres komórkowy [212]. H3C12 koduje wariant histonu H3, który jest kluczowym składnikiem chromatyny i bierze udział w regulacji struktury chromosomów oraz transkrypcji [213]. B2M to białko będące składnikiem głównego układu zgodności tkankowej klasy I (MHC I) znajdujące się na powierzchni niemal wszystkich komórek w organizmie. Kompleks ten odpowiedzialny jest za prezentowanie antygenów limfocytom T, stąd jest istotny dla układu odpornościowego w identyfikacji chorych

komórek i następnej, właściwej reakcji immunologicznej [214]. EXOSC9 jest składnikiem kompleksu egzozomu (mały pęcherzyk zewnątrzkomórkowy, umożliwiający komunikację między komórkami, odgrywający ważną rolę w odpowiedzi immunologicznej, regeneracji tkanek czy progresji nowotworów), który uczestniczy w degradacji RNA i obróbce rRNA, mRNA i innych rodzajów RNA. Dysfunkcja EXOSC9 może zaburzać pracę RNA, tym samym prowadząc do stresu komórkowego, co aktywuje p53 [215].

Geny TP53, H3C12, B2M i EXOSC9 łączą się poprzez kluczowe procesy komórkowe, takie jak regulacja transkrypcji, stabilizacja RNA i odpowiedź na stres, co jest istotne w kontekście nowotworów i regulacji homeostazy komórkowej. TP53 kodując białko p53, które wpływa na ekspresję genów i metabolizm RNA, może być modulowane przez EXOSC9. Histon H3 reguluje strukturę chromatyny, zaś B2M, związany z odpowiedzią immunologiczną, może podlegać regulacji przez p53.

Choć w tym opracowaniu wyróżnia się inną izoformę enzymu IMPDH, do dalszej analizy powzięto IMPDH2. Wynika to z faktu, iż była ona użyta w poprzednich badaniach nad amidowymi pochodnymi **MPA**, a także w związku z jej większym znaczeniem w kontekście proliferacji, chorób nowotworowych i układu odpornościowego (2.3.3. Izoformy enzymu IMPDH).

6.4.2. Dokowanie molekularne

Na podstawie uzyskanych wcześniej wyników, HDAC6 i IMPDH2 wskazuje się jako istotne cele molekularne dla nowej klasy pochodnych bioizosterycznych **MPA**. Kontynuacja tego wątku doprowadziła do przeprowadzenia obliczeń komputerowych, które dały odpowiedź co do siły wiązania poszczególnych ligandów w centrum aktywnym enzymu, a także sposobu ich układania w nim. Pierwszy z enzymów jest istotny z punktu widzenia próby odejścia od klasycznych właściwości immunosupresyjnych pochodnych **MPA**, które to wiążą się właśnie z inhibicją enzymu IMPDH. Pomimo zmian strukturalnych, rdzeń strukturalny **MPA** jest nadal dostrzegalny w uzyskanych bioizosterach, dlatego uzasadnione wydaje się być prowadzenie badań obliczeniowych również w kierunku tej znanej aktywności.

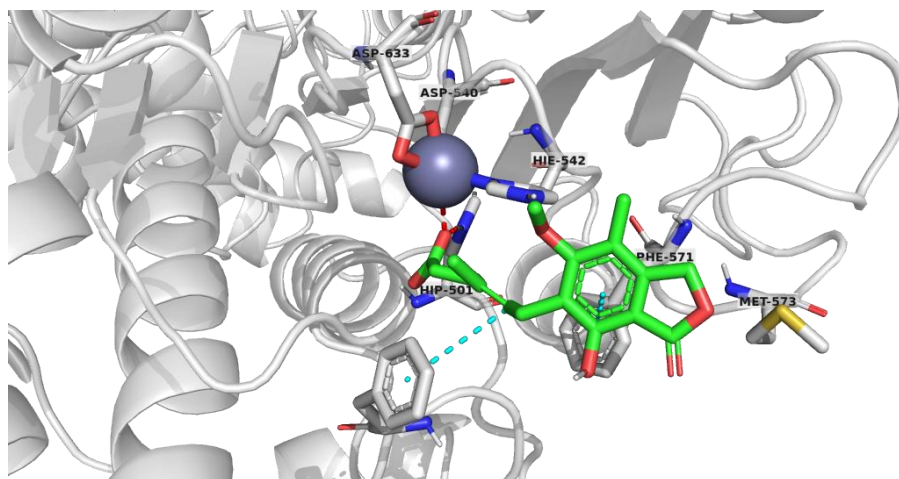
Badania *in silico* dla tej grupy struktur (**Tabela 12**) wykonał student Alan Bielecki, pod opieką mgr Klaudii Chmielewskiej (Katedra Chemii Organicznej Politechniki Gdańskiej i Pracownia Chemoinformatyki Środowiska Uniwersytetu Gdańskiego), a także osób przynależących do zespołu prof. Alessandro Pedrettiego (Wydział Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu w Mediolanie).

Tabela 12. Zestawienie energii wiązania ligand-białko dla pochodnych bioizosterycznych **MPA** i związków odniesienia, wobec enzymów HDAC6 i IMPDH2

Typ pochodnej	Symbol związku	E [kJ·mol ⁻¹]	
		HDAC6	IMPDH2
Pochodne 1,3,4-oksadiazolu	134OX_Ph	-84,20	-37,24
	134OX_Fur	-81,52	-31,38
	134OX_Tien	-82,13	-36,40
	134OX_2-Py	-78,84	-37,24
	134OX_3-Py	-80,30	-32,64
	134OX_4-Py	-79,63	-33,05
Pochodne 1,2,4-oksadiazolu	124OX_Ph	-80,13	-33,89
	124OX_Fur	-82,45	-35,98
	124OX_Tien	-80,53	-31,80
	124OX_2-Py	-79,54	-33,89
	124OX_3-Py	-77,37	-34,31
	124OX_4-Py	-76,50	-30,12
Bioizostery niecykliczne	MPA-CO-NH-OH	-87,84	-33,89
	MPA-CO-NH-NH₂	-87,10	-33,89
	MPA-CO-NH₂	-87,84	-33,05
Związki odniesienia	MPA	-88,83	-31,80
	MMF	-81,67	-32,64
	Panobinostat	-95,08	-33,05

6.4.2.1. HDAC6

Analizę przypadku należy rozpocząć od siły i sposobu oddziaływania na linii **MPA**-HDAC6. Jest to o tyle istotne, że sposób interakcji tego związku może wskazać na ogólną tendencję wiązania pochodnych **MPA** z tym białkiem. Poniżej na **Rysunku 52** zaprezentowano sposób wiązania **MPA**-HDAC6.



Rysunek 52. Sposób wiązania **MPA** w miejscu aktywnym enzymu HDAC6

Dokowanie molekularne wykonane dla **MPA** wykazało, że ugrupowanie karboksylowe zbliża się do jonu cynku, co może wskazywać na to, że ten ligand wykazuje powinowactwo do HDAC6. Co do wartości, energia wiązania ligand-białko wynosi -88,83 kJ/mol. Można zaobserwować, że układ wiążący cynk (ang. *zinc binding group*, ZBG) oddziałuje z jonem cynku,

Zn^{2+} , tak jak oczekiwano. Część zwana linkerem, łączącym ZBG z miejscem rozpoznania molekularnego (CAP), stabilizowana jest w pewnym stopniu przez interakcje typu π - π . We fragmencie CAP zaś, występują wiązania wodorowe pomiędzy Hie542, który to aminokwas odpowiedzialny jest za stabilizację jonu cynku w miejscu aktywnym enzymu. Występują tu także oddziaływania stabilizujące π - π , pomiędzy podjednostką Phe571 a układem ftalidowym **MPA**. Interesującym aspektem jest kierowanie się pierścienia laktonowego na Met573, jednak można to wiązać z typowym oddziaływaniem siarki dwuwartościowej na przedłużeniu wiązania S-C z układami o podwyższonej gęstości elektronowej.

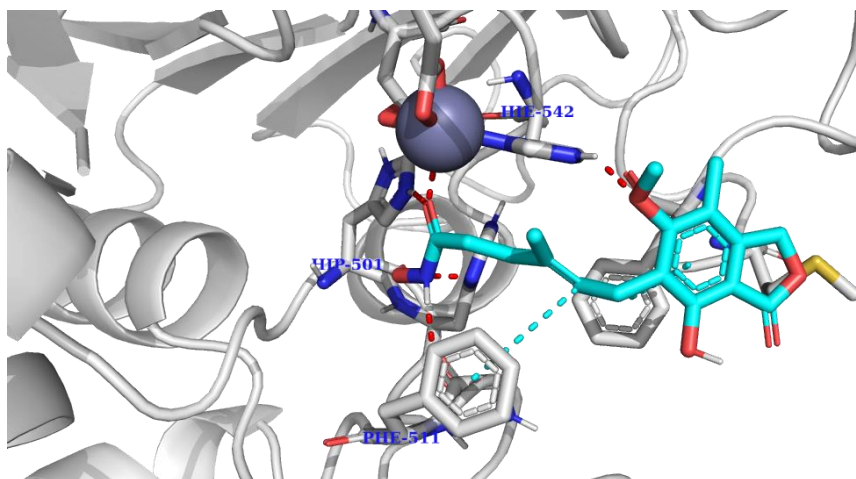
Kolejnym związkiem z grupy odnośników jest **MMF**. Ligand ten nie zbliża się do jonu cynku katalitycznego i żaden jego fragment nie lokuje się w miejscu aktywnym. Być może **MMF** wykazywałby inhibicję blokując wejście do miejsca aktywnego, ale nie jest pewne, że jest z nim silnie związany. Siła wiązania enzym-ligand wynosi -81,67 kJ/mol i jest to wartość zdecydowanie wyższa od pozostałych wzorców. Oddziaływania jakie można wyróżnić to wiązania wodorowe występujące pomiędzy fragmentem CAP z Leu640 i Arg561 oraz pomiędzy wiązaniem estrowym a Ser459. Występują również wiązania stabilizacyjne π - π pomiędzy pierścieniem aromatycznym we fragmencie CAP a podjednostką Phe570.

Ostatnim z grupy związków referencyjnych jest **Panobinostat**. Ligand ten najlepiej dopasowuje się do centrum aktywnego enzymu HDAC6, a energia tego oddziaływania wynosi -95,08 kJ/mol. Jest to znany inhibitor HDACs, zatem znaczne dopasowanie do HDAC6 było przewidywane. Oprócz wiązań wodorowych tworzonych pomiędzy podjednostkami aminokwasowymi (np. Hip573, Hip501) z sąsiedztwa jonu cynku a ligandem (np. grupa hydroksamowa), obserwuje się również stabilizację typu π - π u wejścia do miejsca aktywnego. Element CAP w **Panobinostacie** układa się w okolicy podjednostki Phe570, tworząc oddziaływania stabilizujące pozycję liganda w miejscu aktywnym.

Analizę dokowania kontynuuję poprzez omówienie docelowych cząsteczek z grup bioizosterów cyklicznych i niecyklicznych.

Pochodne niecykliczne, **MPA-CO-NH-OH**, **MPA-CO-NH-NH₂** oraz **MPA-CO-NH₂**, dają stosunkowo niskie wartości energii wiązania ligand-białko, co zwiększa ich prawdopodobieństwo efektywnej inhibicji enzymu HDAC6. Każda z nich zawiera ZBG przez co aktywnie oddziałuje z jonem cynku. Ich fragment CAP (układ ftalidowy) ma tendencję do przechylania się w stronę Met573 ze względu na tworzenie korzystnych oddziaływań van der Waalsa. Innym motywem interakcji, który można odnaleźć w tej grupie pochodnych, jest tworzenie wiązania wodorowego pomiędzy tlenem grupy metoksylowej w **MPA** a Hie542 (podjednostka ta jednocześnie koordynuje jon cynku), o charakterze stabilizującym. Poniżej, na **Rysunku 53** zaprezentowano sposób interakcji w centrum aktywnym enzymu dla **MPA-CO-NH-OH** wraz z krótkim opisem. Pochodna ta została wybrana ze względu na prezentowanie najwyższej aktywności, w ogólnym ujęciu, w badaniach przesiewowych wykonanych na szeregu komórek nowotworowych (6.4.5.1. Profilowanie na szeregu linii komórek nowotworowych).





Rysunek 53. Sposób wiązania **MPA-CO-NH-OH** w miejscu aktywnym enzymu HDAC6

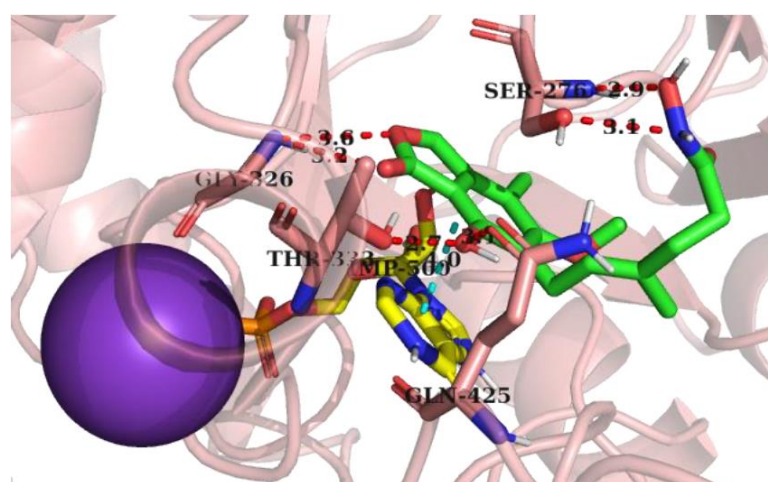
Badanie to wykazało, że **MPA-CO-NH-OH** zbliża się do cynku katalitycznego i koordynuje go. Wynik dokowania co do wartości wynosi -87.84 kJ/mol i jest wysoce zbieżny z tym otrzymanym na pochodnej hydrazydowej. Oddziaływania jakie można wyróżnić to przede wszystkim liczne wiązania wodorowe tworzone z udziałem podjednostek Hip501, Hie542, Gly510 i Hie502. Podobnie jak w poprzednich dokowaniach, obszar linkera jest stabilizowany przez Phe511 oddziaływaniami π - π . Pojawia się również podobny motyw stabilizacji fragmentu CAP przez Phe571. Obserwowane jest również charakterystyczne przechylenie układu laktonowego w kierunku Met573.

W ogólnym ujęciu, bioizostery z klasy 1,3,4-oksadiazoli i 1,2,4-oksadiazoli mają energię wiązania ligand-białko w przedziale wartości: $-78,84 \div -84,20$ i $-76,50 \div -82,45$ kJ/mol. Wynika stąd, że pochodne **134OX** są lepiej zalokowane w centrum aktywnym enzymu HDAC6. Co do wartości są to wyniki bardzo podobne do tych osiągniętych przez **MMF** ($-81,67$ kJ/mol). Znaczna ich większość nie zbliża się do jonu cynku katalitycznego (nie mają typowej grupy ZBG), co może mieć istotne znaczenie w kontekście inhibicji HDAC6. Wysoka aktywność *in vitro* analizowanych ligandów wskazywałaby, iż występują dwa rodzaje inhibicji, które działają na to białko zarówno na drodze koordynacji cynku (badane w tym opracowaniu), jak i blokowania wejścia do kieszeni (nie badane tutaj), poprzez oddziaływanie z podjednostkami wyścielającymi jej zewnętrzną część. W ogólnym rozrachunku, w ramach obu klas bioizosterów cyklicznych obserwuje się podobne motywy oddziaływań, takie jak: wiązania wodorowe pomiędzy Leu640 a grupą fenolową **MPA**, czy Phe571 a grupą metoksyłową **MPA**, czy oddziaływania π - π pomiędzy Phe570 a pierścieniem aromatycznym **MPA**. Oddziaływania łańcucha bocznego ligandów z białkiem HDAC6, są mniej wydajne, ponieważ występują w tym obszarze głównie oddziaływania π - π / π -alkil, które są słabsze niż wiązania wodorowe.

Podsumowując, najwyższą efektywność inhibicji HDAC6 wiąże się z grupą bioizosterów niecyklicznych, gdyż określa je najniższa wartość wolnej energii wiązania spośród pozostałych klas pochodnych. Związane jest to z posiadaniem przez nie istotnego powinowactwa do jonów cynku znajdujących się w centrum aktywnym enzymu i odpowiadających za podstawową aktywność enzymatyczną tego białka. Odpowiedniki cykliczne najpewniej nie osiągną aż tak

z klasy 1,3,4-oksadiazoli i 1,2,4-oksadiazoli mają energię wiązania ligand-białko w przedziale wartości: $-37,24 \div -31,38$ i $-35,98 \div -30,12$ kJ/mol. Wynika stąd, że pochodne **134OX** są lepiej zalokowane w centrum aktywnym enzymu IMPDH2.

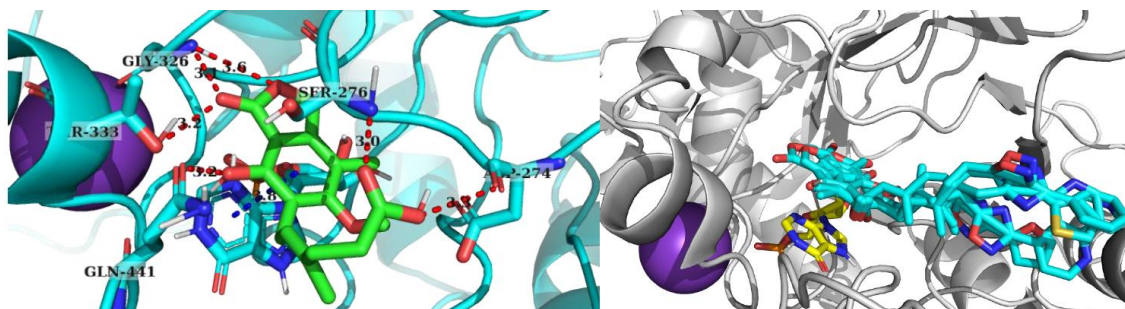
Bioizostery niecykliczne układają się w centrum aktywnym w podobny sposób co **MPA**, gdzie jego najbardziej polarna grupa — ugrupowanie karboksylowe — oddziałuje z podjednostką Ser276. Warto nadmienić, iż w kwasie hydroksamowym **MPA**, **MPA-CO-NH-OH**, oddziaływanie to jest silniejsze na skutek tworzenia dodatkowego wiązania wodorowego przez grupę -NH-. W ramach tej klasy, wartość wolnej energii wiązania nie różni się znacząco i wynosi odpowiednio $-33,05$ kJ/mol dla **MPA-CO-NH₂** oraz po $-33,89$ kJ/mol dla **MPA-CO-NH-OH** i **MPA-CO-NH-NH₂**. Sposób ułożenia kwasu hydroksamowego **MPA** w centrum aktywnym omawianego enzymu został przedstawiony na **Rysunku 55**.



Rysunek 55. Sposób wiązania **MPA-CO-NH-OH** w miejscu aktywnym enzymu IMPDH2

Warto dodać, że siła wiązania ligand amidowy, **A2**, a enzym IMPDH wynosiła $-9,1$ kcal/mol, co w przeliczeniu równe jest $-38,07$ kJ/mol (dla **MPA**, w poprzednim dokowaniu wynosiła ona w przeliczeniu $-32,64$ kJ/mol). Fakt ten wskazuje na ryzyko osiągnięcia słabszego efektu antyproliferacyjnego, mierzonego na linii komórek T-Jurkat, w tej klasie pochodnych **MPA**, niż omawiany związek **A2**.

Informacje tu zebrane sugerują, iż bioizostery niecykliczne układają się w centrum aktywnym enzymu w podobny sposób co **MPA**, jednak silniej oddziałując z elementami otoczenia. Można więc wnioskować, iż ich aktywność biologiczna może być podobna do tej, osiągniętej dla pochodnych amidowych **MPA**. W przypadku bioizosterów cyklicznych, sposób wygięcia podstawnika w oksadiazolu jest inny, niż w charakterystycznej, pętlowej architekturze molekularnej **MPA** (**Rysunek 56**). W efekcie można spodziewać się osłabionych wyników bioaktywności wobec komórek T-Jurkat, jednak jedynie rzeczywisty eksperyment będzie w stanie zweryfikować tę hipotezę.



Rysunek 56. Sposób oddziaływania **MPA** (lewa) i szeregu ligandów 1,2,4-oksadiazolowych (prawa) w centrum aktywnym enzymu IMPDH2

6.4.3. Komputerowe szacowanie właściwości fizykochemicznych i biologicznych

6.4.3.1. Parametry bazowe

Jednym z istotnych narzędzi w dziedzinie projektowania nowych leków jest komputerowe przewidywanie parametrów fizykochemicznych analizowanych cząsteczek. Rozpuszczalność, współczynnik podziału, a także aktywność metaboliczna to wybrane z parametrów, które wyznacza się w celu oszacowania przydatności badanych substancji jako potencjalnych leków. Jednym z nich jest analiza SwissADME [216]. Działa ono na podstawie wprowadzonego kodu SMILES związku, który wystarczy, by każdy z wcześniej wymienionych czynników został określony, a więc w celu przewidzenia profilu farmakokinetycznego.

Pierwszym krokiem pozwalającym na poprawne przeanalizowanie danych jest zrozumienie znaczenia badanych parametrów, a także zapoznanie się z ich typowymi przedziałami wartościami. Najważniejsze ze wskaźników zostały przedstawione w **Tabeli 13**, a opracowanie to wykonałem w oparciu o źródło literaturowe [217].

Tabela 13. Zestawienie parametrów określanych przy pomocy narzędzia Swiss-ADME

Symbol parametru	Komentarz	Zakres
MW	masa molowa [$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$]	50-500
iLOGP	współczynnik podziału oktanol/woda [—]	-2-10
TPSA	topologiczna powierzchnia polarna [$\text{\AA}^2$]	20-130
HBA	akceptory wiązania wodorowego [—]	0-10
HBD	donory wiązania wodorowego [—]	0-5
RB	wiązania rotowalne [—]	0-5
nHA	liczba ciężkich atomów	15-50
MR	refrakcja molowa [—]	40-130
Alert PAINS	alert wywołany przez związki przeszkadzające we wszystkich testach [—]	0 (preferowane)
Alert Brenka	alert wskazujące potencjalnie toksyczne, chemicznie reaktywne i metabolicznie niestabilne ugrupowania [—]	0 (preferowane)

W **Tabeli 14** podsumowano wyniki analizy SwissADME oraz wyraźnie zaznaczono, które z parametrów przekraczają typowe zakresy wartości.

Tabela 14. Zestawienie parametrów określanych przy pomocy narzędzia Swiss-ADME dla pochodnych bioizosterycznych **MPA** i związków odniesienia

Symbol związku	MW	iLOGP	TPSA	HBD	HBA	RB	nHA	MR	alert PAINS	alert Brenka
134OX_Ph	420,46	4,14	94,68	1	7	7	31	115,55	0	1 ^b
134OX_Fur	410,42	3,79	107,82	1	8	7	30	107,82	0	1 ^b
134OX_Tien	426,49	3,88	122,92	1	7	7	30	113,43	0	1 ^b
134OX_2-Py	421,45	3,58	107,57	1	8	7	31	113,35	0	1 ^b
134OX_3-Py	421,45	3,64	107,57	1	8	7	31	113,35	0	1 ^b
134OX_4-Py	421,45	3,65	107,57	1	8	7	31	113,35	0	1 ^b
124OX_Ph	420,46	4,26	94,68	1	7	7	31	115,55	0	1 ^b
124OX_Fur	410,42	4,03	107,82	1	8	7	30	107,82	0	1 ^b
124OX_Tien	426,49	4,15	122,92	1	7	7	30	113,43	0	1 ^b
124OX_2-Py	421,45	3,83	107,57	1	8	7	31	113,35	0	1 ^b
124OX_3-Py	421,45	3,78	107,57	1	8	7	31	113,35	0	1 ^b
124OX_4-Py	421,45	3,88	107,57	1	8	7	31	113,35	0	1 ^b
MPA-NH-OH	335,35	2,78	105,09	3	6	7	24	86,31	0	3 ^c
MPA-NH-NH₂	334,37	2,46	110,88	3	6	7	24	88,29	0	3 ^d
MPA-NH₂	319,35	2,36	98,85	2	5	6	23	85,49	0	1 ^b
MPA	320,34	2,48	93,06	2	6	6	23	84,35	0	1 ^b
MMF	433,49	4,10	94,53	1	8	10	31	118,49	0	2 ^e
Pano	349,43	2,38	77,15	4	3	8	26	103,76	1 ^a	3 ^f

^a — obecność alkilowanego podstawnika indol-3-yłowego; ^b — obecność izolowanego wiązania podwójnego; ^c — obecność ugrupowania kwasu hydroksamowego, izolowanego wiązania podwójnego i pojedynczego wiązania tlen-azot; ^d — obecność acylowanej hydrazyny, samodzielnego motywu hydrazyny i izolowanego wiązania podwójnego; ^e — obecność izolowanego wiązania podwójnego i dwóch grup estrowych; ^f — obecność grupy kwasu hydroksamowego, zdolności akceptorowych w reakcji Michaela i pojedynczego wiązania tlen-azot.

Na podstawie powyższych danych można zauważyć, iż większość przewidzianych parametrów nie wykracza poza typowe przedziały wartości. Każda z analizowanych cząsteczek zawiera w swej strukturze izolowane wiązanie podwójne, co przyczynia się do pojawienia się alertu Brenka. W związku z tym, że sama wzorcowa cząsteczka **MPA** zawiera to ugrupowanie, alert ten można zignorować. Dodatkowo, obecność motywu kwasu hydroksamowego i wiązania pojedynczego azot-tlen (**MPA-NH-OH** i **Pano**), występowanie motywu hydrazynowego (**MPA-NH-NH₂**), a także zalokowanie dwóch grup estrowych w analizowanej cząsteczce (**MMF**), także wywołują alert Brenka. W związku z tym, że tego typu ugrupowania występują w znanych lekach (**MMF** i **Pano**), a także są istotą niniejszego projektu, alerty te muszą zostać pominięte.

Przekroczona liczba wiązań rotacyjnych (RB) nie powinna wpływać na kwalifikację pochodnych, gdyż sama cząsteczka **MPA** wnosi do tej wartości 6 takich powiązań, stąd pozostaje tylko 1-4 takich interakcji przypadających na każdy ze związków, co mieści się już w typowym przedziale wartości. Wskaźnik TPSA związany jest do podatności cząsteczki na polaryzację, stąd molekuly zawierające wiele heteroatomów mają tendencję do posiadania najwyższych wartości tego parametru. Nie dziwi zatem fakt ulokowania pochodnych siarkowych (**134OX_Tien** i **123OX_Tien**) w tym zestawieniu, jako że pierwiastek ten znany jest ze swej polaryzowalności. W przypadku wartości współczynnika podziału (iLOGP) można zaobserwować pewien trend, a mianowicie — najwyższą lipofilnością charakteryzują się pochodne **134OX_Ph**, **134OX_Tien**, **124OX_Ph**, **124OX_Tien** i **MMF**, co jest zgodne z założeniami teoretycznymi (lipofilny



podstawnik fenylowy, atom siarki oraz dłuższy łańcuch węglowy). Zależność odwrotna opisuje bioizostery niecykliczne. W tym przypadku, hydrofilność rośnie wraz ze wzrostem liczby heteroatomów. Pokazuje to jednoznacznie korelację pomiędzy strukturą związku i wartością przewidywanego współczynnika podziału a spadkiem rozpuszczalności w wodzie. Należy pamiętać, iż jedynie eksperyment w czasie rzeczywistym jest w stanie zweryfikować poprawność zastosowanych modeli symulacyjnych, w tym tych oceniających rozpuszczalność cząsteczek w wodzie (ESOL, Ali, SILICOS-IT).

6.4.3.2. Rozpuszczalność

W związku z ograniczoną rozpuszczalnością wielu pochodnych amidowych **MPA** w hodowli komórkowej opartej na wodzie, podjęta została próba estymacji rozpuszczalności dla tej klasy derywatów.

Tabela 15. Zestawienie wyników dotyczących szacowania parametrów rozpuszczalności, osiągniętych przy pomocy narzędzia Swiss-ADME

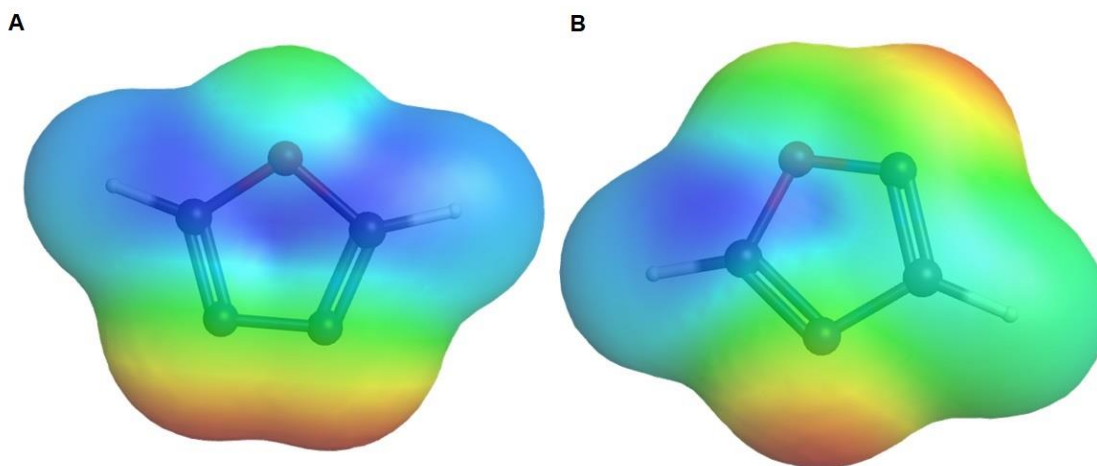
Symbol związku	ESOL			Ali			SILICOS-IT		
	log S	S [M]	Klasa ^a	log S	S [M]	Klasa ^a	log S	S [M]	Klasa ^a
134OX_Ph	-5,65	2,22·10 ⁻⁶	M	-6,91	1,22·10 ⁻⁷	P	-7,62	2,42·10 ⁻⁸	P
134OX_Fur	-5,01	9,69·10 ⁻⁶	M	-6,26	5,54·10 ⁻⁷	P	-6,84	1,45·10 ⁻⁷	P
134OX_Tien	-5,50	3,13·10 ⁻⁶	M	-7,22	6,06·10 ⁻⁸	P	-6,88	1,32·10 ⁻⁷	P
134OX_2-Py	-5,01	9,74·10 ⁻⁶	M	-6,12	7,64·10 ⁻⁷	P	-7,24	5,71·10 ⁻⁸	P
134OX_3-Py	-4,99	1,03·10 ⁻⁵	M	-6,08	8,41·10 ⁻⁷	P	-7,24	5,71·10 ⁻⁸	P
134OX_4-Py	-4,99	1,03·10 ⁻⁵	M	-6,08	8,41·10 ⁻⁷	P	-7,24	5,71·10 ⁻⁸	P
124OX_Ph	-5,90	1,26·10 ⁻⁶	M	-7,32	4,79·10 ⁻⁸	P	-7,62	2,42·10 ⁻⁸	P
124OX_Fur	-5,26	5,50·10 ⁻⁶	M	-6,66	2,18·10 ⁻⁷	P	-6,84	1,45·10 ⁻⁷	P
124OX_Tien	-5,75	1,78·10 ⁻⁶	M	-7,62	2,39·10 ⁻⁸	P	-6,88	1,32·10 ⁻⁷	P
124OX_2-Py	-5,26	5,53·10 ⁻⁶	M	-6,52	3,01·10 ⁻⁷	P	-7,24	5,71·10 ⁻⁸	P
124OX_3-Py	-5,23	5,86·10 ⁻⁶	M	-6,48	3,31·10 ⁻⁷	P	-7,24	5,71·10 ⁻⁸	P
124OX_4-Py	-5,23	5,86·10 ⁻⁶	M	-6,48	3,31·10 ⁻⁷	P	-7,24	5,71·10 ⁻⁸	P
MPA-NH-OH	-3,19	6,43·10 ⁻⁴	R	-4,31	4,89·10 ⁻⁵	M	-3,60	2,48·10 ⁻⁴	S
MPA-NH-NH₂	-3,02	9,50·10 ⁻⁴	R	-4,16	6,88·10 ⁻⁵	M	-3,82	1,51·10 ⁻⁴	S
MPA-NH₂	-3,22	5,98·10 ⁻⁴	R	-4,27	5,33·10 ⁻⁵	M	-3,78	1,66·10 ⁻⁴	S
MPA	-3,64	2,30·10 ⁻⁴	R	-4,83	1,49·10 ⁻⁵	M	-3,56	2,74·10 ⁻⁴	S
MMF	-4,02	9,54·10 ⁻⁵	M	-4,85	1,42·10 ⁻⁵	M	-4,79	1,64·10 ⁻⁵	M
Pano	-3,79	1,63·10 ⁻⁴	R	-4,27	5,32·10 ⁻⁵	M	-6,93	1,17·10 ⁻⁷	P

^a — klasa rozpuszczalności związku przypisana na podstawie wykonanej techniki obliczeniowej; R — związek rozpuszczalny (ang. *soluble*), M — związek umiarkowanie rozpuszczalny (ang. *moderate*), P — związek słabo rozpuszczalny (ang. *poor*).

Wyniki predykcji rozpuszczalności analizowanych pochodnych **MPA** w wodzie, zostały podsumowane w Tabeli 15. Można zauważyć, iż bioizostery cykliczne gorzej rozpuszczają się w tym rozpuszczalniku niż ich niecykliczne odpowiedniki, a te ostatnie osiągają wyniki zbliżone z wartościami zebranymi dla **MPA**. Badania te oparte są na modelu ESOL, Ali i SILICOS-IT, gdzie te dwa pierwsze nie poróżniają pochodnych 3- i 4-pirydylowych od siebie, zaś ten ostatni, SILICOS-IT, nie wskazuje różnic pomiędzy 1,3,4- i 1,2,4-oksadiazolami, a także położeniem atomu azotu w układzie pirydynowym. Ten ostatni powinien być stosowany, a jego wyniki analizowane z należytą ostrożnością.

Najwyższą lipofilnością, co do wartości współczynnika $\log S$, charakteryzują się pochodne fenyłowe oraz tienylowe, co jest zgodne z ogólnym rozumowaniem. Pochodne 1,3,4-oksadiazolu prezentują silniej hydrofilowy charakter niż ich odpowiedniki 1,2,4-oksadiazolowe, choć nie jest to aż tak widoczne przy wstępnej analizie wyników. Wyznaczenie średnich wartości dla danej klasy bioizosterów, dla konkretnego rodzaju estymacji, potwierdzają tę zależność ($\log S$: -5,19 i -5,44 dla modelu ESOL; -6,45 i -6,85 dla modelu Ali).

Na podstawie prostych rozważań teoretycznych o momencie dipolowym można stwierdzić, iż większa symetria rozkładu heteroatomów w cząsteczce może prowadzić do obniżenia momentu dipolowego na skutek równomiernego znoszenia się jego składowych. W efekcie, 1,3,4-oksadiazol miałby tę wartość niższą niż odpowiadający mu asymetryczny 1,2,4-oksadiazol. Niski moment dipolowy wiązany jest ze słabszym oddziaływaniem z polarnymi rozpuszczalnikami. Wartości $-\log S$ uzyskane w powyższych modelach prezentują jednak odwrotny trend w odniesieniu do wody. Wskazuje to na złożony charakter procesu rozpuszczania, zależny nie tylko od momentu dipolowego.



Rysunek 57. Mapa potencjału elektrostatycznego wykonana dla cząsteczek 1,3,4-oksadiazolu (A) i 1,2,4-oksadiazolu (B) [218]

W tej tematyce warto też zaprezentować mapy potencjału elektrostatycznego wykonane dla modeli uproszczonych, mianowicie — 1,3,4-oksadiazolu i 1,2,4-oksadiazolu (**Rysunek 57**). W tym pierwszym związku występuje obszar istotnie podwyższonej gęstości elektronowej zlokalizowany w pobliżu dwóch atomów azotu. Takiego zagęszczenia nie obserwuje się dla asymetrycznego 1,2,4-oksadiazolu. Można zatem wnioskować, iż skumulowanie ładunku w tym miejscu skutkuje silniejszymi oddziaływaniami z wodą, a tym samym — wyższą rozpuszczalnością w modelu obliczeniowym. Co istotne, z praktyki laboratoryjnej wynika, iż grupa 1,3,4-oksadiazoli słabiej rozpuszczała się w eluencie używanym w chromatografii kolumnowej, składającym się z układu toluen:octan etylu, 2:1 (v/v), niż odpowiednie 1,2,4-oksadiazole. W efekcie, związki te nanoszone były na kolumnę chromatograficzną w postaci dyspersji w silikażelu, *na sucho*. W przypadku tej drugiej klasy, możliwe było wprowadzanie ich w postaci roztworu. Koresponduje to z wynikami uzyskanymi dla niniejszej metody obliczeniowej.



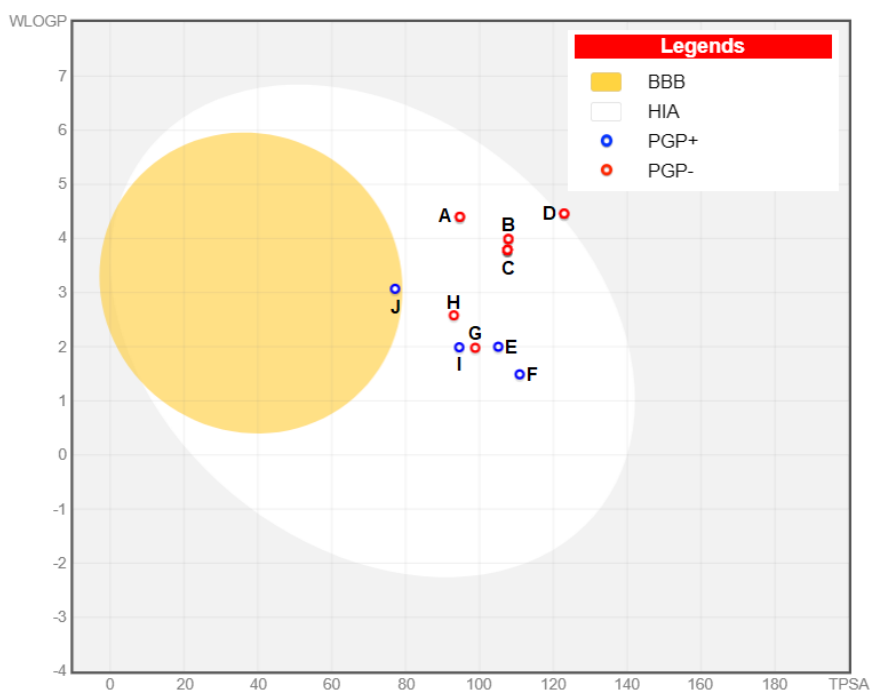
Rozpuszczalność bioizosterów niecyklicznych (w tym **MPA**) jest w ogólnym ujęciu o 2-3 rzędy wielkości większa niż ich cyklicznych odpowiedników. Można to wyjaśnić na drodze ich większej zdolności do tworzenia wiązań wodorowych. Kwasy hydroksamowe, amidy pierwszorzędowe i hydrazydy łatwiej są w stanie tworzyć tego typu oddziaływania ze względu na swobodny dostęp do obecnych w nich heteroatomów. W cyklicznym wariancie, heteroatomy wkomponowane są w sztywny pierścień aromatyczny. Pośród klasy związków odnośnikowych, **MMF** wykazuje najniższą rozpuszczalność, co można wiązać z obecnością dwóch grup estrowych i łańcucha węglowego we fragmencie pochodzącym od alkoholu. Jest to spójne z niską rozpuszczalnością **MMF** obserwowaną w czasie pracy z tym związkiem.

Model ESOL wydaje się być najbardziej odpowiedni dla tej grupy związków, gdyż poróżnia on wyniki dla różnych klas bioizosterów i ich podstawników, a także w jednoznaczny sposób uwzględnia różnice w rozpuszczalności **MPA** i **MMF**. W związku z faktem, iż przedstawione tu związki referencyjne mają zastosowanie kliniczne i w badaniach podstawowych, a ich rozpuszczalność jest dobrze określona na drodze rzeczywistych eksperymentów, wyniki osiągnięte dla bioizosterów cyklicznych i niecyklicznych wskazują na umiarkowane prawdopodobieństwo istotnie obniżonej rozpuszczalności tych związków w środowisku wodnym. Najbardziej prawdopodobne jest, iż związki fenylowane i tienylowane, a także z motywem 2-pirydylowym, a szczególnie te z rodzaju 1,3,4-oksadiazoli, będą w mniejszym stopniu rozpuszczać się w wodzie.

Choć model ten nie został zweryfikowany eksperymentami opartymi o analizę ilościową, jakościowa weryfikacja rozpuszczalności wykazała, iż największy problem z solubilizacją w badaniach biologicznych (badania *screeningowe*) miały jedynie **134OX_Fur** i **124OX_3-Py**. Świadczy to o przynajmniej częściowej, pozytywnej weryfikacji modelu ESOL.

6.4.3.3. Właściwości biologiczne

Poniżej znajduje się omówienie właściwości biologicznych wynikających wprost z diagramu BOILED-Egg (ang. *Brain Or IntestinaL EstimateD permeation method + egg*), będącego elementem narzędzia SwissADME. Jest to model predykcyjny, który działa poprzez kalkulację lipofilowości i polarności małych cząsteczek. Jednoczesne prognozy dotyczące przenikania przez barierę krew-mózg i jelit, uzyskuje się na podstawie deskryptorów fizykochemicznych i bezpośrednio przekłada się na interakcje na poziomie molekularnym dzięki szybkości, dokładności, prostocie koncepcyjnej i przejrzystej grafice modelu. BOILED-Egg ma różne zastosowania, w tym filtrowanie bibliotek chemicznych na wczesnych etapach odkrywania leków, a także ocenę przydatności cząsteczek-kandydatów [219].



Rysunek 58. Diagram BOILED-EGG przygotowany dla wszystkich testowanych związków bioizosterycznych oraz związków odniesienia. Oznaczenia literowe: **A** — pochodne fenylowe, **B** — pochodne 2-furylowe, **C** — pochodne pirydylowe, **D** — pochodne 2-tienylowe, **E** — MPA-CO-NH-OH, **F** — MPA-CONH-NH₂, **G** — MPA-CO-NH₂, **H** — MPA, **I** — MMF, **J** — Panobinostat.

Właściwość zwana skłonnością do bycia lekiem, określana jest w oparciu o spełnianie reguł Lipińskiego, Ghose'a, Vebera, Egana i Muegge'a, i może być zaprezentowana w formie grafu BOILED-Egg (w skojarzeniu: jajko sadzone, jajo gotowane). Jedynie trzy wykroczenia zostały zarejestrowane dla tej klasy pochodnych, a dokładniej uchybiona została reguła Muegge'a i związane to było ze słabą rozpuszczalnością pochodnych **134OX_Ph**, **124OX_Ph** i **124OX_Tien**. W ogólnym ujęciu, bioizostery charakteryzuje wysoka przyswajalność żołądkowo-jelitowa (ang. *human intestinal absorption*, HIA) i ograniczone przesiekanie przez barierę krew-mózg (ang. *blood-brain barrier*, BBB) (poza **Panobinostatem**) w modelu BOILED-Egg (**Rysunek 58**). Wskazuje to na zdolność przenikania tych związków ze światła jelita do krwioobiegu i brak stałej akumulacji w komórkach nerwowych. Warto nadmienić, iż model ten nie rozróżnia typów bioizosterów (**134OX** i **124OX**), a także sposobów ułożenia atomu azotu w pochodnych pirydylowych (**2-Py**, **3-Py** i **4-Py**).

Zdolność do inhibicji cytochromów jest także analizowana w ramach narzędzia SwissADME, jednak jej charakter nie może być określony prostą korelacją, gdyż zdecydowana większość pochodnych bioizosterycznych blokuje aktywność zgoła różnych cytochromów (w tym: CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 i CYP3A4). Wskazuje to na prawdopodobnie utrudniony metabolizm wątrobowy analizowanych cząsteczek. Dodatkowo, większość tych związków nie stanowi substratów dla P-glikoproteiny (PGP-) (poza **MPA-NH-OH**, **MPA-NH-NH₂**, **MMF** i **Panobinostatem**), stąd możliwe utrudnione wymywanie ich z centralnego układu nerwowego i podwyższone ryzyko bioakumulacji w organach.

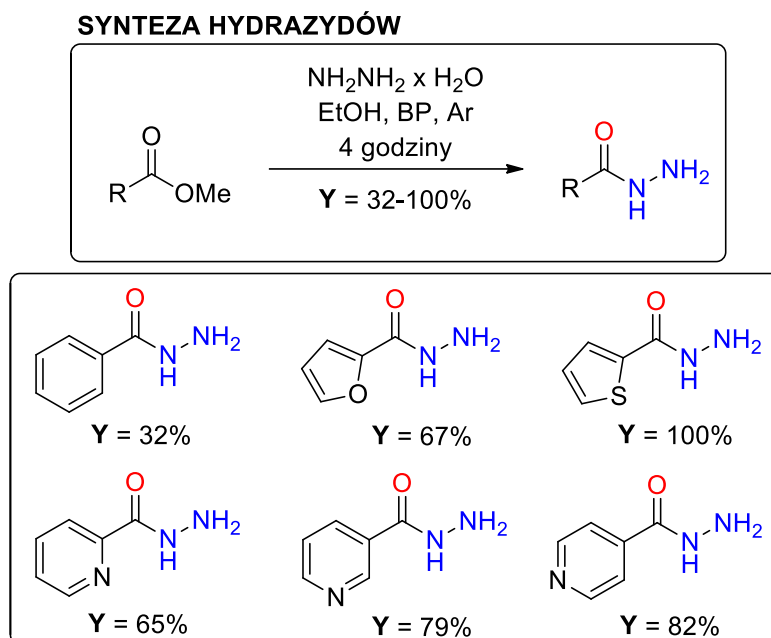
Jest to analiza oparta o parametry, które będą istotne dopiero w dalszej perspektywie, gdy związki wykażą odpowiednią aktywność *in vitro*, *in vivo*, a także, gdy określony i potwierdzony

zostanie ich dokładny mechanizm działania. Niemniej jednak, stanowi cenne źródło informacji o projektowanych cząsteczkach.

6.4.4. Synteza

W niniejszym punkcie rozdziału znajduje się opracowanie odnoszące się do syntezy bioizosterycznych pochodnych **MPA**, substratów koniecznych do ich otrzymania, a także innych, powiązanych procesów. Badania te wykonałem w oparciu o sprzęt i zasoby Katedry Chemii Organicznej Politechniki Gdańskiej oraz jednostki Chem&Tech przynależącej do KU Leuven, a także o materiały zakupione z wewnętrznego dofinansowania (Minigrant; nr zadania: DS035136) oraz środków Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej z projektu: STERowanie w kierunku Umiejdzynarodowienia Szkoły Doktorskiej (numer umowy: 13/STER/2023).

6.4.4.1. Hydrazydy



Schemat 63. Zestawienie wydajności syntez hydrazydów

Na **Schemacie 63** przedstawione zostały efekty reakcji hydrazynolizy estrów metylowych różnych aromatycznych kwasów karboksylowych. Przemiany te charakteryzowały się prostotą wykonania i nieskomplikowanymi reagentami użytymi do jej przeprowadzenia [220]. Związki te posłużyły za ekwiwalent azotowy, który wprowadzany był do struktury bioizosterycznych 1,3,4-oksadiazoli.

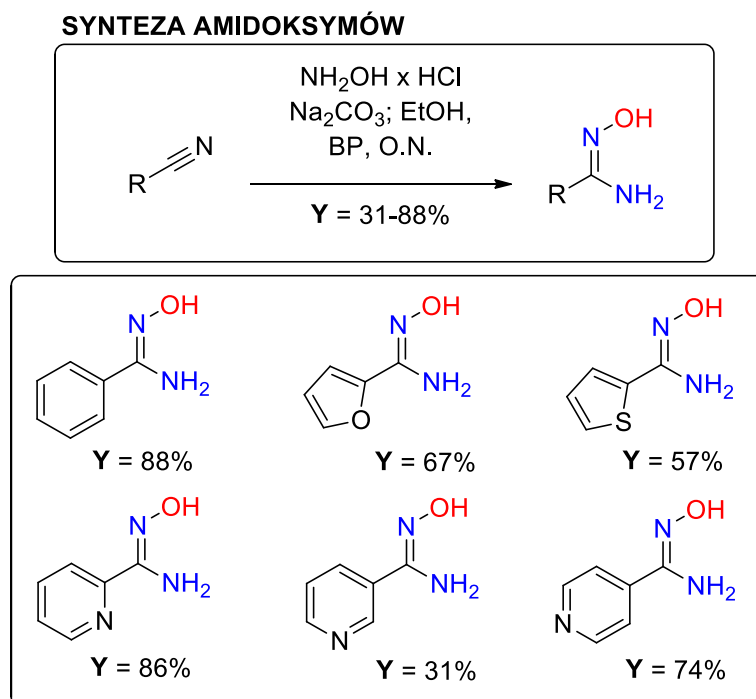
Jest to przykład substytucji nukleofilowej zachodzącej w układzie acylowym. Podłączone do grupy estrowej układy aromatyczne w różny sposób modyfikują jej właściwości elektrofilowe, co skutkuje niejednakowymi wydajnościami otrzymywania hydrazydów. Stosunkowo niska wydajność otrzymywania benzohydrazydu wynikała wprost z jego wysokiej rozpuszczalności w wodzie, co obserwowane było w czasie krystalizacji tego związku, czy też oczyszczania

technikami ekstrakcyjnymi. W ogólnym ujęciu, hydrazydy nie wymagały oczyszczenia po zakończonej reakcji.

W ramach różnych podstawień w układzie pirydynowym obserwuje się trend, który wskazuje, że im bliżej grupy estrowej znajduje się heteroatom, atom azotu, tym niższa jest wydajność procesu. Można to wiązać z potencjalnymi oddziaływaniami odpychającymi występującymi pomiędzy silnie elektroujemnymi pierwiastkami, które obecne są zarówno w układzie pirydynowym, jak i hydrazynie. W przypadku heterocykli pięciocłonowych, można zauważyć, że mniej elektroujemny atom siarki w tiofenie pozwolił na uzyskanie wyższej wydajności tej transformacji, w porównaniu z odpowiednikiem furanowym.

Związki te charakteryzowały się znaczną stabilnością, w czasie przechowywania w -15°C , jedynie pochodna furylowa uległa wybarwieniu na kolor żółto-różowy, stanowiąc o postępie procesu jej degradacji. Jest to spójne z ogólnymi właściwościami furanu, który jako związek o charakterze zarówno aromatycznym, jak i eteru enolowego, jest podatny na hydrolizę.

6.4.4.2. Amidoksymy



Schemat 64. Zestawienie wydajności syntez amidoksymów

Schemat 64 stanowi podsumowanie wyników reakcji otrzymywania amidoksymów z odpowiednich nityli aromatycznych, pod wpływem chlorowodoru hydroksyloaminy, w środowisku zasadowym. Metoda użyta w niniejszej przemianie została przedstawiona już wcześniej w literaturze [221]. Amidoksymy posłużyły w dalszym etapie w syntezie bioizosterycznych pochodnych 1,2,4-oksadiazolu, stanowiąc ekwiwalent tlenowo-azotowy w tych przemianach.

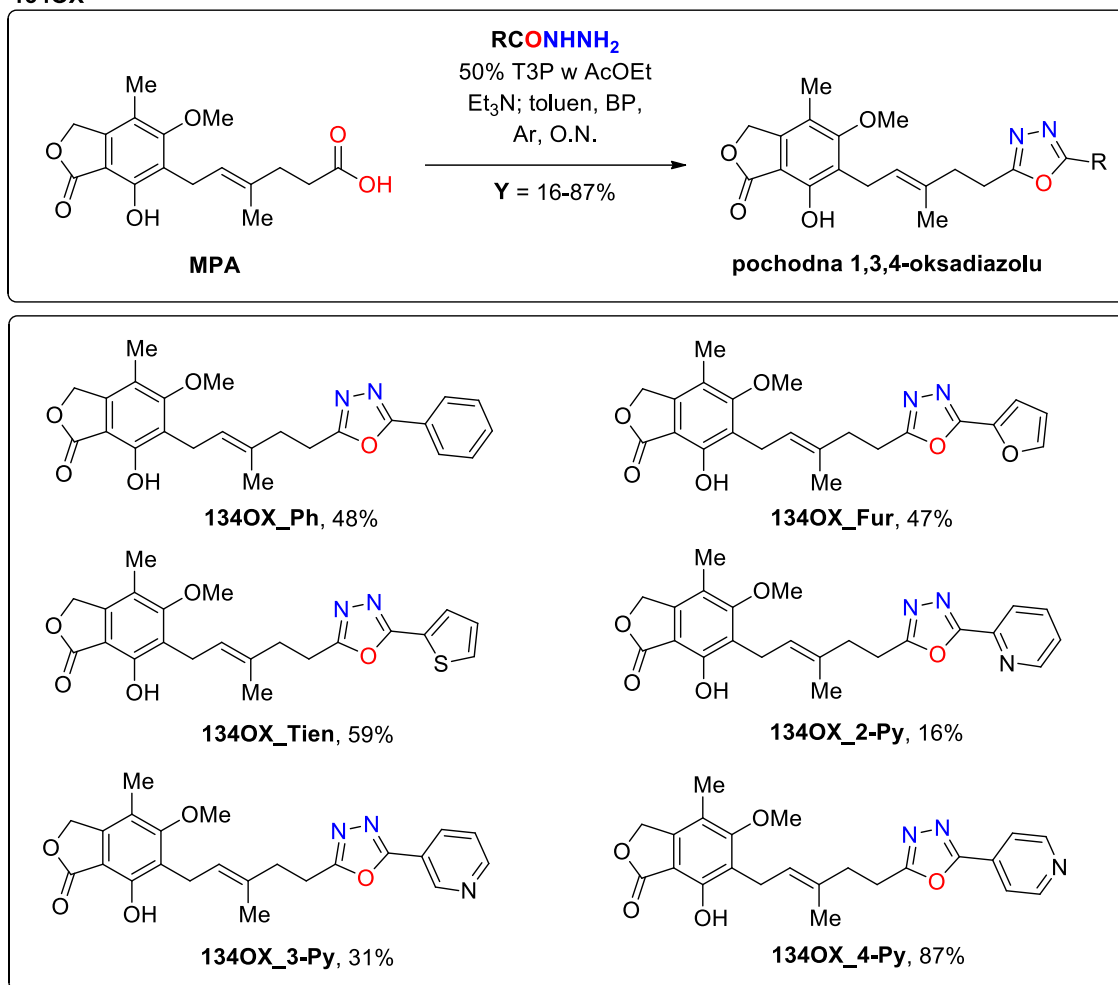
Metodę tę cechuje prostota wykonania i powtarzalność uzyskanych wyników. Produkty scharakteryzowane techniką ^1H NMR wykazywały znaczny stopień czystości, a jedyne piki



szczątkowe można by było przypisać sygnałom pochodzącym od substratu, a nie potencjalnych produktów hydrolizy (np. amidów). Trend wyznaczony przez pochodne pirydyny wynika z efektu mezomerycznego, który jest silnie zaznaczony w pochodnych 2-pirydylowych i 4-pirydylowych, zaś słabo w przypadku 3-pirydylowej. Podstawnik w pozycji 2 i 4 może silnie oddziaływać z heteroatomem poprzez układ sprzężonych wiązań podwójnych.

6.4.4.3. Pochodne bioizosteryczne MPA oparte na rdzeniu 1,3,4-oksadiazolu

134OX



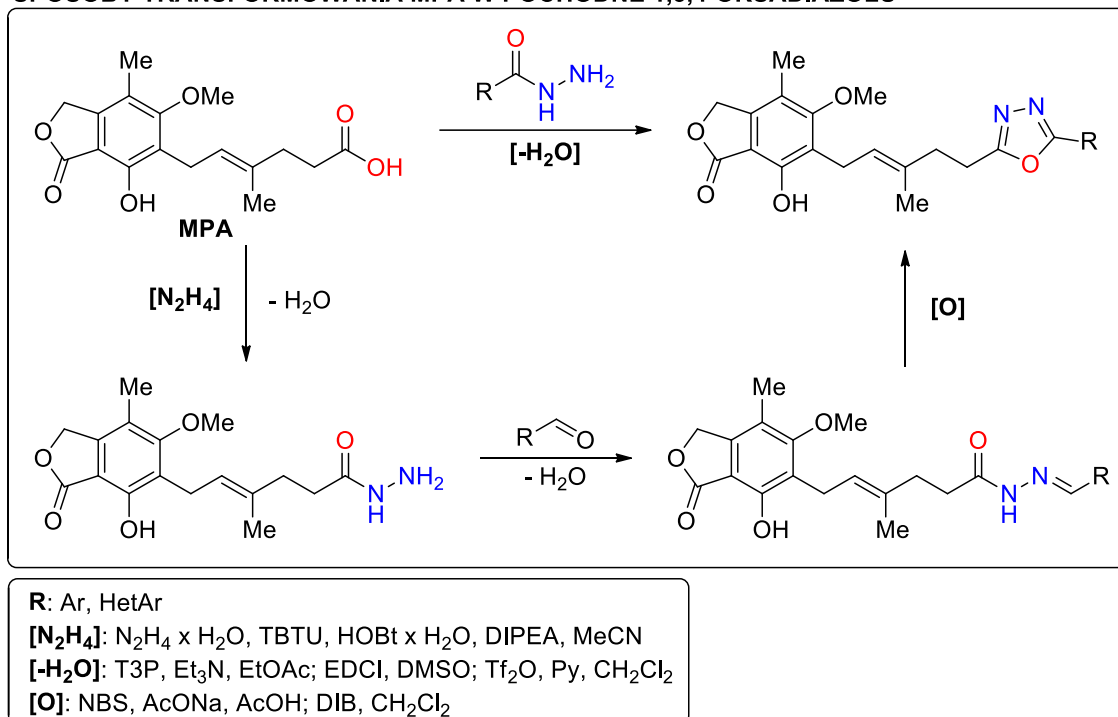
Schemat 65. Zestawienie wydajności syntezy bioizosterycznych pochodnych 1,3,4-oksadiazolu

Powyżej, na **Schemacie 65**, zestawione zostały efekty reakcji otrzymywania bioizosterów opartych o rdzeń 1,3,4-oksadiazolu. Metodologia ich tworzenia związana jest z reakcją odwadniającą cyklizacji, która biegnie pomiędzy **MPA** a odpowiednim hydrazidem. Jak można zauważyć, w tej kondensacji wydzielaniu ulegają dwie cząsteczki wody, zatem można wydzielić etap pośredni, a mianowicie — tworzenie diacylohydrazyny. Czynnikiem odwadniającym zastosowanym w tej transformacji był bezwodnik kwasu propanofosfonowego (T3P), jako 50% roztwór w octanie etylu, a także podwyższona temperatura. użytą zasadą była trietyloamina. Przemiany tego typu zostały opisane już wcześniej w literaturze, choć często dla prostszych



modeli strukturalnych i innych substratów [222-224]. Warto nadmienić, iż T3P nie jest jedynym czynnikiem odwadniającym stosowanym w tego typu reakcjach [225, 226].

SPOSOBY TRANSFORMOWANIA MPA W POCHODNE 1,3,4-OXSADIAZOLU



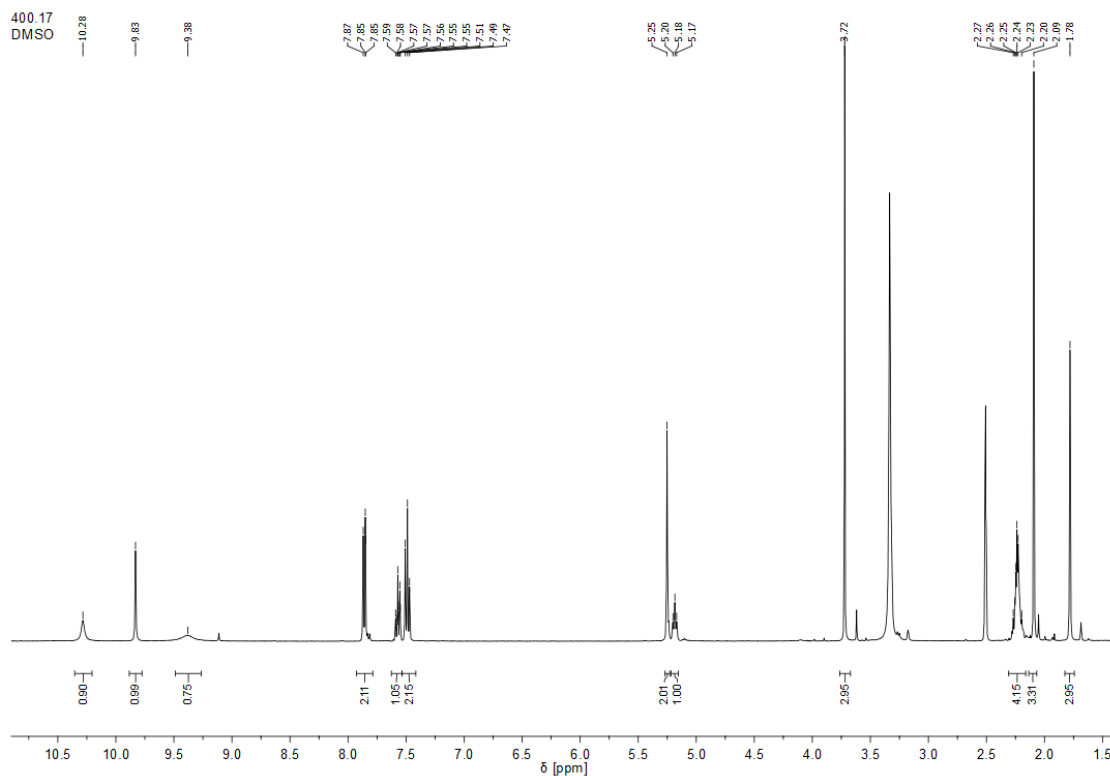
Schemat 66. Sposoby transformowania **MPA** w pochodne 1,3,4-oksadiazolu

Zanim metoda odwadniającej cyklizacji została wybrana, rozważana była także alternatywa w postaci utleniającej cyklizacji. Polegałaby ona na transformacji **MPA** w jego hydrazyd, następnie przeprowadzenie jego reakcji z odpowiednim aldehydem aromatycznym, co skutkowałoby powstaniem *N'*-acylowanej iminy, a na sam koniec byłaby ona utleniana z jednoczesnym zamknięciem pierścienia 1,3,4-oksadiazolu. Reakcje tego typu zostały już opisane w literaturze [227, 228]. Inne podejście związane było z desulfuryzacją odpowiednich *N'*-acylowanych tiosemikarbazydów pod wpływem organicznych związków jodu hiperwalencyjnego, tu: IBX [229]. Podejścia te zostały podsumowane na **Schemacie 66**.

Metoda oksydatywnej cyklizacji została zaniechana ze względu na potencjalne zajście reakcji ubocznych pomiędzy licznymi grupami funkcyjnymi **MPA** a czynnikiem utleniającym, a także początkowym problemem z otrzymaniem hydrazynu **MPA**. Dodatkowo, analizując parametry fizykochemiczne tego ostatniego związku, jego dalsza transformacja pod wpływem aldehydów aromatycznych, mogłaby nie dać zakładanych produktów. Parametrem ograniczającym byłyby rozpuszczalność powstałych reagentów. Niemniej jednak, próby takie nie zostały przeprowadzone, głównie ze względu na ryzyko interakcji utleniaczy z np. wiązaniem podwójnym czy grupą fenolową **MPA**. Ponadto, koszt funkcjonalizacji **MPA** istotnie przewyższa nakładochłonność transformacji w ramach szeroko dostępnych kwasów karboksylowych. Proste reakcje estryfikacji oraz hydrazynolizy są znacznie tańsze w przeprowadzeniu niż transformacja **MPA** w jego hydrazyd, o niskiej ekonomii atomowej (*vide infra*).



W efekcie powyższych rozważań, do syntezy pochodnych 1,3,4-oksadiazolu powzięta została metoda oparta o T3P, w obecności trietyloaminy, w temperaturze wrzenia octanu etylu. Początkowo używany rozpuszczalnik nie pozwolił jednak na otrzymanie planowanego produktu. Na drodze izolacji chromatograficznej, możliwe było jednak odzyskanie diacylohydrazyny, z wydajnością 36%. Widmo ^1H NMR tej pochodnej zostało przedstawione na **Rysunku 59**.



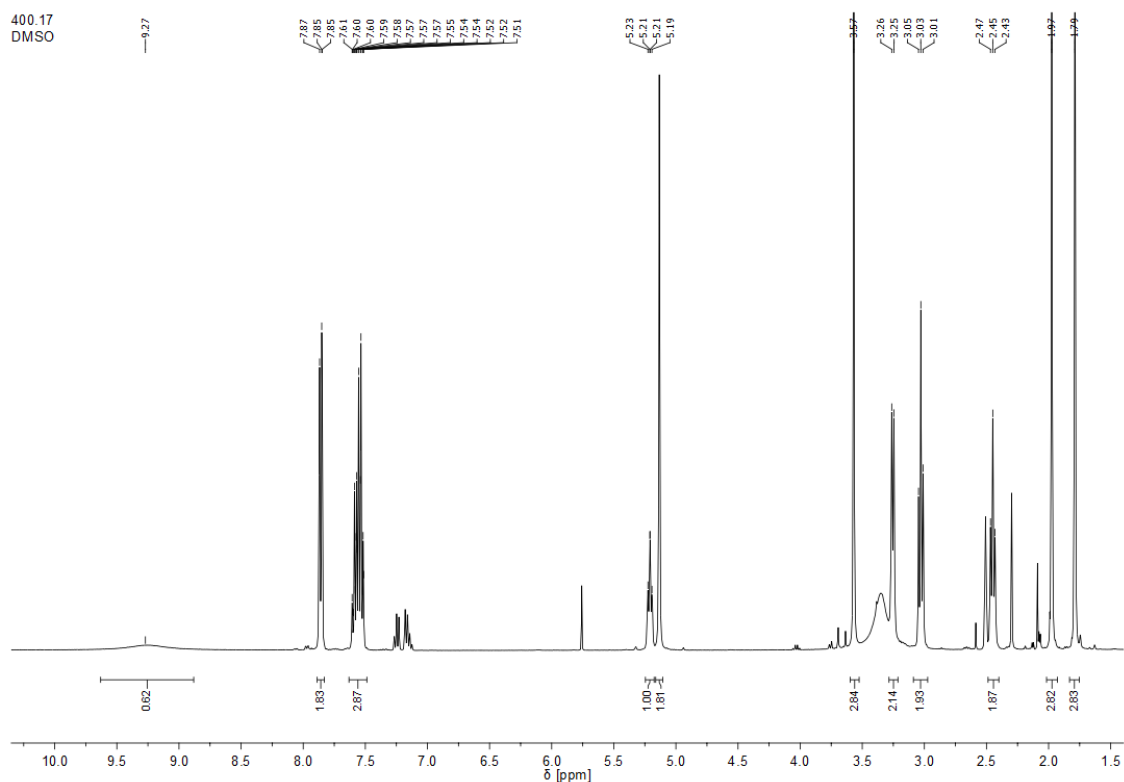
Rysunek 59. Widmo ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) *N,N'*-diacylohydrazyny otrzymanej w wyniku kondensacji **MPA** i benzohydrazynu

Na powyższym widmie można wyraźnie dostrzec obecność dwóch pików typu amidowego w okolicy przesunięcia chemicznego równego: 10,28 oraz 9,83 ppm. Przy 9,38 ppm znajduje się sygnał protonu wolnej grupy fenolowej, podobnie jak w poprzednich badaniach (6.2.2.1. Amidy zbudowane z rdzenia **MPA** i amin heteroaromatycznych). Protony typu benzyłowego, obecne przy pierwszym atomie węgla łańcucha bocznego, nie są widoczne na powyższym widmie, najpewniej z powodu pokrycia je przez sygnał pochodzący od wody. Otrzymana diacylohydrazyna charakteryzowała się bardzo niską rozpuszczalnością w klasycznych rozpuszczalnikach organicznych, a sporządzenie próbki pozwalającej na zarejestrowanie widma ^1H NMR w DMSO- d_6 było trudne i wymagało podgrzania roztworu. Choć związek ten był oczyszczany z wykorzystaniem chromatografii kolumnowej, metoda ta była niezwykle nakładochłonna, szczególnie pod kątem użycia rozpuszczalników i czasu prowadzenia procesu.

W obliczu niecałkowitego odwodnienia, postanowiłem przeprowadzić reakcję w rozpuszczalniku, który ma wyższą temperaturę wrzenia. Choć dostępna jest cała gama takich substancji, to toluen był moim pierwszym wyborem. Rozpuszczalnik ten jest znany jako czynnik



azeotropujący, pozwalający na usunięcie wody i innych rozpuszczalników z próbek związków organicznych, metodą destylacji, a także jako typowe medium do prowadzenia reakcji dehydratacji. Jest związkiem o średniej temperaturze wrzenia równej 111-112°C i wysokiej lotności. W istocie, zastosowanie tej substancji pozwoliło na przeprowadzenie reakcji odwadniającej cyklizacji z uzyskaniem pożądanego produktu oraz pozostałych układów bioizosterycznych. Widmo ^1H NMR pochodnej **134OX_Ph** przedstawione jest na **Rysunku 60**.



Rysunek 60. Widmo ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) bioizosteru **134OX_Ph** powstałego w wyniku kondensacji **MPA** i benzohydrazdu w wyższej temperaturze

Zanik protonów typu amidowego na widmie ^1H NMR wskazuje na przeprowadzenie tej reakcji z sukcesem. Choć próbka ta zawierała pewne ilości resztkowych rozpuszczalników (chlorek metylenu, toluen, octan etylu), jej czystość określona techniką HPLC była na poziomie 100%. Wartość przesunięcia chemicznego dla protonu pochodzącego od wolnej grupy fenolowej, była w tej klasie pochodnych na poziomie 9,30 ppm. Choć pochodne bioizosteryczne **MPA** lepiej rozpuszczały się w klasycznych rozpuszczalnikach organicznych niż omawiana wcześniej diacylohydrazyna, nie były to związki łatwo rozpuszczalne. W odwrotny sposób zachowywały się za to pochodne 1,2,4-oksadiazolu.

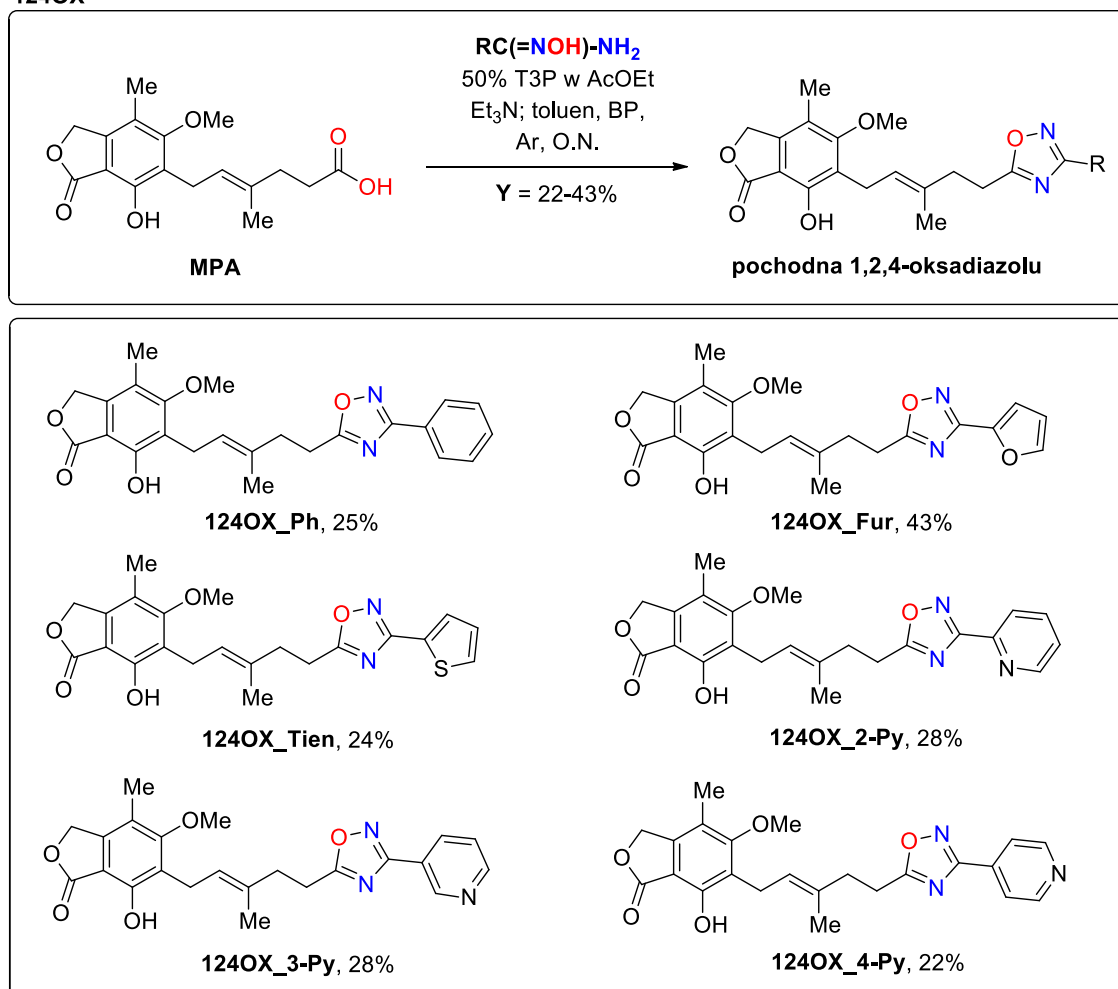
Na podstawie pozytywnego skutku reakcji wynikającego z wymiany rozpuszczalnika, uzyskana została seria pochodnych 1,3,4-oksadiazolowych. Przedstawione na **Schemacie 65** efekty tej transformacji wskazują, iż wzrost polarności układu aromatycznego przekłada się na spadek wydajności (**134OX_Fur** i **134OX_Tien**). W grupie pochodnych pirydyny, najniższą wydajność odnotowano dla związku 2-pirydylowego (**134OX_2-Py**), a najwyższą dla 4-pirydylowego (**134OX_4-Py**). Taki trend wynikał najpewniej z dezaktywującego wpływu

bliskości heteroatomu do grupy hydrazydowej w pierścieniu pirydyny. Wydawać by się mogło, iż terminalny atom azotu grupy hydrazydowej nie powinien aż tak silnie być zależnym od efektów elektronowych w pierścieniu, ze względu na niemożliwą delokalizację elektronów, niemniej jednak, udział efektu indukcyjnego jest znaczący przy rozpatrywaniu jego aktywności nukleofilowej.

Warunki przedstawionej reakcji powodowały częściową degradację substratów, czego efektem było żółknięcie mieszaniny reakcyjnej po całkowitym ogrzewaniu w temperaturze wrzenia toluenu i w atmosferze gazu obojętnego. Choć w literaturze chemicznej można się natknąć na informację, iż pewien rodzaj hydrazydów, pochodne hydrazidu fталowego, ulegają rozkładowi dopiero w temperaturze na poziomie 340°C [230], nie można wykluczyć, iż stosowane w tej reakcji cząsteczki nie ulegają termicznej dekompozycji już przy 112°C. Obecność środowiska odwadniającego i zasadowego, a także ewentualna fotodegradacja, również mogą mieć wpływ na wybarwienie mieszaniny poreakcyjnej i potencjalnie zmniejszenie wydajności przemiany.

6.4.4.4. Pochodne bioizosteryczne MPA oparte na rdzeniu 1,2,4-oksadiazolu

124OX



Schemat 67. Zestawienie wydajności syntezy bioizosterycznych pochodnych 1,2,4-oksadiazolu



Na **Schemacie 67** zestawione zostały wyniki otrzymywania bioizosterów opartych na rdzeniu 1,2,4-oksadiazolu. W tym przypadku, również zastosowano ogrzewanie mieszaniny w temperaturze wrzenia toluenu, w obecności T3P i trietyloaminy. Pozwoliło to na uzyskanie sześciu związków, choć ze słabszymi wydajnościami niż te przedstawione wcześniej.

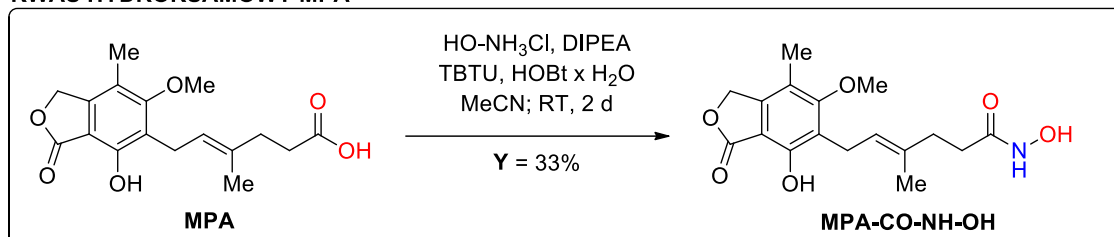
W związku z tym, że przemiana ta również zakłada kondensację zachodzącą pomiędzy **MPA** i odpowiednim amidoksymem, wykorzystanie czynników kondensujących było jak najbardziej uzasadnione. Natura tej transformacji, według reguł Baldwina, określona jest jako *5-endo-trig*, co wskazuje na tworzenie pięcioczłonowego pierścienia z atakiem nukleofilowym na układ kształtu trygonalnego, w wewnętrznym obrębie tworzonego pierścienia, jest taka sama jak w przypadku formowania 1,3,4-oksadiazolu.

W tym wypadku jednak, istnieje jeden nukleofil zdolny do zamknięcia pierścienia, jest nim grupa aminowa w *O*-acylowanym amidoksymie tworzącym się jako produkt pośredni. W efekcie, wydajność tworzenia 1,2,4-oksadiazoli jest widocznie zredukowana w odniesieniu do wcześniejszej klasy heterocykli. Rozpatrzenie tego efektu nie jest jednak proste, gdyż odnosi się do porównania zdolności nukleofilowych amidowego atomu azotu i tlenu. Na efektywność przemiany może mieć również wpływ potencjalna reakcja uboczna amidoksymu, w której rzeczony związek ulega deaminacji do *N*-tlenku nitrylu pod wpływem czynnika odwadniającego. Podobne zjawisko omawiane było w punkcie rozdziału 4.2.6. 1,2,4-Oksadiazole.

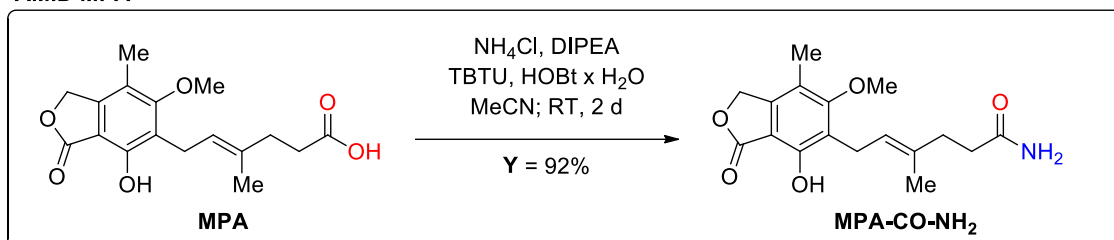
Próba otrzymania produktu pośredniego, *O*-acylowanego amidoksymu, nie została przeprowadzona ze względu na ograniczenie czasowe oraz skuteczność zastosowanej metody. Transformacja ta stanowiłaby istotne uzupełnienie optymalizacji tego procesu. Wysoce prawdopodobne jest, iż wysoka temperatura reakcji prowadzi do silniej posuniętej degradacji substratów, gdyż wybarwienie mieszanin poreakcyjnych było bardziej intensywne, niż w przypadku otrzymywania 1,3,4-oksadiazoli. W literaturze można natknąć się na informację, iż proces ten, także prowadzono w toluenie, jednak z wykorzystaniem innej metody aktywacji grupy karboksylowej, charakteryzował się wydajnościami na poziomie 50-60% [231]. Warto jednak odnotować, że żaden z zastosowanych modeli nie zawierał wolnej grupy fenolowej, tak jak cząsteczka **MPA**. Wskazuje to na to, że o ile możliwe jest przeprowadzenie transformacji we wrzącym toluenie z zadowalającymi wydajnościami, o tyle wolna grupa fenolowa może ulegać innym reakcjom, prowadząc do większej puli produktów ubocznych, tym samym obniżając wydajność.

6.4.4.5. Niecykliczne bioizostery MPA

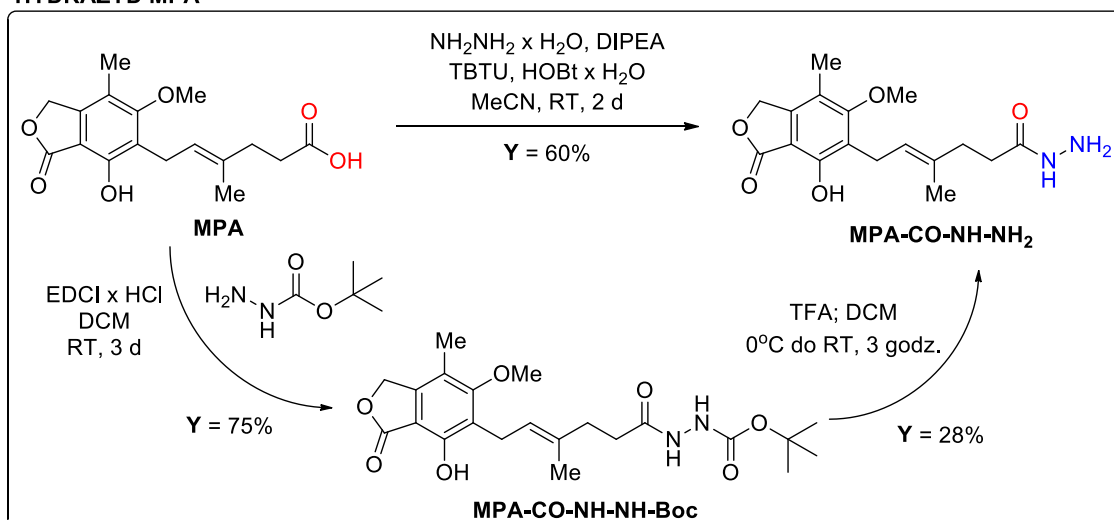
KWAS HYDROKSAMOWY MPA



AMID MPA



HYDRAZYD MPA



Schemat 68. Zestawienie wydajności syntezy bioizosterycznych pochodnych niecyklicznych

Na powyższym schemacie (**Schemat 68**) zamieszczone zostały metody syntezy niecyklicznych, otwartołańcuchowych pochodnych bioizosterycznych **MPA**. W tym zbiorze wymienia się: kwas hydroksamowy, amid pierwszorzędowy oraz hydrazyd **MPA**. Związki te stanowią uzupełnienie do pochodnych 1,3,4- i 1,2,4-oksadiazolowych, jako związki bioizosteryczne, lecz o większej podatności na hydrolizę (degradację), z uwolnieniem aktywnej cząsteczki **MPA**.

Pierwszą z omawianych pochodnych jest kwas hydroksamowy **MPA**, **MPA-CO-NH-OH**. Został on już otrzymany w przeszłości z 19 i 38% wydajnością [41]. Uzyskana wartość jest zatem zbieżna z opisem literaturowym. Dzięki zastosowanej tu metodzie możliwe było otrzymanie znacznej ilości amidowych pochodnych **MPA** we wcześniejszej części opracowania. Dzięki pracy autorów [41], wiadomo, że ochrona wolnej grupy fenolowej istotnie wpływa na podwyższenie wydajności procesu otrzymywania pochodnych kwasów hydroksamowych. Należy mieć na

uwadze jednak, iż efekt końcowy obu ścieżek otrzymywania **MPA-CO-NH-OH** będzie taki sam, lub podobny, gdyż w trakcie procesu deprotekcji możliwa jest utrata części zakładanego produktu.

Otrzymana cząsteczka jest fotoczuła, ulega wybarwieniu na kolor żółto-zielony po pewnym czasie ekspozycji na światło. Ponadto, jako związek z grupy kwasów hydroksamowych, zdolny jest do wiązania jonów metali przejściowych, a szczególnie cynku i żelaza(III) [232]. Wybarwienie cząsteczki obserwowane jest nawet przy niewielkich ilościach jonów metali obecnych w wodzie dejonizowanej, szczególnie chętnie w warunkach zasadowych. Z wykorzystaniem widma ^1H NMR możliwe było rozróżnienie sygnałów pochodzących od atomów wodoru związanych z heteroatomami. Wskazywało to na otrzymanie zakładanego produktu, a nie wariantu diacylowanej hydroksyloaminy.

Kolejną omawianą pochodną jest amid pierwszorzędowy **MPA**, **MPA-CO-NH₂**. Związek ten był już wcześniej otrzymany [42], lecz z niższą wydajnością i w odmiennych warunkach, choć także opierających się na uzyskaniu estru aktywnego **MPA**. Wydajność procesu otrzymywania **MPA-CO-NH₂** z wykorzystaniem układu EDCI/HOSu wyniosła 77%. Zastosowane tutaj warunki pozwoliły na bardziej efektywne otrzymanie tego związku.

Metoda ta, która powstała w oparciu o wzorzec literaturowy [233], zasługuje na szczególną uwagę, gdyż pozwala w przystępny sposób otrzymać amid pierwszorzędowy związku wielofunkcyjnego, z ominięciem wody amoniakalnej, której obecność może przynajmniej częściowo doprowadzać do hydrolizy produktu pośredniego. Wydajność tej transformacji jest spójna z tymi, które obserwowano w przypadku syntezy amidowych pochodnych **MPA**. Choć znana, klasyczna metoda otrzymywania amidów pierwszorzędowych, biegnąca przez chlorek kwasu karboksylowego, który wkraplany jest bezpośrednio na wodę amoniakalną, jest przemianą zachodzącą z wysokimi wydajnościami, to przeniesienie jej na ten model nie musiałoby doprowadzić do podobnych wyników. Wynika to z faktu, iż **MPA** jako związek wielofunkcyjny, wrażliwy jest na działanie skrajnych wartości pH. Dodatkowo, pracując przy niewielkich ilościach **MPA**, na poziomie 50-100 mg, operując ich 2 mL roztworami, zatężając je i później wkraplając do wody amoniakalnej, można utracić znaczną ilość związku w trakcie transferu między naczyniami. W takim wypadku, metoda oparta na jednonaczyniowym (ang. *one-pot reaction*) mieszanii reagentów jest bardziej korzystna z technicznego punktu widzenia, choć jej ekonomia atomowa jest na niskim poziomie.

Ostatnią z omawianych tu pochodnych niecyklicznych jest hydrazyd **MPA**, **MPA-CO-NH-NH₂**. Nie było możliwe znalezienie metody jego syntezy z wykorzystaniem bazy danych Reaxys, choć *N*'-podstawione hydrazydy **MPA** są opisywane w literaturze [234]. Początkowo, zastosowana metoda bazująca na układzie TBTU/HOBt, przynajmniej pozornie nie przyniosła oczekiwanych skutków. Z tego powodu, przeprowadziłem przemianę biegnącą przez produkt pośredni, **MPA-CO-NH-NH-Boc**, który poddany działaniu kwasu trifluorooctowego generuje oczekiwany produkt końcowy.

Metoda bezpośrednia, choć dała oczekiwany, biały osad po odpowiednio długim czasie mieszania (pozytywnie rozpoznany jako hydrazyd **MPA**), została niepoprawnie przeze mnie zinterpretowana. Powstały produkt nie miał wyraźnie zaznaczonych sygnałów od grupy $-\text{NH}_2$,

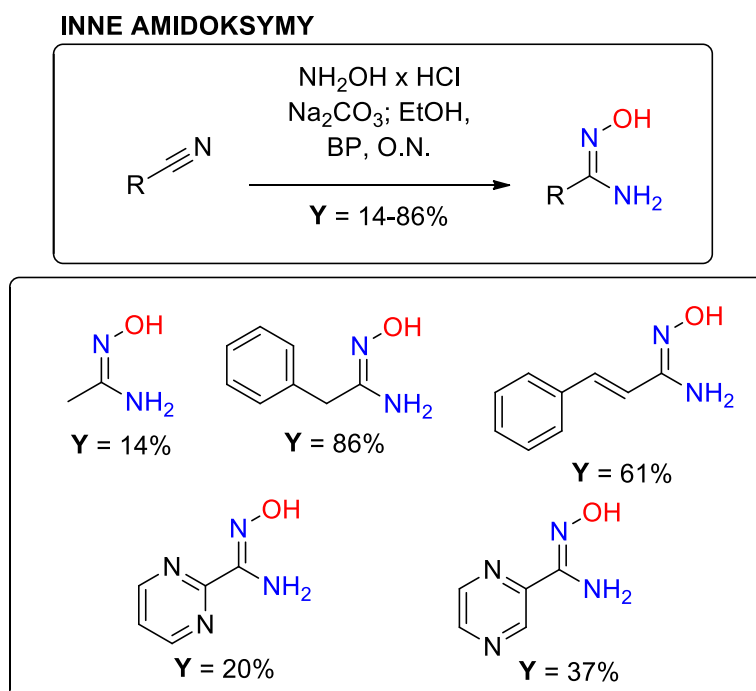
w technice ^1H NMR, w grupie hydrazydowej, dlatego narodził się pomysł przeprowadzenia reakcji metodą niebezpośrednią. Dodatkowo, próba chemiczna wykorzystująca odczynnik ninhydrynowy nie pozwoliła na jednoznaczne określenie, czy analizowana metodą TLC cząsteczka przynależy do klasy amin. Nukleofilowość terminalnego atomu azotu jest podwyższona na skutek efektu α , dlatego tym bardziej związek ten powinien być skłonny do reagowania z ninhydryną, dając efekt barwny. Nie udało się go jednak zaobserwować.

Związek ten został ostatecznie poprawnie zidentyfikowany w oparciu o metodę niebezpośrednią, w której niemożliwe byłoby tworzenie diacylowanej hydrazyny. Współczynnik R_F otrzymanego produktu pokrywał się z tym, który obserwowałem w metodzie bezpośredniej. Wykonana została także pełna charakterystyka związku. Istotnym mankamentem tej metody jest niewątpliwie jej niska wydajność całkowita, która wynosi 21%. Największą stratę obserwuje się w przypadku usuwania grupy ochronnej w środowisku TFA.

Warto też dodać, iż widma ^1H NMR wykonane w $\text{DMSO}-d_6$ pozwoliły na zaobserwowanie pików pobocznych (ang. *sideband*) dla hydrazidu **MPA** oraz jego formy *N*-chronionej. Są to piki szczątkowe, które są rezultatem zarejestrowania różnych rotamerów obecnych w grupie hydrazydowej, których powstanie związane jest z zahamowaną rotacją wiązania C-N i N-N [235]. Niekiedy takie piki uznawane są za zanieczyszczenia, jednak rozliczność formujących się rotamerów, w określonej temperaturze i rozpuszczalniku, dostatecznie dobrze tłumaczy ich formowanie i skłania do ponownego rozpatrzenia analizowanych sygnałów.

6.4.4.6. Inne

Inne amidoksymy



Schemat 69. Zestawienie wydajności syntez innych amidoksymów

Na **Schemacie 69** przedstawiono syntezę innych amidoksymów, czyli takich, które nie posłużyły do syntezy związków bioizosterycznych. Jest to efekt uboczny prac prowadzonych w czasie stażu naukowego w KU Leuven. Otrzymanie tej klasy pochodnych wynikało wprost z chęci wytworzenia jak największej puli różnych motywów strukturalnych, w oparciu o ogromne zasoby jednostki badawczej, do której pojechałem. W związku z ograniczeniem czasowym, nie byłem w stanie otrzymać odpowiadających tym amidoksymom hydrazydów, dlatego zaniechałem dalszego kontynuowania tego wątku. Te dwie grupy bioizosterów, pochodne 1,3,4-oksadiazolowe i 1,2,4-oksadiazolowe, w zamyśle miały zawierać równą liczbę odpowiednich motywów strukturalnych, stąd brak podjęcia dalszych kroków.

Analiza wyników przedstawionych na powyższym schemacie wskazuje, iż w niektórych przypadkach wydajność procesu była obniżona. Wyniki są jednak zbieżne z tymi, przedstawionymi w literaturze. Efektywność reakcji dla poszczególnych nitryli, jako substratów, była następująca: acetonitryl — 47% [236], cyjanek benzylu — 95% [237], (*E*)-cynamonitryl — 58% [231], 2-cyjanopirymidyna — 46% [238], 2-cyjanopirazyna — 43% [238].

Na obniżenie to mogła mieć wpływ ekstrakcja octanem etylu, który okazał się być rozpuszczalnikiem nieodpowiednim dla wysoce polarnych amidoksymów. W tej sytuacji, pożądany produkt pozostawał w wodzie. Wysolenie warstwy wodnej, a także użycie innych, bardziej polarnych rozpuszczalników, mogłoby poprawić efektywność tych procesów. Niektóre przepisy wskazują na techniki krystalizacji oraz wytrącania na zimno, jako te właściwe do podwyższenia odzysku zakładanego produktu. Metoda ta jednak nie była optymalizowana. Związki te udało się jednak otrzymać i scharakteryzować techniką ^1H NMR.

Bioizosteryczna pochodna *RS*-ibuprofenu (134OX_Ibu)

Na **Schemacie 70** zestawiono zbiór procesów prowadzących do otrzymania bioizosterycznej pochodnej **MPA** opartej na rdzeniu racemicznego ibuprofenu, **134OX_Ibu**. Choć dobudowanie struktury niesteroidowego leku przeciwzapalnego do **MPA**, nie mieści się w podstawowym zbiorze transformacji, próba taka została wykonana ze względu na chęć optymalizacji właściwości farmakokinetycznych, która w ogólnym ujęciu przyświeca temu projektowi. Dodatkowo zakładam, iż koniugat ten może wykazywać nowe właściwości terapeutyczne, oparte o podstawowe bioaktywności łączonych cząsteczek — immunosupresyjną i przeciwzapalną. Może zostać osiągnięty synergizm działania oraz nowe, niezbadane dotąd cele terapeutyczne. Pochodna ta otwiera też pewną drogę pod kątem otrzymywania optycznie czynnych derywatów **MPA**. Choć związek ten nie został przetestowany w badaniach biologicznych, jego otrzymanie jest możliwe, z wydajnością całkowitą wynoszącą około 20%. Dalsze prace z nim związane są uzależnione od pełnych wyników opracowań biologicznych wykonanych dla podstawowych bioizosterów.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl



a potencjalnie rozpuszczalne w chloroformie składniki takie jak: krospowidon, hydroksypropyloceluloza, makrogol 400 oraz воск Carnauba, nie przeszły do przesączu i nie stanowiły istotnego zanieczyszczenia na widmie ^1H NMR. W związku z tym, że ibuprofen występuje w tym preparacie w formie mieszaniny racemicznej, problematyka racemizacji nie występuje, tak długo jak nie jest obecne środowisko chiralne w otoczeniu.

Transformację ibuprofenu w jego ester metylowy przeprowadziłem z wykorzystaniem warunków klasycznej estryfikacji Fischera, w obecności metanolu i kwasu siarkowego(VI). Przemianę tę charakteryzuje wysoka wydajność oraz prostota wykonania. Ponownie, brak składników chiralnych w otoczeniu wykluczył konieczność analizy czystości optycznej produktu.

Kolejnym krokiem była transformacja uzyskanego uprzednio estru metylowego w odpowiadający mu hydrazyd. Reakcję tę wykonano w oparciu o wcześniej przeprowadzone eksperymenty, które posłużyły w syntezie pochodnych 1,3,4-oksadiazolowych. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, iż ten ester alifatycznego kwasu karboksylowego uległ hydrazynolizie z wydłużonym czasem reakcji. Analiza TLC wykazała, iż stopień konwersji substratu w produkt jest niesatysfakcjonujący po 4 godzinach, a w ciągu tego czasu pozostałe estrы metylowe, aromatyczne i heteroaromatyczne, uległy wydajnej przemianie. Można to wiązać z odmienną elektrofilowością obu rodzajów estrów, większą w przypadku estrów aromatycznych i heteroaromatycznych, a także wyższą zawadą steryczną w estrze metylowym ibuprofenu. Jako cząsteczka niepłaska, z podstawnikiem o sporych wymiarach, mniej wydajnie reaguje z cząsteczką hydrazyny.

W ostatnim etapie otrzymany hydrazyd ibuprofenu transformowano w pochodną bioizosteryczną **MPA**, zgodnie z warunkami przytoczonymi już wcześniej. Wydajność tego procesu, wynosząca 26%, jest spójna z uzyskanymi wcześniej dla pochodnych 1,3,4- oraz 1,2,4-oksadiazolu, a jej wymiar można wiązać z zawadą steryczną jaką wnosi element struktury ibuprofenu, a także nieznacznie odmiennym charakterem nukleofilowym terminalnego atomu azotu. W związku z tym, że **134OX_Ibu** nie został włączony do podstawowej puli związków, wykonana została jedynie jego podstawowa charakterystyka, z wykorzystaniem techniki ^1H NMR. Analiza ^{13}C NMR mogłaby uzupełnić interesujący trend odnoszący się do przesunięć chemicznych osiąganych przez heteroaromatyczne atomy węgla.

Izolacja poszczególnych enancjomerów z mieszaniny racemicznej, na drodze różnicowania diastereoizomerycznego, bądź technik chromatograficznych bazujących na złożach chiralnych, pozwoliłaby na określenie stosunku eudysmicznego, który wskazałby, który z nich jest bardziej aktywny w przeprowadzonych badaniach biologicznych. Dałoby to podstawę pod interesujący wątek badawczy chiralnych pochodnych **MPA**, szczególnie w kontekście właściwości immunosupresyjnych i przeciwzapalnych.

6.4.5. Badania biologiczne

W niniejszym punkcie rozdziału znajduje się opracowanie odnoszące się do badań biologicznych bioizosterycznych pochodnych **MPA**. Eksperymenty te obejmują między innymi profilowanie przeciwnowotworowe dla badanych związków wobec szeregu linii komórek

nowotworowych (adherentnych i w zawieszynie). Badania te zostały wykonane w oparciu o sprzęt i zasoby Laboratorium Wirusologii i Chemioterapii Instytutu Rega (Belgia). Eksperymenty te oraz opracowanie wyników wykonali: Leentje Persoons, Dominique Schols i Steven De Jonghe z tego samego ośrodka.

6.4.5.1. Profilowanie na szeregu linii komórek nowotworowych

W związku z faktem, iż aktywność wyznaczonego na drodze odwrotnego dokowania i dokowania molekularnego celu molekularnego dla nowej klasy pochodnych **MPA** — HDAC6 — związana jest z rakowaceniem, przeprowadzenie badań przesiewowych (ang. *screening*) na szeregu linii komórek nowotworowych, pozwoliłoby na ocenę cząsteczek-kandydatów pod kątem aktywności przeciwnowotworowej. Wykonanie eksperymentów na komórkach nowotworów litych, czy hematologicznych, pozwoliłoby na identyfikację najbardziej obiecujących pochodnych bioizosterycznych, co stanowi podstawę pod dalsze badania mechanistyczne oraz potencjalnie *in vivo*.

Poniżej znajdują się dwie tabele zestawiające wyniki takich testów, przeprowadzonych w oparciu o kultury komórkowe adherentne (uczepione ścian naczyń) oraz hodowane w zawieszynie. Istotą testów przesiewowych jest przebadanie jak największej liczby pochodnych, w sposób możliwie jak najszybszy i nie generujący znacznych kosztów. Z tego powodu, wykonuje się jedynie po dwa eksperymenty przypadające na związek, w warunkach danej linii komórkowej. Takie podejście nie pozwala to na określenie współczynnika IC_{50} wyrażonego w formie wartości powiększonej, bądź pomniejszonej o błąd statystyczny.

Badanie to należy traktować jako szeroko zakrojoną próbę odejścia od podstawowych właściwości immunosupresyjnych **MPA**, choć aktywności tej nie można wykluczyć ze względu na wyraźnie zarysowany motyw strukturalny **MPA** pozostający w strukturze bioizosterów.

Dobór zastosowanych hodowli komórkowych wynika wprost z praktyki laboratoryjnej osób wykonujących niniejsze badania. Z punktu widzenia istotności wyników zakłada się, iż linia komórek LN229, czyli hodowli powiązanej z glejakiem wielopostaciowym (złośliwy nowotwór mózgu), jest najsilniej powiązana z aktywnością HDACs, gdyż typowe inhibitory tych enzymów doprowadziły do katastrofy mitotycznej i śmierci komórkowej, i to efektywniej niż to wynikało z aktywności związku referencyjnego (temozolomid) [239]. Dodatkowo, warto zwrócić uwagę na linię komórek HCT-116, odnoszącą się do raka jelita grubego, gdyż inny, znany inhibitor HDAC klasy I, efektywnie hamował proliferację tych komórek, na drodze indukcji apoptozy zależnej od kaspaz [240].

Warto wspomnieć, iż użyte w tych eksperymentach związki, dostatecznie dobrze rozpuszczały się w użytym medium, choć w przypadku **134OX_Fur** i **124OX_3-Py**, odnotowano nieznacznie ograniczoną mieszalność.

Tabela 16. Zestawienie wyników testów przesiewowych w warunkach linii komórek nowotworowych, w kulturach adherentnych

Symbol	Wartość współczynnika CC ₅₀ (IC ₅₀) dla kultur adherentnych [μM]							
	Capan-1		HCT-116		LN229		NCI-H460	
	Nr 1	Nr 2	Nr 1	Nr 2	Nr 1	Nr 2	Nr 1	Nr 2
134OX								
134OX_Ph	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
134OX_Fur	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
134OX_Tien	60,10	54,90	>100	>100	>100	>100	>100	>100
134OX_2-Py	55,70	54,80	>100	>100	>100	>100	53,90	57,40
134OX_3-Py	44,00	46,20	91,00	>100	>100	>100	>100	>100
134OX_4-Py	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
124OX								
124OX_Ph	16,40	13,30	79,50	86,40	>100	>100	>100	>100
124OX_Fur	11,60	11,00	27,20	32,20	>100	>100	>100	>100
124OX_Tien	35,20	33,70	71,30	68,50	>100	>100	>100	>100
124OX_2-Py	42,40	47,10	85,10	95,90	>100	>100	>100	>100
124OX_3-Py	28,50	38,80	83,20	83,90	>100	>100	>100	>100
124OX_4-Py	35,30	39,60	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Bioizostery niecykliczne								
MPA-CO-NH-OH	1,60	1,30	2,70	2,50	4,40	5,80	9,20	8,40
MPA-CO-NH-NH ₂	8,50	9,10	20,00	16,70	62,60	57,50	>100	98,90
MPA-CO-NH ₂	2,80	2,30	5,50	5,40	13,70	15,20	41,80	41,70
Związki odniesienia								
MPA	0,20	0,20	0,80	0,50	3,80	2,60	2,00	2,90
MMF	0,06	0,06	0,20	0,20	1,20	1,30	3,70	3,40
Panobinostat	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03
Etoposide	0,04	0,09	2,90	3,40	4,80	5,40	4,90	4,00
Nocodazole	0,02	0,03	0,02	0,05	0,10	0,13	0,17	0,19

W Tabeli 16 zaprezentowane zostały wyniki badań przesiewowych dla wszystkich pochodnych bioizosterycznych, w odniesieniu do hodowli adherentnych. Najwyższą aktywność, wyrażoną w postaci współczynnika CC₅₀ (IC₅₀) zaobserwowano w przypadku pochodnych: **134OX_3-Py**, **124OX_Fur** oraz **MPA-CO-NH-OH**. Osiągnięte wyniki są o rząd lub dwa rzędy wielkości wyższe, niż w przypadku związków odniesienia. Nawet **MPA** i **MMF**, które niezmiennie stanowią wewnętrzny wzorzec, efektywniej hamują rozwój komórek raka, co wskazuje, iż niniejsza funkcjonalizacja nie pozwoliła na osiągnięcie aktywności przeciwnowotworowej na zakładanym poziomie. Oczywisty zdaje się być rezultat osiągnięty dla **Panobinostatu** oraz innych związków o aktywności przeciwnowotworowej.

Rozważania teoretyczne na temat potencjalnej skuteczności niepotwierdzonych inhibitorów HDAC6 w zwalczaniu poszczególnych komórek raka, są zbyt dalekie od rzeczywistego funkcjonowania układu, nawet w warunkach *in vitro*. Da się również zauważyć, iż bioizostery niecykliczne, są w ogólnym ujęciu bardziej cytotoksyczne niż ich cykliczne odpowiedniki. Może mieć to związek z większym prawdopodobieństwem uwolnienia **MPA**, jako

substancji aktywnej farmakologicznie, w czasie badań prowadzonych w medium komórkowym. Warto jednak zaznaczyć, iż największy potencjał w odniesieniu do aktywności przeciwnowotworowej zdradza kwas hydroksamowy **MPA**, **MPA-CO-NH-OH**, co jest w pewnym sensie spójnym uzupełnieniem wyników osiągniętych w stosunku do linii komórek HeLa opisanych już wcześniej [41].

Tabela 17. Zestawienie wyników testów przesiewowych w warunkach linii komórek nowotworowych, w kulturach w zawiesinie

Symbol	Wartość współczynnika CC ₅₀ (IC ₅₀) dla kultur w zawiesinie [μM]							
	DND-41		HL-60		K562		Z138	
	Nr 1	Nr 2	Nr 1	Nr 2	Nr 1	Nr 2	Nr 1	Nr 2
134OX								
134OX_Ph	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
134OX_Fur	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
134OX_Tien	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
134OX_2-Py	>100	>100	>100	>100	80,20	76,30	>100	>100
134OX_3-Py	76,50	73,60	46,40	63,60	63,60	81,50	47,80	51,50
134OX_4-Py	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
124OX								
124OX_Ph	91,00	86,40	>100	>100	>100	>100	61,10	59,60
124OX_Fur	26,30	26,30	13,60	17,50	14,90	16,20	12,30	13,80
124OX_Tien	>100	>100	>100	>100	74,70	70,30	68,20	69,10
124OX_2-Py	52,40	60,00	52,70	72,60	55,80	52,70	51,40	55,20
124OX_3-Py	60,50	51,00	43,70	47,90	55,00	51,00	44,20	44,20
124OX_4-Py	59,50	64,10	35,40	56,80	54,80	53,30	33,40	36,00
Bioizostery niecykliczne								
MPA-CO-NH-OH	4,00	2,40	2,10	2,40	1,80	2,30	1,90	2,10
MPA-CO-NH-NH ₂	21,70	20,10	12,40	14,40	11,50	11,00	9,30	10,80
MPA-CO-NH ₂	7,10	5,10	4,50	6,10	3,70	4,30	3,40	6,10
Związki odniesienia								
MPA	0,80	0,90	1,60	1,40	0,60	0,80	4,70	1,00
MMF	1,00	0,30	0,20	0,30	0,10	0,10	0,10	0,30
Panobinostat	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01
Etoposide	0,03	0,06	0,08	0,09	1,90	1,70	0,06	0,05
Nocodazole	0,02	0,01	0,02	0,03	0,02	0,01	0,02	0,03

W Tabeli 17 zaprezentowane zostały wyniki badań przesiewowych dla wszystkich pochodnych bioizosterycznych, w odniesieniu do komórek hodowanych w zawiesinie. Najwyższą aktywność zanotowano ponownie w przypadku pochodnych: **134OX_3-Py**, **124OX_Fur** oraz **MPA-CO-NH-OH**, z podobnie obniżoną aktywnością co do rzędu wielkości. Dodatkowo, pośród innych bioizosterów, pochodna **124OX_4-Py** wykazuje stosunkowo wysoką cytotoksyczność w odniesieniu do linii komórek Z138.

Ponownie, niniejsze podstawienie bioizosteryczne zdaje się nie działać właściwie w kontekście podnoszenia właściwości cytotoksycznych w stosunku do prezentowanych modeli raka, w testach *in vitro*. Najbardziej prawdopodobne jest, iż bioizostery niecykliczne, zawierające

wiele atomów tlenu i azotu, mogą najefektywniej hamować rozwój tych komórek, możliwe dzięki większej zdolności do efektywnego wiązania w centrum aktywnym i/lub z jonem cynku odpowiedzialnym za funkcjonowanie wielu enzymów HDAC. Niemniej jednak, cząsteczki **134OX_3-Py**, **124OX_Fur**, **MPA-CO-NH-OH** oraz ewentualnie **124OX_4-Py**, stanowią najbardziej obiecujące przykłady bioizosterów, których dalsza funkcjonalizacja może doprowadzić do zakładanej bioaktywności.

Wprowadzone zmiany strukturalne, mogą w efekcie doprowadzić do modyfikacji typowego, podstawowego mechanizmu działania **MPA**, który związany jest między innymi z dezaktywacją w czasie procesu glukuronidacji. W związku z tym, że obecność wolnej grupy fenolowej oraz podatność na glukuronidację nie są w przypadku aktywności inhibicyjnej wobec HDAC czynnikami limitującymi, możliwe jest dalsze transformowanie rdzenia **MPA**, być może oparte o acylowanie wolnej grupy fenolowej. Pomysł ten byłby spójny z wynikami osiągniętymi już wcześniej [41].

6.4.5.2. Aktywność biologiczna bioizosterów w odniesieniu do linii komórek T-Jurkat oraz PBMC

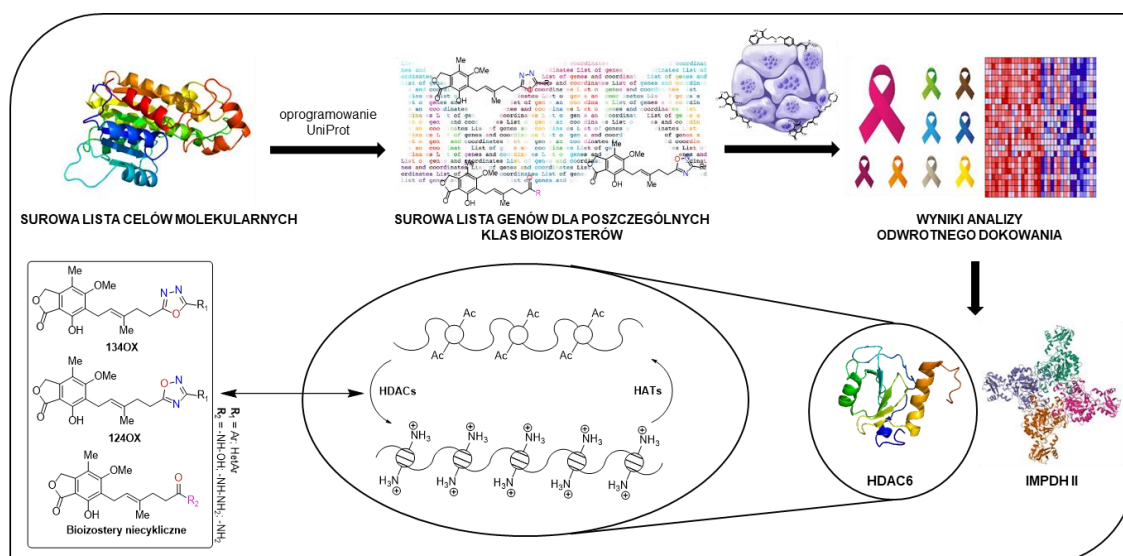
Aktywność biologiczna, która pokrywa badanie: cytotoksyczności, właściwości antyproliferacyjnych oraz wyznaczenie mechanizmu działania (test GMP), jest obecnie (grudzień 2024 roku) określana przez dr hab. inż. Dorotę Iwaszkiewicz-Grześ w Zakładzie Immunologii Klinicznej i Transplantologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

6.4.5.3. Test enzymatyczny HDAC6

Aktywność enzymatyczna pochodnych bioizosterycznych, w teście fluorescencyjnym, określana jest obecnie (grudzień 2024 roku) przez dr. Damiana Garbicza w Zakładzie Immunoterapii Eksperymentalnej Narodowego Instytutu Onkologii.

6.4.6. Podsumowanie

Abstrakt graficzny zestawiający część wyników osiągniętych w tematyce bioizosterycznych pochodnych **MPA** został przedstawiony na **Rysunku 61**.



Rysunek 61. Abstrakt graficzny podsumowujący część pracy wykonanej w ramach bioizosterycznych pochodnych **MPA**

Niniejsza praca eksperymentalna składa się z 3 części: badań komputerowych, syntezy oraz częściowych eksperymentów biologicznych, prowadzonych w ramach bioizosterycznych pochodnych **MPA**. Pomysł rozpoczęcia tego tematu wynikł z przeglądu literatury oraz badań nad amidowymi pochodnymi **MPA**, w których atom tlenu i azotu w części terminalnej **MPA** wpływał na aktywność immunosupresyjną.

W celu zweryfikowania hipotezy badawczej, iż bioizostery pochodzące od 1,3,4-oksadiazolu, 1,2,4-oksadiazolu oraz prostsze, niecykliczne pochodne kwasu hydroksamowego, hydrazynu oraz aminy pierwszorzędowej, mogą mieć inną aktywność biologiczną, być może wynikającą z hamowania aktywności HDACs, przeprowadzono badania komputerowe. Po pierwsze, odwrotne dokowanie pozytywnie zweryfikowało założenie, iż HDACs stanowią cel molekularny dla tej klasy cząsteczek, z wyszczególnieniem typu HDAC6, a także wskazało dobre dopasowanie do IMPDH1, jako efekt posiadania w swym rdzeniu motywu strukturalnego **MPA**. W związku z tym, że IMPDH1 jest nieodpowiednim celem molekularnym, ze względu na jego niską ekspresję w komórkach, zdecydowałem się na powzięcie IMPDH2 jako odpowiednika.

W kolejnym kroku, na drodze eksperymentu dokowania molekularnego, sprawdziłem siłę wiązania zaprojektowanych cząsteczek z wyznaczonymi enzymami. Mają one nieznacznie podwyższony potencjał do hamowania obu z nich, w odniesieniu do **MPA**. Bioizostery cykliczne nie posiadają zdolności do aktywnego oddziaływania z jonem cynku katalitycznego w centrum aktywnym HDAC6, przez co istnieje spore ryzyko nie wykazywania przez nie aktywności wobec tego białka, choć należy mieć na uwadze, iż możliwe jest również wiązanie ligandów przez miejsca allosteryczne (wejście do kieszeni katalitycznej). Niemniej jednak, jedynie rzeczywiste eksperymenty są w stanie zweryfikować te wartości.

Uzupełniłem powyższe badania komputerowe o predykcję parametrów fizykochemicznych i właściwości farmakokinetycznych bioizosterów **MPA**, z wykorzystaniem narzędzia SwissADME. Najważniejszym wnioskiem płynącym z tej analizy było to, że

1,3,4-oksadiazole charakteryzują się wyższą hydrofilowością, niż ich 1,2,4-oksadiazolowe odpowiedniki, lecz niższą niż bioizostery niecykliczne. Miało to swoje odzwierciedlenie w gorszej rozpuszczalności układów 134OX w rozpuszczalnikach niepolarnych. Dodatkowo, związki te mogą nie ulegać prostemu metabolizmowi wątrobowemu (są inhibitorami niektórych cytochromów) i odkładać się w organach. Dodatkowo, cząsteczki te w wyraźny sposób nie łamią zasad imiennych, stanowiących o skłonności związku do bycia lekiem.

Częściowo pozytywna weryfikacja hipotezy badawczej doprowadziła mnie do konieczności uzyskania tej klasy cząsteczek. Syntezę rozpocząłem od otrzymywania hydrazydów oraz amidoksymów, które posłużyły mi jako elementy budulcowe pierścienia, odpowiednio, 1,3,4-oksadiazoli i 1,2,4-oksadiazoli, w reakcji odwaniającej cyklizacji z **MPA**. W ten sposób uzyskałem 12 pochodnych cyklicznych. Na drodze prostych metod sprzęgania, pozyskałem również 3 pochodne niecykliczne. Każda z omawianych cząsteczek została scharakteryzowana oraz określono jej czystość.

W ostatnim etapie, projektowane związki zostały poddane badaniom przesiewowym na serii komórek nowotworowych. Wynika stąd, iż większość bioizosterów jest mniej cytotoksyczna wobec nich niż związki odniesienia (**MPA**, **MMF** i **Panobinostat**), o 1-3 rzędy wielkości co do współczynnika CC₅₀. Najbardziej obiecujące wyniki otrzymano dla pochodnych niecyklicznych, a szczególnie dla **MPA-CO-NH-OH**, a także dla niektórych cyklicznych — **134OX_3-Py** i **124OX_Fur**. Niestety, wyniki te negatywnie weryfikują skuteczność podstawienia bioizosterycznego, w ramach którego grupa karboksylowa **MPA** została przetransformowana w bioizostery cykliczne, które zostało wykonane, by znaleźć inne zastosowania rdzenia **MPA**.

Niektóre z badań biologicznych nie zostały jeszcze wykonane. Test enzymatyczny HDAC6 zweryfikowałby bezpośrednio wyniki dokowania molekularnego do tego białka, a badania biologiczne na linii komórek T-Jurkat oraz PMBCs — skuteczność tych związków jako potencjalnych immunosupresantów, z wykazaniem mechanizmu na drodze testu GMP.

6.5. Podsumowanie

6.5.1. Omówienie wyników

W ramach niniejszej pracy doktorskiej, przeprowadziłem syntezę 49 pochodnych **MPA**, które podzielone były odpowiednio na 3 podklasy: amidy (**A1-A18**), estry (**MP1-MP9**, **P1-P7**) oraz bioizostery (**134OX** (6), **124OX** (6) i **niecykliczne** (3)). W odniesieniu do hipotez badawczych postawionych w sekcji Cele badawcze można stwierdzić, że w przypadku każdej podgrupy cząsteczek możliwa była synteza bez zastosowania grupy ochronnej, z najwyższymi wydajnościami notowanymi dla amidów, następnie dla bioizosterów, a na sam koniec — estrów **MPA**. Związki te charakteryzowały się wysoką czystością, ponad 95% dla 48 przypadków, oraz łatwo były identyfikowalne przy pomocy technik NMR oraz HR-MS. W ramach poszczególnych klas związków prowadziłem również uzupełniające prace badawcze mające na celu poszerzenie puli dobudowywanych struktur, bądź sprawdzenie stosowalność przeprowadzonych syntez w innych zastosowaniach.

Dodatkowo, przeprowadziłem badania odwrotnego dokowania oraz analizę właściwości fizykochemicznych przy użyciu narzędzia SwissADME dla grupy pochodnych bioizosterycznych. Miało to na celu wyznaczenie nowego celu molekularnego oraz ocenę rozpuszczalności analizowanych ligandów, wraz z predykcją ich potencjału terapeutycznego. Spośród szeregu białek, to HDAC6 oraz IMPDH2 okazały się być najlepiej dopasowane do większości ligandów, choć da się zauważyć większą tendencję bioizosterów niecyklicznych do wiązania IMPDH2, niż ich cyklicznych odpowiedników. Warto dodać, że związki te nie łamią większości reguł imiennych stosowanych w analizie potencjału cząsteczek do bycia lekiem, a także nie prezentują się jako słabo rozpuszczalne w wodzie, co zachęciło mnie do otrzymania i zbadania tej serii pochodnych.

Badania aktywności biologicznej obejmujące: test cytotoksyczności wobec komórek T-Jurkat, AsPC-1 oraz PBMC, czy szeregu linii komórek nowotworowych (badania przesiewowe), analizę właściwości antyproliferacyjnych wobec linii komórek PBMC, określenie fazy apoptozy, test GMP, badanie właściwości antyoksydacyjnych w teście DPPH, inhibicja enzymu w teście HDAC6, a także dokowanie molekularne do enzymów HDAC6 i IMPDH2 zostały wykonane przez współautorów naszych prac. Część wyników została przeanalizowana przeze mnie samodzielnie, a część przez osoby współodpowiedzialne za prowadzone badania.

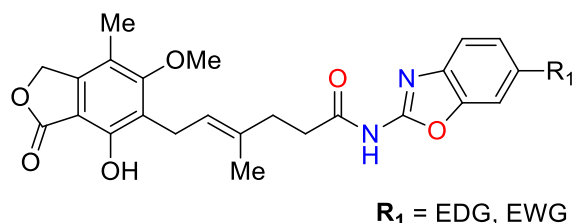
Innymi słowy, otrzymanie i scharakteryzowanie przeze mnie kilku klas nowych pochodnych **MPA** umożliwiło wstępne poznanie ich aktywności immunosupresyjnych, a w niektórych przypadkach cytotoksycznych wobec komórek nowotworowych.

Bazując na badaniach dokowania molekularnego można wskazać oddziaływania występujące pomiędzy rdzeniem **MPA** oraz dobudowanym do niego fragmentem heterocyklicznym a aminokwasami w miejscu wiążącym enzymu. Obserwowane są oddziaływania z podjednostkami Gly326, Thr333 i Gln441, a także oddziaływania π - π , z cząsteczką IMP. Analizując przypadek **A2**, a dokładniej jego element heteroaromatyczny i mostek amidowy, może również wskazać oddziaływania elektrostatycznie z kilkoma resztami aminokwasowymi, np. Ser276 i Gln441. Wszystkie te prawdopodobne interakcje mogą stabilizować kompleks enzym-ligand, zapewniając odpowiednie dopasowanie **A2** i wyższą aktywność hamującą wobec docelowego białka, co przekłada się na jego aktywność biologiczną w przytoczonych warunkach.

Określona wartość wewnętrznego współczynnika selektywności (stosunek współczynnika IC_{50} PBMCs do T-Jurkat), IS, dla pochodnych amidowych **MPA** mieści się w granicach 0,61-12,01, gdzie dla **MPA** wynosi on 20,67. Wskazuje to na fakt, że ponad połowa pochodnych (10 z 18) wykazuje istotną selektywność w aktywności cytotoksycznej wobec komórek T-Jurkat, przewyższającą wartość 1,00. Obserwowany efekt nie jest jednak silniejszy niż w przypadku wzorcowej cząsteczki **MPA**. Ze względu na niską rozpuszczalność w wodzie, aż dla sześciu pochodnych nie udało się wyznaczyć tego parametru.

Analog benzo[d]oksazolowy, **A2**, wykazał najbardziej zbliżoną do **MPA** aktywność antyproliferacyjną, przy jednocześnie zredukowanej cytotoksyczności wobec zdrowych komórek. Dodatkowo, działa jako inhibitor IMPDH, co zostało wykazane na podstawie testu GMP. Stąd, wartościowe mogłoby się okazać przebadanie poszerzonej klasy funkcjonalizowanych

pochodnych benzo[d]oksazoli (**Rysunek 62**). Dokładniejsza analiza oddziaływań w ramach dokowania molekularnego mogłaby doprowadzić do właściwego kierunku derywatywacji oraz szerszego poznania aktywności cytotoksycznej. Przetestowanie ich na innych wzorcach komórek zdrowych, np. fibroblastach i hepatocytach, dałoby bardziej wyraźną odpowiedź co do skuteczności modyfikacji, która pierwotnie zakładała redukcję polekowych skutków ubocznych. Dodatkowo, wartościowe by było przeanalizowanie jak ta klasa związków oddziałuje z genami kodującymi szlaki metaboliczne i sygnałowe, tak istotnych w procesach związanych z immunosupresją.



Rysunek 62. Wzór strukturalny funkcjonalizowanych benzo[d]oksazolowych pochodnych **MPA**

W toku prac prowadzonych nad estrowymi pochodnymi **MPA** wykazałem, że 4 cząsteczki prezentują szczególnie interesujące właściwości. Są nimi koniugaty: **P7** (keton malinowy), **P4** (o-kumaran metylu), **MP9** (izoeugenol) i **P1** (sezamol), a ich aktywność była wykazana wielotorowo, np. związki **P7**, **P4** i **MP9** wykazały cytotoksyczność wobec komórek AsPC-1 na podobnym poziomie co **MPA** i **MMF**, jednak nie przewyższając ich, ani związku referencyjnego — gemcytabiny. Dodatkowo, pochodna **P1** (wraz z **P7**, **MP5** oraz **MP1**) została wyróżniona dzięki wysokiej wartości współczynnika selektywności SI, który sugeruje możliwość obrania obiecującego kierunku badań nad poprawieniem właściwości terapeutycznych. Ponadto, test GMP przeprowadzony dla wybranych koniugatów estrowych wykazał, iż zachowują one inhibicję IMPDH podobnie do **MPA** i **MMF**.

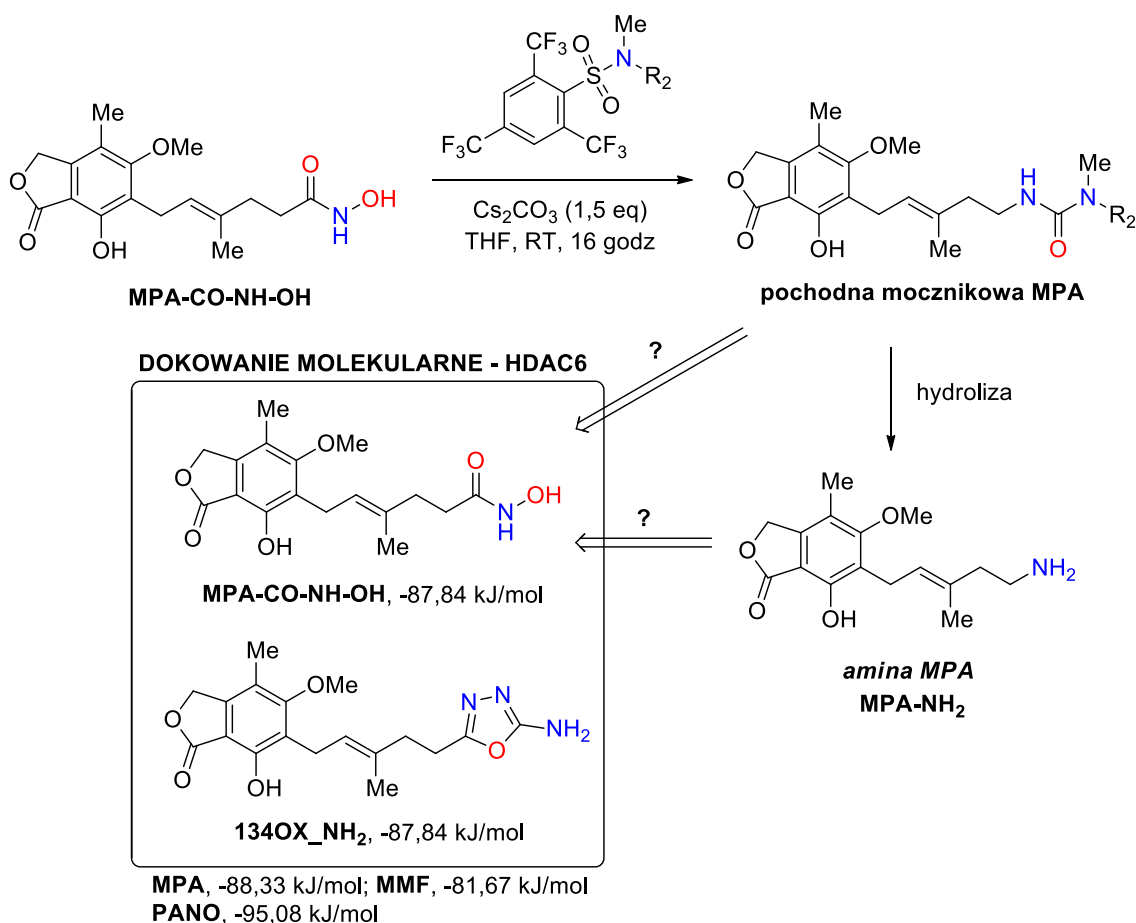
W ogólnym ujęciu da się zauważyć, iż wbudowanie struktury fenolu pochodzenia naturalnego w rdzeń **MPA** ma wpływ na właściwości przeciwutleniające, co wykazano testem DPPH. Najbardziej obiecujące przeciwutleniacze okazały się mieć właściwości cytotoksyczne na podobnym poziomie co **MPA** i **MMF** w warunkach linii komórkowej AsPC-1. Wysoka wartość współczynnika SI dla **P1** i **P7** nie jest jednak zbieżna z wynikami osiągniętymi dla tych związków w teście DPPH, co wskazuje na ich aktywność przede wszystkim immunosupresyjną, podobną do **MPA**, a w mniejszym stopniu przeciwutleniającą.

Niniejsze badanie należy traktować jako wstęp do analizy aktywności przeciwutleniającej i konieczne jest poszerzenie niniejszej koncepcji o inne testy przeciwutleniające (np. ABTS, ORAC, FRAP), enzymatyczne (np. GP_x, SOD), a także inne komórki nowotworowe (PANC-1, HCT-116, A549) i inne zdrowe komórki, aby przybliżyć się do zrozumienia mechanizmu działania, a także nakreślić w jakim stopniu właściwości antyoksydacyjne wpływają na bazową aktywność immunosupresyjną pochodnych **MPA**.

Ostatnią klasą analizowanych cząsteczek były pochodne bioizosteryczne. Obecne w nich ugrupowania bioizosteryczne zawierające atom tlenu i azotu, zostały wyłonione na drodze

przeglądu literatury (istotna zbieżność strukturalna z typowymi inhibitorami HDACs) oraz w wyniku badań nad związkiem **A2**, w ramach grupy amidów **MPA (A1-A18)**. Badania komputerowe dostarczyły potwierdzenia, iż enzym HDAC6 oraz IMPDH2 są ich istotnymi celami molekularnymi, i że związki te mają pewien potencjał w hamowaniu ich aktywności. Dodatkowo, predykcja właściwości fizykochemicznych nie wskazała na istotne problemy z rozpuszczalnością, które były szczególnie widoczne w przypadku klasy pochodnych amidowych. W efekcie, związki te postanowiłem otrzymać z wykorzystaniem protokołów dehydratacji, zachodzących pomiędzy kwasem mykofenolowym, a odpowiednim ekwiwalentem atomu tlenu i azotu (hydrazyd, amidoksym, hydroksyloamina, hydrazyna, amoniak). Po ustaleniu struktury oraz czystości związków, zostały one przebadane na szeregu linii komórek nowotworowych, gdzie o ile ich rozpuszczalność faktycznie nie była czynnikiem limitującym, aktywność związków wobec **MPA** nie była zadowalająca. Najbardziej obiecujące wyniki otrzymano dla pochodnych niecyklicznych, a szczególnie dla znanego wcześniej **MPA-CO-NH-OH**, a także dla niektórych cyklicznych — **134OX_3-Py** i **124OX_Fur**. Na podstawie wykonanych do tej pory badań stwierdzam, że zastąpienie grupy karboksylowej **MPA** cyklicznym układem bioizosterycznym nie pozwoliło wyróżnić aktywniejszych związków antyproliferacyjnych. Dopelnieniem podjętych badań nad bioizosterycznymi pochodnymi cyklicznymi jest: test enzymatyczny HDAC6, a także badanie aktywności antyproliferacyjnej wobec komórek PBMC i T-Jurkat, jako przyjętego w pracy modelu immunosupresyjnego. W chwili składania niniejszej pracy doktorskiej badania te są jeszcze wykonywane.

Uzyskane dotychczas wyniki sugerują, iż rdzeń kwasu mykofenolowego jest konieczny do zachowania aktywności antyproliferacyjnej wobec linii komórek nowotworowych. Podstawienie bioizosteryczne prowadzące do otrzymania pochodnej cyklicznej, z której uwolnienie cząsteczki **MPA** jest trudne na drodze hydrolizy, uniemożliwia wykazywanie przez ten układ istotnej bioaktywności.



Rysunek 63. Transformacja kwasu hydroksamowego **MPA** w odpowiednik mocznikowy na drodze przegrupowania Lossena oraz wskazanie istotności dokowania molekularnego dla nowej klasy cząsteczek

Biorąc pod uwagę fakt, iż na bazie aktualnego stanu wiedzy, niecykliczne pochodne bioizosteryczne **MPA** są bardziej obiecujące pod względem aktywności biologicznej, aniżeli ich odpowiedniki cykliczne, wynika stąd potencjalna koncepcja badawcza opiera się na pochodnych mocznikowych **MPA** (Rysunek 63). Ich otrzymanie jest możliwe z wykorzystaniem prostej transformacji grupy hydroksamowej, która w przegrupowaniu Lossena ulega konwersji do odpowiedniej pochodnej mocznikowej. Taka przemiana opisywana była dla samej cząsteczki **MPA-CO-NH-OH** [241]. Uzyskane **pochodne mocznikowe MPA** zawierają na końcu łańcucha bocznego polarne ugrupowanie, mogące oddziaływać zarówno z IMPDH, jak i jonami cynku. Tę aktywność należałoby jednak zweryfikować metodami *in silico* oraz *in vitro*, a w środowisku komórek zależałaby ona od podatności na hydrolizę moczników do **aminy MPA**.

Reasumując, w niniejszej pracy doktorskiej udało mi się pozytywnie zweryfikować szereg hipotez badawczych i pytań roboczych postawionych w sekcji Cele badawcze. Otrzymane związki, choć w większości wypadków nie są bardziej aktywne niż wzorcowy **MPA**, mają pewien potencjał aplikacyjny, ze względu na obniżoną cytotoksyczność wobec zdrowych komórek, istotnie podniesioną wartość współczynników selektywności oraz dodatkowe bioaktywności, mogące wnieść pozytywne efekty do projektowanych analogów **MPA**. Udało mi się otrzymać 49 nowych, docelowych związków oraz przeanalizować je z wykorzystaniem badań *in vitro*, co



uważam za istotny wkład w rozwój tematyki opartej na strukturze **MPA**. Dodatkowo, pomimo nie do końca udanego podstawienia bioizosterycznego (z punktu widzenia badań przesiewowych), któremu ulega grupa karboksylowa **MPA**, w rdzenie oksadiazolowe, uważam, że przemiana tej cząsteczki wnosi pewną wartość dodaną do dyskusji nad transformacjami naturalnie występujących związków wielofunkcyjnych. Niewątpliwą zaletą wszystkich reakcji jest ich jednoetapowy przebieg, choć oczywiście istotnie upraszcza to część chemiczną w niniejszej dyskusji. Niemniej jednak, dodatkowe prace syntetyczne podjęte w poszczególnych tematach powinny być stosownie podnieść poziom ich skomplikowania. Ponadto, cząsteczki te docelowo mają być lekami/prolekami, dlatego prostota ich uzyskiwania powinna być rozpatrywana jedynie jako pozytywny aspekt tej pracy.

6.5.2. Dotychczasowe osiągnięcia naukowe

6.5.2.1. Publikacje

1. **Walczak J.**, Iwaszkiewicz-Grześ D., Ziolkowska M., Śliwka-Kaszyńska M., Daśko M., Trzonkowski P., Cholewiński G. Novel amides of mycophenolic acid and some heterocyclic derivatives as immunosuppressive agents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. **2022**, 37, 2725-41.

DOI: 10.1080/14756366.2022.2127701

IF: 5.6 (Most Wiedzy)

Punkty MEiN: 140 (2024 r.)

2. **Walczak J.**, Iwaszkiewicz-Grześ D., Cholewiński G. Approaches Towards Better Immunosuppressive Agents. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. **2024**, 24, 1230-1263.

DOI: 10.2174/0115680266292661240322072908

IF: 2.9 (Most Wiedzy)

Punkty MEiN: 100 (2024 r.)

6.5.2.2. Publikacje spoza tematyki pracy doktorskiej

1. Doroszuk J., Musiejuk M., Jędrzejewski B., **Walczak J.**, Witt D. Convenient and Efficient Synthesis of Functionalized 2-Sulfonylindoles. *Materials*. **2020**, 13, 4492.

DOI: 10.3390/ma13204492

IF: 5.8 (Most Wiedzy)

Punkty MEiN: 140 (2024 r.)

-
2. Pobłocki K., Jacewicz D., **Walczak J.**, Gawdzik B., Kramkowski K., Drzeżdżon J., Kowalczyk P. Preparation of Allyl Alcohol Oligomers Using Dipicolinate Oxovanadium(IV) Coordination Compound. *Materials*. **2022**, 15, 695.

DOI: 10.3390/ma15030695

IF: 5.8 (Most Wiedzy)

Punkty MEiN: 140 (2024 r.)

3. Pobłocki K., **Walczak J.**, Drzeżdżon J., Jacewicz D. Katalizatory wykorzystywane w syntezie biodiesla. *Wiadomości Chemiczne*. **2022**, 129-44.

DOI: 10.53584/wiadchem.2022.3.2

IF: —

Punkty MEiN: 20 (2024 r.)

4. Pobłocki K., Pawlak M., **Walczak J.**, Drzeżdżon J., Jacewicz D. Właściwości katalityczne i biomedyczne związków zawierających jony rutenu(II) oraz rutenu(III). *Wiadomości Chemiczne*. **2023**, 569-95.

DOI: 10.53584/wiadchem.2023.05.8

IF: —

Punkty MEiN: 20 (2024 r.)

6.5.2.3. Planowana aktywność publikacyjna związana z pracą doktorską

1. Publikacja związana z estrowymi pochodnymi **MPA** jest obecnie na etapie recenzji w czasopiśmie *Scientific Reports*. Niniejsza publikacja uzyskała już wcześniej stosowną wersję przeddrukową (ang. *preprint*): **Walczak J.**, Iwaszkiewicz-Grześ D., Śliwka-Kaszyńska M., Kurdyn A., Augustin E., Viapiana A., Plenis A., Cholewiński G. Direct synthesis of mycophenolic acid aryl esters with antioxidant and antiproliferative properties. SSRN Preprints. **2024**. <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4975663> (dost. dn. 12.12.2024 r.).
2. Planuję opublikowanie pracy związanej z bioizosterycznymi pochodnymi **MPA** w czasopiśmie z zakresu chemii medycznej (np. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, *Europeach Journal of Medicinal Chemistry*). Będzie to możliwe po uprzednim uzyskaniu wyników testu enzymatycznego HDAC6 oraz badań biologicznych na liniach komórek PBMCs i T-Jurkat. Ze względu na objętość pracy, rozważane jest także rozdzielenie jej na dwie części. Oba warianty opierać się będą o współpracę międzynarodową.

6.5.2.4. Zaangażowanie w projekty

1. Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (NCBiR), Woltamperometryczne wykrywanie nitrowych związków wybuchowych za pomocą hybrydowych czujników diamentowo-grafenowych: monitoring terenowy zanieczyszczeń w regionie Morza Bałtyckiego (NITROsens), dr inż. Anna Danuta Dettlaff, Fundusze norweskie i EOG — Program Badania Stosowane, Międzynarodowy Program Badawczy, Projekt zagraniczny/międzynarodowy, nr porozumienia: NOR/SGS/NITROsens/0011/2020-00, okres realizacji projektu: 01/09/2021 — 11/09/2024; byłem zatrudniony w tym projekcie na stanowisku doktorant w okresach: 13/07/22-28/02/23 i 01/04/23-30/09/23.

6.5.2.5. Udział w stażach naukowych

1. Narodowa Agencja Wymiany Akademickiej (NAWA), STERowanie w kierunku Umiedzynarodowienia Szkoły Doktorskiej, numer umowy: 13/STER/2023; okres: 20/09/23-19/12/23; strona przyjmująca: Laboratory of Organic Material Synthesis, Polymer Chemistry and Materials, Department of Chemistry, KU Leuven (Belgia); naukowiec przyjmujący: prof. Mario Smet (<https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=7006012259>).

6.5.2.6. Udział w konferencjach

1. **J. Walczak**, M. Daśko, G. Cholewiński; Heterocykliczne pochodne amidowe kwasu mykofenolowego XIV Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie; 20-23/09/2021, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Toruń, Polska; prezentacja posteru.
2. **J. Walczak**, D. Iwaszkiewicz-Grześ, M. Śliwka-Kaszyńska, M. Daśko, P. Trzonkowski, G. Cholewiński; Nowe amidowe pochodne kwasu mykofenolowego i niektórych układów heterocyklicznych jako środki immunosupresyjne; 64. Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego w Lublinie; 11-16/09/2022, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin, Polska; prezentacja posteru.
3. **J. Walczak**, D. Iwaszkiewicz-Grześ, M. Śliwka-Kaszyńska, M. Daśko, P. Trzonkowski, G. Cholewiński; Synthesis of *N*-heterocyclic Amides of Mycophenolic Acid as Prospective Immunosuppressants; 19th Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry; 09-11/03/2023, Uniwersytet Patraski, Patras, Grecja; prezentacja posteru.
4. **I. Kaczmarzyk**, **J. Walczak**, M. Sobaszek, M. Szopińska, A. Dettlaff; Electrochemical Sensing of 2,4-Dinitrotoluene on Boron-Doped Carbon Nanowall Electrodes in Seawater; 243rd ECS Meeting; 28/05-02/06/2023, The Electrochemical Society (ECS), Boston, USA; prezentacja posteru.

6.5.2.7. Działalność i osiągnięcia dodatkowe

1. Aktywność z ramienia Naukowego Koła Chemików Studentów Politechniki Gdańskiej (NKCh SPG) w projekcie: Wygodna i wszechstronna metoda otrzymywania biokoniugatów poprzez tworzenie funkcjonalizowanych niesymetrycznych disulfidów

w roztworze wodnym (OPUS 2013/09/B/ST5/01261); opiekun: prof. Dariusz Witt (rok akademicki 2015/2016).

2. Aktywność z ramienia NKCh SPG w projekcie: Synteza niesymetrycznych disulfanów typu winylowego oraz tiofosforylowanych indoli w pozycji drugiej (OPUS 2015/19/B/ST5/03359); opiekun: prof. Dariusz Witt (rok akademicki 2016/2017).
3. Aktywność z ramienia NKCh SPG we własnym projekcie popularyzującym naukę: Perfumy; opiekun: dr Sebastian Demkowicz (rok akademicki 2016/2017).
4. Dwukrotny laureat Stypendium rektora dla najlepszych studentów na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej (rok akademicki 2016/2017, 2017/2018).
5. Aktywność z ramienia NKCh SPG w projekcie popularyzującym naukę wśród licealistów: Chemia bez granic; opiekun: dr Marek Lieder, dr Wojciech Chrzanowski, dr Agnieszka Pładzyk (rok akademicki 2015/2016, 2016/2017, 2017/2018, 2018/2019).
6. Walczak J.; Podandy — synteza i zastosowanie; II Interdyscyplinarna Akademicka Konferencja Ochrony Środowiska (IAKOŚ); 17-20/03/2017; Politechnika Gdańska, Gdańsk, Polska; prezentacja posteru popularnonaukowego.
7. Walczak J.; Losy środowiskowe farmaceutyków w ekosystemach wodnych i sposoby ich utylizacji; III Interdyscyplinarna Akademicka Konferencja Ochrony Środowiska (IAKOŚ); 13-15/04/2018; Politechnika Gdańska, Gdańsk, Polska; prezentacja posteru popularnonaukowego.
8. Aktywność z ramienia NKCh SPG w projekcie popularyzującym naukę: organizacja stoiska „Nasza chemia” w czasie pikniku naukowego „Bioróżnorodność — poznaj by zachować”; opiekun: dr Marek Lieder; organizator: Pomorski Zespół Parków Krajobrazowych, Centrum Informacji i Edukacji Ekologicznej; 19/05/2018, Park Reagana, Gdańsk, Polska.
9. Opieka naukowa nad studentem Alanem Bieleckim (prezentacja technik stosowanych w syntezie organicznej); 04-08/2022.
10. Pokazy doświadczeń chemicznych z zakresu ekstrakcji olejków eterycznych w czasie Bałtyckiego Festiwalu Nauki; 26/05/2023, 24/04/2024.
11. Prezentacja pokazów doświadczeń chemicznych: 09/09/2016 (V Forum Młodych Chemików), 26/01/2024 (młodzież licealna z Brodnicy).
12. Premia za publikacje naukowe i patenty na Politechnice Gdańskiej w roku 2020 i roku 2022.
13. Dwukrotny stypendysta programu *Francium Supporting Outstanding Doctoral Candidates* (rok akademicki 2022/2023, 2023/2024).

7. Część eksperymentalna

7.1. Amidowe pochodne MPA

7.1.1. Dokowanie molekularne

Przygotowanie ligandów

Przed przeprowadzeniem dokowania molekularnego, potencjalne inhibitory przygotowano z wykorzystaniem programu Portable HyperChem 8.0.7 Release (Hypercube Inc., Gainesville, FL) [242]. Każdy ligand zoptymalizowano przy użyciu pola siłowego MM+ [243] i algorytmu gradientu sprzężonego Polaka-Ribiere'a (terminującego przy gradiencie równym 0,05 kcal·mol⁻¹·Å⁻¹).

Przygotowanie białka

Struktury krystaliczne enzymu IMPDH2, użyte do badań modelowania molekularnego, pobrano z bazy danych Protein Data Bank (kod PDB białka: 1JR1). Analizę dokowania przeprowadzono po standardowych procedurach przygotowania, obejmujących: usunięcie łańcucha B początkowej struktury, usunięcie struktury kokryształizowanego **MPA** i cząsteczek wody oraz uzupełnienie atomów wodoru i ładunków Gasteigera.

Dokowanie molekularne

Dokowanie zoptymalizowanych ligandów do przygotowanej struktury enzymu IMPDH2 przeprowadzono za pomocą oprogramowania Autodock Vina w wersji 1.1.2 (The Molecular Graphic Laboratory, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA) [244]. We wszystkich badaniach, przestrzeń symulacyjna był wycelowana na atomie węgla β jednostki Ser276, a rozmiar pudła wynosił 25 Å x 25 Å x 25 Å. Następnie, sprawdzane było najlepsze dopasowanie ligandów do centrum aktywnego enzymu. Ilustracje modelu 3D wygenerowano przy użyciu programu VMD w wersji 1.9 (University of Illinois at Urbana – Champaign, Urbana, IL) [245].

7.1.2. Synteza

Informacje ogólne

MPA i aminy użyte do syntezy A1-A18, a także: *N,N*-diizopropylomocetaminę (DIPEA), monohydrat 1-hydroksybenzotriazolu (HOBt·H₂O), tetrafluoroboran 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametylouroniowy (TBTU), 50% roztwór bezwodnika kwasu propanofosfonowego w DMF (T3P) i pirydynę (Py) zakupiono od następujących dostawców: Sigma Aldrich, Apollo Scientific, AmBeed, Maybridge, Acros, Angene, Chemat, Alfa Aesar, i użyto w stanie niezmiennym. Acetonitryl (MeCN), octan etylu (AcOEt), *N,N*-dimetyloformamid (DMF), 1,4-dioksan (1,4-D) i pirydynę (Py) oczyszczono i osuszano zgodnie ze standardowymi procedurami.

Temperaturę topnienia zmierzono wykorzystując kriometr Stuart SMP30. Widma ¹H i ¹³C NMR zostały zarejestrowane na spektrometrze Varian Unity Inova 500 w częstotliwości 500 MHz

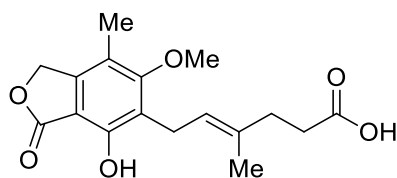
dla widm protonowych i 126 MHz dla widm węglowych. Wartości przesunięć chemicznych (δ) zostały podane w częściach na milion (ppm) w odniesieniu do tetrametylosilanu (TMS), z zastosowaniem pików rozpuszczalników szczytkowych jako wzorca wewnętrznego (DMSO- d_6 : 2,50 ppm dla ^1H NMR i 39,52 ppm dla ^{13}C NMR). Stałe sprzężenia (J) dane są w hercach (Hz). Można zaobserwować piki resztkowego rozpuszczalnika, zwłaszcza acetonitrylu, dichlorometanu, *N,N*-dimetyloformamidu, octanu etylu, toluenu i wody, i pojawiają się one w typowych wartościach przesunięć chemicznych. Przyporządkowanie poszczególnych pików na widmach NMR zostało opracowane na podstawie pików charakterystycznych, przynależących do struktury **MPA**. Numeracja poszczególnych atomów w opisie skróconym widm jest zgodna z zaleceniami IUPAC dla związków heteroaromatycznych.

Analizy chromatografii cienkowarstwowej (TLC) prowadzono z wykorzystaniem płytek Supelco (silikażel osadzony na arkuszu aluminiowym), które zawierają wskaźnik fluorescencyjny o maksimum absorpcji 254 nm, zaś chromatografię kolumnową z wykorzystaniem żelu krzemionkowego o średnicy 40-63 μm (230-450 Mesh, Alfa Aesar). Chromatogram wywołano poprzez ekspozycję na światło UV (254 nm) i zaznaczenie ołówkiem lub barwienie jodem.

Analizę czystości związków metodą HPLC przeprowadzono przy użyciu chromatografu Agilent liquid chromatograph series 1290 (Agilent Technology, Waldbronn, Niemcy) składającego się z: pompy G4220A, autosamplera G4226A, termostатовanej kolumny G1316C i detektora diodowego G1315C. Układ chromatograficzny był sterowany przez oprogramowanie Agilent MassHunter B 06.01. Próbki, w ilości 2 μL każda, wprowadzono na termostatowaną w 40°C kolumnę Poroshell EC-C18 2.7 μm (3,0 mm $\times$ 150 mm). Natężenie przepływu fazy ruchomej ustawione było na 0,4 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, a elucja przebiegała w gradiencie, gdzie rozpuszczalnik A (0,1% (v/v) kwasu mrówkowego w wodzie) i rozpuszczalnik B (acetonitryl:metanol, 1:1, v/v) były zmieszane w zakresie od 50% B do 100% B w czasie 25 min. Sygnał eluatu rejestrowany był przy długości fali równej 254 nm.

Dokładna masa molowa testowanych amidów oraz **MPA** została potwierdzona dzięki technice HRMS z wykorzystaniem jonizacji elektrosprejem (ESI) sprzężonej z kwadrupolowym analizatorem czasu przelotu (ESI(-)-QTOF) w spektrometrze mas Agilent QTOF G6540 (Santa Clara, CA, USA) sprzężonym z systemem Agilent 1290 LC, działającym w trybie skanowania ujemnej jonizacji.

Dane eksperymentalne zebrane dla MPA



Temperatura topnienia [$^{\circ}\text{C}$]: 143-145

^1H NMR: δ_{H} (DMSO- d_6): 12,01 (s, 1H, -COOH), 9,40 (s, 1H, Ar-OH), 5,24 (s, 2H, Ar-CH₂O-), 5,13 (t, J = 6,9 Hz, 1H, >C=CH-), 3,69 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,29 (d, J = 6,8 Hz, 3H, Ar-CH₂-), 2,26 (t, J = 7,4 Hz, 2H, -CH₂-), 2,16 (t, J = 7,5 Hz, 2H, -CH₂-), 2,08 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,74 (s, 3H, -CH₃)

¹³C NMR: δ_C (DMSO-*d*₆): 174,52 (-COOH), 170,58 (-COO-), 163,01 (C_{Ar}-OMe), 153,16 (C_{Ar}-OH), 146,27 (C_{Ar}-CH₂O-), 134,04 (>C=C(-CH₃)-), 123,13 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 122,85 (>C=C(-CH₃)-), 116,40 (C_{Ar}-CH₃), 107,41 (C_{Ar}-COO-), 69,06 (Ar-CH₂O-), 61,08 (Ar-OCH₃), 34,57 (-CH₂-COOH), 32,91 (-CH₂-CH₂-), 22,87 (Ar-CH₂-), 16,46 (=C(-CH₃)-), 11,51 (Ar-CH₃)

HRMS (m/z) obliczone dla C₁₇H₂₀O₆ [M-H]⁻: 319,1182, zmierzone: 319,1346

Czystość: 100,00%; R_{T,HPLC} = 7,259 min

Metoda A — synteza pochodnych MPA z wykorzystaniem amin heteroaromatycznych

Do wysuszonej w płomieniu palnika i przedmuchanej strumieniem argonu kolby okrągłodennej wprowadzono 50 mg **MPA** (0,156 mmol, 1,0 eq) oraz 27 mg 97% 2-aminobenzo[d]tiazolu (0,172 mmol, 1,1 eq). Następnie, związki te rozpuszczono w 1,5 mL suchego acetonitrylu i 0,05 mL suchego DMF. Po dodaniu rozpuszczalnika, kolbę wypełniono warstwą neutralnego gazu ochronnego (najlepiej argonu) i układ schłodzono do 0°C z wykorzystaniem łaźni lodowej. W dalszej kolejności, przy pomocy strzykawki, wkroplono 55 μ L DIPEA (*d* = 0,742 g/mL, 40,3 mg, 0,312 mmol, 2,0 eq), i w jednej porcji dodano 24 mg HOBt·H₂O (0,156 mmol, 1,0 eq) i 51 mg TBTU (0,156 mmol, 1,0 eq). Mieszaninę reakcyjną mieszano na mieszadle magnetycznym przez co najmniej 48 godzin (najlepiej 72 godziny), w międzyczasie pozwoliwszy jej osiągnąć temperaturę pokojową. Po tym czasie do układu wprowadzono 0,4 mL metanolu, zawiesinę dobrze wymieszano i odsączono na lejku Hirscha. Biały osad został dokładnie wypłukany zimnymi rozpuszczalnikami, kolejno: acetonitrylem (około 2 mL), metanolem (około 1 mL), dichlorometanem (około 1 mL), i dobrze wysuszono z wykorzystaniem pompki wodnej. Uzyskany osad powzięto do badań biologicznych bez zastosowania dodatkowych technik oczyszczania a przesącz odrzucono. **A1** otrzymano jako osad w kolorze złamanej bieli z 77% wydajnością (54 mg).

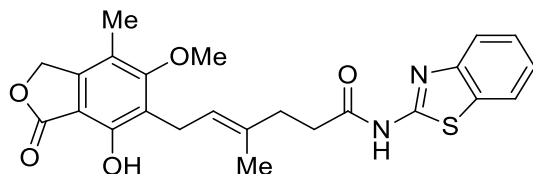
Metoda B — synteza pochodnych MPA z wykorzystaniem amin alifatycznych lub aromatycznych

Do wysuszonej w płomieniu palnika i przedmuchanej strumieniem argonu kolby okrągłodennej wprowadzono 125 mg **MPA** (0,390 mmol, 1,0 eq) i 65 mg 97% 6-aminobenzo[d]tiazolu (0,429 mmol, 1,1 eq). Substancje te następnie rozpuszczono w 2-3 mL suchego octanu etylu, a układ schłodzono do 0°C z wykorzystaniem łaźni lodowej. Po dodaniu rozpuszczalnika, kolbę wypełniono ponownie gazem obojętnym (najlepiej argonem). W tych warunkach, wkroplono 63 μ L suchej pirydyny (*d* = 0,982 g/mL, 61,7 mg, 0,780 mmol, 2,0 eq) przy pomocy strzykawki. Następnie, przez 30 min dodawano 342 μ L 50% roztworu T3P w DMF (*d* = 1,09 g/mL, 186,2 mg, 0,585 mmol, 1,5 eq). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez co najmniej 48 godzin (najlepiej 72 godziny) w temperaturze pokojowej, w międzyczasie pozwoliwszy na ogrzanie kolby. Po tym czasie, układ rozcieńczono 5 mL świeżego octanu etylu, a pozyskaną warstwę organiczną ekstrahowano: 1 M kwasem solnym, nasyconym roztworem węglańu sodu i nasyconą solanką. Fazę organiczną wysuszono z wykorzystaniem bezwodnego siarczanu magnezu, zawiesinę odsączono, a przesącz zatężono z wykorzystaniem rotacyjnej wyparki próżniowej. Uzyskaną mieszaninę oczyszczano na kolumnie chromatograficznej w układzie

rozpuszczalników: toluen:octan etylu ($R_F = 0,13$, 2:1, v/v). **A4** uzyskano jako puszysty osad w kolorze écru z 55% wydajnością (97 mg).

Zestawienie właściwości otrzymanych pochodnych amidowych (A1-A18)

N-(benzo[d]tiazol-2-yl) mykofenolamid (**A1**)



Metoda syntezy: A; 2,0 eq DIPEA

Wydajność: 77%

Wygląd: proszek w kolorze złamanej bieli

Temperatura topnienia [°C]: 205-210

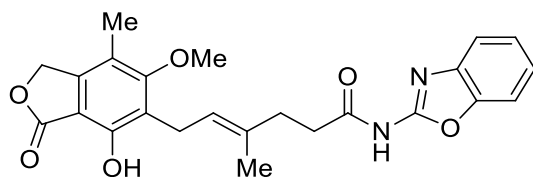
^1H NMR: δ_H (DMSO- d_6): 12,23 (s, 1H, -NH-), 9,35 (s, 1H, Ar-OH), 7,94 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, CH_{HetAr}), 7,71 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, CH_{HetAr}), 7,43 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H, CH_{HetAr}), 7,30 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H, CH_{HetAr}), 5,18 (t, $J = 6,4$ Hz, 1H, $>\text{C}=\text{CH}-$), 5,04 (s, 2H, Ar- $\text{CH}_2\text{O}-$), 3,65 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,28 (d, $J = 6,7$ Hz, 2H, Ar- CH_2-), 2,56 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H, -CH₂-), 2,29 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H, -CH₂-), 1,96 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,78 (s, 3H, -CH₃)

^{13}C NMR: δ_C (DMSO- d_6): 172,19 (-CONH-), 170,56 (-COO-), 162,83 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-OMe}$), 158,25 ($\text{C}(2)_{\text{HetAr}}$), 153,06 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-OH}$), 148,91 ($\text{C}(3a)_{\text{HetAr}}$), 146,08 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-CH}_2\text{O}-$), 133,62 ($>\text{C}=\text{C}(-\text{CH}_3)-$), 131,87 ($\text{C}(7a)_{\text{HetAr}}$), 126,45 ($\text{C}(5)_{\text{HetAr}}$), 123,83 ($\text{C}(6)_{\text{HetAr}}$), 123,64 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-CH}_2\text{-CH=}$), 122,65 ($>\text{C}=\text{C}(-\text{CH}_3)-$), 122,02 ($\text{C}(7)_{\text{HetAr}}$), 120,85 ($\text{C}(4)_{\text{HetAr}}$), 116,23 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-CH}_3$), 107,26 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-COO}-$), 68,88 (Ar- $\text{CH}_2\text{O}-$), 60,97 (Ar-OCH₃), 34,64 (-CH₂-CONH-), 34,33 (-CH₂-CH₂-), 22,88 (Ar-CH₂-), 16,50 (=C(-CH₃)-), 11,40 (Ar-CH₃)

HRMS (m/z) obliczone dla $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ [$\text{M}-\text{H}$]⁻: 451,1328, zmierzone: 451,1572

Czystość: 98,95%; $R_{T,\text{HPLC}} = 12,253$ min

N-(benzo[d]oksazol-2-yl) mykofenolamid (**A2**)



Metoda syntezy: A; 1,0 eq DIPEA

Wydajność: 72%

Wygląd: biały proszek

Temperatura topnienia [°C]: 175-177

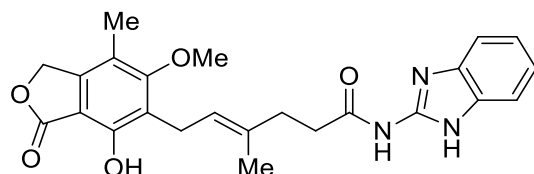
^1H NMR: δ_H (DMSO- d_6): 11,57 (bs, 1H, -NH-), 9,40 (bs, 1H, Ar-OH), 7,64 – 7,49 (m, 2H, CH_{HetAr}), 7,28 (m, 2H, CH_{HetAr}), 5,22 – 5,13 (m, 3H, $>\text{C}=\text{CH}-$ i Ar- $\text{CH}_2\text{O}-$), 3,67 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,30 (d, $J = 6,8$ Hz, 2H, Ar- CH_2-), 2,58 (m, 2H, -CH₂-), 2,27 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H, -CH₂-), 2,02 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,78 (s, 3H, -CH₃)

¹³C NMR: δ_C (DMSO-*d*₆): 170,56 (-COO-), 162,95 (C_{Ar}-OMe), 155,49 (C(2)_{HetAr}), 153,12 (C_{Ar}-OH), 147,96 (C(7a)_{HetAr}), 146,20 (C_{Ar}-CH₂O-), 141,10 (C(3a)_{HetAr}), 133,84 (>C=C(-CH₃)-), 124,92 (C(6)_{HetAr}), 123,86 (C(5)_{HetAr}), 123,48 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 122,77 (>C=C(-CH₃)-), 118,55 (C(4)_{HetAr}), 116,33 (C_{Ar}-CH₃), 110,38 (C(7)_{HetAr}), 107,36 (C_{Ar}-COO-), 68,99 (Ar-CH₂O-), 61,03 (Ar-OCH₃), 35,08 (-CH₂-CONH-), 34,50 (-CH₂-CH₂-), 22,89 (Ar-CH₂-), 16,57 (=C(-CH₃)-), 11,45 (Ar-CH₃)

HRMS (m/z) obliczone dla C₂₄H₂₄N₂O₆ [M-H]⁻: 435,1556, zmierzone: 435,1793

Czystość: 98,96%; R_{T,HPLC} = 9,474 min

N-(1*H*-benzo[d]imidazol-2-yl) mykofenolamid (**A3**)



Metoda syntezy: A; 1,5 eq DIPEA, 1,5 eq TBTU, bez HOBt·H₂O, dodatkowe płukanie lodowatym DMF

Wydajność: 43%

Wygląd: puszysty biały osad

Temperatura topnienia [°C]: 253-255 (z rozkładem)

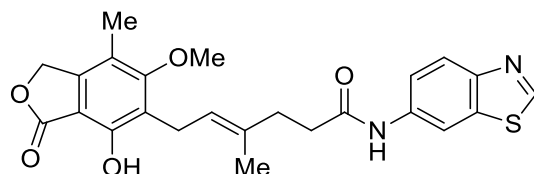
¹H NMR: δ_H (DMSO-*d*₆): 11,90 (bs, 1H, -NH-), 11,39 (bs, 1H, NH_{HetAr}), 9,44 (bs, 1H, Ar-OH), 7,45 – 7,36 (m, 2H, CH_{HetAr}), 7,06 (dd, *J* = 5,8, 3,1 Hz, 2H, CH_{HetAr}), 5,19 (t, *J* = 6,6 Hz, 1H, >C=CH-), 5,12 (s, 2H, Ar-CH₂-), 3,63 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,29 (d, *J* = 6,8 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 2,52 (d, *J* = 6,5 Hz, 2H, -CH₂-), 2,30 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H, -CH₂-), 1,97 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,79 (s, 3H, -CH₃)

¹³C NMR: δ_C (DMSO-*d*₆): 183,06 (C(2)_{HetAr}), 172,40 (-CONH-), 170,60 (-COO-), 162,87 (C_{Ar}-OMe), 153,06 (C_{Ar}-OH), 146,98 (C_{HetAr}), 146,16 (C_{Ar}-CH₂O-), 133,79 (>C=C(-CH₃)-), 123,62 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 122,71 (>C=C(-CH₃)-), 121,29 (C_{HetAr}), 116,29 (C_{Ar}-CH₃), 107,33 (C_{Ar}-COO-), 68,96 (Ar-CH₂O-), 60,97 (Ar-OCH₃), 34,86 (-CH₂-CONH-), 34,56 (-CH₂-CH₂-), 22,88 (Ar-CH₂-), 16,48 (=C(-CH₃)-), 11,40 (Ar-CH₃)

HRMS (m/z) obliczone dla C₂₄H₂₅N₃O₅ [M-H]⁻: 434,1716, zmierzone: 434,1953

Czystość: 99,50%; R_{T,HPLC} = 5,617 min

N-(benzo[d]tiazol-6-yl) mykofenolamid (**A4**)



Metoda syntezy: B; eluent: toluen:octan etylu

Wydajność: 55%

Wygląd: puszysty osad w kolorze écru

R_F = 0,13 (toluen:octan etylu 2:1, v/v)

Temperatura topnienia [°C]: 175-177

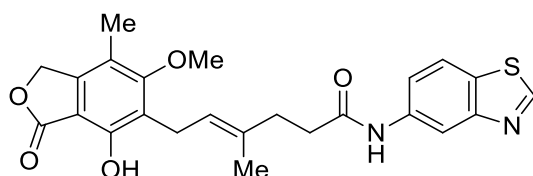
¹H NMR: δ_H (DMSO-*d*₆): 10,11 (s, 1H, -NH-), 9,42 (bs, 1H, C(2)H_{HetAr}), 9,25 (s, 1H, Ar-OH), 8,47 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H, C(7)H_{HetAr}), 7,95 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, CH_{HetAr}), 7,48 (dd, *J* = 8,8, 1,9 Hz, 1H, CH_{HetAr}), 5,23 – 5,15 (m, 3H, >C=CH- i Ar-CH₂O-), 3,64 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,30 (d, *J* = 6,8 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 2,41 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H, -CH₂-), 2,28 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H, -CH₂-), 2,00 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,79 (s, 3H, -CH₃)

¹³C NMR: δ_C (DMSO-*d*₆): 171,46 (-CONH-), 170,58 (-COO-), 162,89 (C_{Ar}-OMe), 154,92 (C(2)_{HetAr}), 153,14 (C_{Ar}-OH), 149,31 (C(3a)_{HetAr}), 146,13 (C_{Ar}-CH₂O-), 137,42 (C(6)_{HetAr}), 134,58 (>C=C(-CH₃)-), 134,11 (C(7a)_{HetAr}), 123,27 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 123,24 (C(4)_{HetAr}), 122,81 (>C=C(-CH₃)-), 118,97 (C(5)_{HetAr}), 116,30 (C_{Ar}-CH₃), 111,70 (C(7)_{HetAr}), 107,34 (C_{Ar}-COO-), 69,00 (Ar-CH₂O-), 60,99 (Ar-OCH₃), 35,66 (-CH₂-CONH-), 35,21 (-CH₂-CH₂-), 22,91 (Ar-CH₂-), 16,64 (=C(-CH₃)-), 11,43 (Ar-CH₃)

HRMS (*m/z*) obliczone dla C₂₄H₂₄N₂O₅S [M-H]⁻: 451,1328, zmierzone: 451,1572

Czystość: purity 100,00%; R_{T,HPLC} = 8,638 min

N-(benzo[d]tiazol-5-ylo) mykofenolamid (**A5**)



Metoda syntezy: B; eluent: toluen:octan etylu

Wydajność: 67%

Wygląd: puszysty biały osad

R_F = 0,18 (toluen:octan etylu, 2:1, v/v)

Temperatura topnienia [°C]: 114-117

¹H NMR: δ_H (DMSO-*d*₆): 10,08 (s, 1H, -NH-), 9,26 (m, 2H, Ar-OH i C(2)H_{HetAr}), 8,38 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H, CH_{HetAr}), 8,01 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H, CH_{HetAr}), 7,50 (dd, *J* = 8,7, 1,9 Hz, 1H, CH_{HetAr}), 5,22 – 5,16 (m, 3H, >C=CH- i Ar-CH₂O-), 3,64 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,30 (d, *J* = 6,9 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 2,41 (dd, *J* = 8,9, 6,4 Hz, 2H, -CH₂-), 2,28 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H, -CH₂-), 2,00 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,79 (s, 3H, -CH₃)

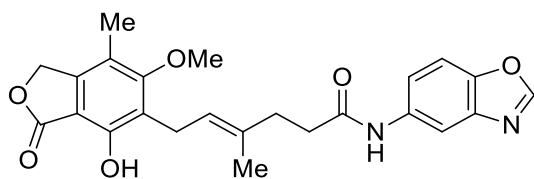
¹³C NMR: δ_C (DMSO-*d*₆): 171,44 (-CONH-), 170,60 (-COO-), 162,89 (C_{Ar}-OMe), 157,24 (C(2)_{HetAr}), 153,98 (C(3a)_{HetAr}), 153,12 (C_{Ar}-OH), 146,15 (C_{Ar}-CH₂O-), 138,29 (C(5)_{HetAr}), 134,14 (>C=C(-CH₃)-), 127,98 (C(7a)_{HetAr}), 123,26 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 122,82 (C(6)_{HetAr}), 122,57 (>C=C(-CH₃)-), 118,33 (C(7)_{HetAr}), 116,32 (C_{Ar}-CH₃), 112,98 (C(4)_{HetAr}), 107,34 (C_{Ar}-COO-), 69,02 (Ar-CH₂O-), 60,98 (Ar-OCH₃), 35,70 (-CH₂-CONH-), 35,17 (-CH₂-CH₂-), 22,90 (Ar-CH₂-), 16,66 (=C(-CH₃)-), 11,41 (Ar-CH₃)

HRMS (*m/z*) obliczone dla C₂₄H₂₄N₂O₅S [M-H]⁻: 451,1328, zmierzone: 451,1573

Czystość: 100,00%; R_{T,HPLC} = 8,651 min



N-(benzo[d]oksazol-5-yl) mykofenolamid (**A6**)



Metoda syntezy: B; eluent: toluen:aceton

Wydajność: 53%

Wygląd: beżowe ciało stałe

R_F = 0,34 (toluen:aceton, 3:1, v/v)

Temperatura topnienia [°C]: 84-87

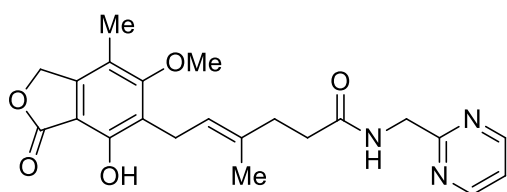
^1H NMR: δ_H (DMSO- d_6): 10,01 (s, 1H, -NH-), 9,37 (s, 1H, Ar-OH), 8,69 (s, 1H, C(2) H_{HetAr}), 8,05 (d, J = 1,9 Hz, 1H, C(4) H_{HetAr}), 7,64 (d, J = 8,8 Hz, 1H, CH_{HetAr}), 7,43 (dd, J = 8,8, 2,0 Hz, 1H, CH_{HetAr}), 5,19 (m, 3H, $>\text{C}=\text{CH}-$ i $\text{Ar}-\text{CH}_2\text{O}-$), 3,64 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,30 (d, J = 6,8 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 2,45 – 2,35 (m, 2H, -CH₂-), 2,28 (dd, J = 13,4, 5,3 Hz, 2H, -CH₂-), 2,01 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,79 (s, 3H, -CH₃)

^{13}C NMR: δ_C (DMSO- d_6): 171,21 (-CONH-), 170,59 (-COO-), 162,91 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-OMe}$), 155,22 ($\text{C}(2)_{\text{HetAr}}$), 153,13 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-OH}$), 146,16 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-CH}_2\text{O}-$), 145,68 ($\text{C}(3a)_{\text{HetAr}}$), 140,19 ($\text{C}(7a)_{\text{HetAr}}$), 136,73 ($\text{C}(5)_{\text{HetAr}}$), 134,16 ($>\text{C}=\text{C}(-\text{CH}_3)-$), 123,23 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-CH}_2\text{-CH=}$), 122,83 ($>\text{C}=\text{C}(-\text{CH}_3)-$), 118,00 ($\text{C}(6)_{\text{HetAr}}$), 116,33 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-CH}_3$), 111,18 (C_{HetAr}), 110,54 (C_{HetAr}), 107,35 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-COO}-$), 69,03 (Ar-CH₂O-), 60,98 (Ar-OCH₃), 35,62 (-CH₂-CONH-), 35,20 (-CH₂-CH₂-), 22,90 (Ar-CH₂-), 16,64 (=C(-CH₃)-), 11,43 (Ar-CH₃)

HRMS (m/z) obliczone dla C₂₄H₂₄N₂O₆ [M-H]⁻: 435,1556, zmierzone: 435,1795

Czystość: 95,79%; $R_{T,\text{HPLC}}$ = 7,866 min

N-[1-(pirymidyn-2-yl)metylo] mykofenolamid (**A7**)



Metoda syntezy: B; eluent: toluen:aceton

Wydajność: 61%

Wygląd: białe ciało stałe

R_F = 0,13 (toluen:aceton, 2:1, v/v)

Temperatura topnienia [°C]: 107-110

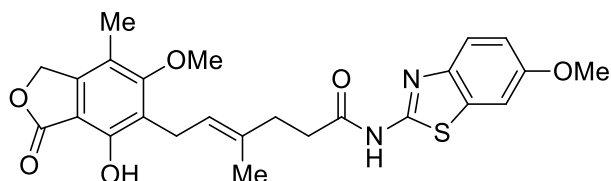
^1H NMR: δ_H (DMSO- d_6): 9,41 (s, 1H, Ar-OH), 8,73 (d, J = 4,9 Hz, 2H, CH_{HetAr}), 8,33 (t, J = 5,8 Hz, 1H, -NH-), 7,37 (t, J = 4,9 Hz, 1H, CH_{HetAr}), 5,24 (s, 2H, Ar-CH₂O-), 5,14 (t, J = 6,9 Hz, 1H, $>\text{C}=\text{CH}-$), 4,40 (d, J = 5,8 Hz, 2H, -CH₂-HetAr), 3,69 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,30 (d, J = 8,3 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 2,28 – 2,21 (m, 2H, -CH₂-), 2,17 (dd, J = 8,8, 5,6 Hz, 2H, -CH₂-), 2,08 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,75 (s, 3H, -CH₃)

¹³C NMR: δ_c (DMSO-*d*₆): 172,34 (-CONH-), 170,59 (-COO-), 167,48 (C(2)_{HetAr}), 163,00 (C_{Ar}-OMe), 157,72 (C(4)_{HetAr} i C(6)_{HetAr}), 153,17 (C_{Ar}-OH), 146,23 (C_{Ar}-CH₂O-), 134,52 (>C=C(-CH₃-)), 123,01 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 122,94 (>C=C(-CH₃-)), 120,17 (C(5)_{HetAr}), 116,39 (C_{Ar}-CH₃), 107,41 (C_{Ar}-COO-), 69,06 (Ar-CH₂O-), 61,07 (Ar-OCH₃), 45,22 (-CONH-CH₂-HetAr), 35,45 (-CH₂-CONH-), 34,56 (-CH₂-CH₂-), 22,88 (Ar-CH₂-), 16,49 (=C(-CH₃-)), 11,51 (Ar-CH₃)

HRMS (m/z) obliczone dla C₂₂H₂₅N₃O₅ [M-H]⁻: 410,1716, zmierzone: 410,1936

Czystość: 99,19%; R_{T,HPLC} = 5,293 min

N-(6-metoksybenzo[d]tiazol-2-ylo) mykofenolamid (**A8**)



Metoda syntezy: A; 2,0 eq DIPEA

Wydajność: 100%

Wygląd: białe ciało stałe

Temperatura topnienia [°C]: 246-248 (z rozkładem)

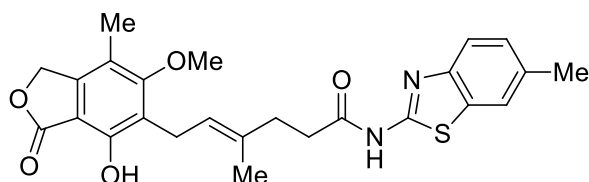
¹H NMR: δ_H (DMSO-*d*₆): 12,10 (s, 1H, -NH-), 9,35 (s, 1H, Ar-OH), 7,60 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, CH_{HetAr}), 7,53 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H, CH_{HetAr}), 7,02 (dd, *J* = 8,8, 2,5 Hz, 1H, CH_{HetAr}), 5,17 (t, *J* = 6,7 Hz, 1H, >C=CH-), 5,08 (s, 2H, Ar-CH₂O-), 3,81 (s, 3H, HetAr-OCH₃), 3,65 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,28 (d, *J* = 6,8 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 2,58 – 2,52 (m, 2H, -CH₂-), 2,28 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H, -CH₂-), 1,98 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,78 (s, 3H, -CH₃)

¹³C NMR: δ_c (DMSO-*d*₆): 171,89 (-CONH-), 170,61 (-COO-), 162,94 (C_{Ar}-OMe), 156,51 (C(2)_{HetAr}), 156,28 (C(6)_{HetAr}), 153,11 (C_{Ar}-OH), 146,06 (C_{Ar}-CH₂O-), 143,07 (C(3a)_{HetAr}), 133,72 (>C=C(-CH₃-)), 133,21 (C(7a)_{HetAr}), 123,61 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 122,65 (>C=C(-CH₃-)), 121,44 (C(4)_{HetAr}), 116,30 (C_{Ar}-CH₃), 115,19 (C(5)_{HetAr}), 107,29 (C_{Ar}-COO-), 105,13 (C(7)_{HetAr}), 68,95 (Ar-CH₂O-), 61,01 (Ar-OCH₃), 56,12 (HetAr-OCH₃), 34,69 (-CH₂-CONH-), 34,35 (-CH₂-CH₂-), 22,89 (Ar-CH₂-), 16,50 (=C(-CH₃-)), 11,42 (Ar-CH₃)

HRMS (m/z) obliczone dla C₂₅H₂₆N₂O₆S [M-H]⁻: 481,1433, zmierzone: 481,1692

Czystość: 99,43%; R_{T,HPLC} = 12,073 min

N-(6-metylobenzo[d]tiazol-2-ylo) mykofenolamid (**A9**)



Metoda syntezy: A; 1,0 eq DIPEA

Wydajność: 81%

Wygląd: białe ciało stałe

Temperatura topnienia [°C]: 257-260 (z rozkładem)

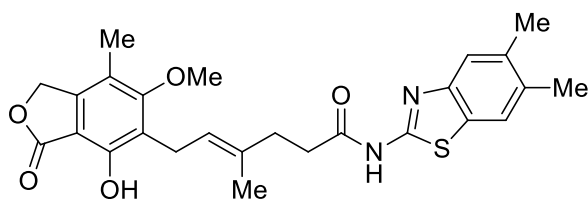
¹H NMR: δ_H (DMSO-*d*₆): 12,15 (s, 1H, -NH-), 9,38 (s, 1H, Ar-OH), 7,72 (s, 1H, C(7)H_{HetAr}), 7,59 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, CH_{HetAr}), 7,24 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, CH_{HetAr}), 5,17 (t, *J* = 6,7 Hz, 1H, >C=CH-), 5,06 (s, 2H, Ar-CH₂O-), 3,67 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,28 (d, *J* = 6,9 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 2,53 (m, 2H, -CH₂-), 2,41 (s, 3H, HetAr-CH₃), 2,27 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 1,97 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,76 (s, 3H, -CH₃)

¹³C NMR: δ_C (DMSO-*d*₆): 172,03 (-CONH-), 170,67 (-COO-), 163,03 (C_{Ar}-OMe), 157,42 (C(2)_{HetAr}), 153,14 (C_{Ar}-OH), 146,97 (C(3a)_{HetAr}), 146,02 (C_{Ar}-CH₂O-), 133,73 (>C=C(-CH₃)-), 133,25 (C(7a)_{HetAr}), 132,12 (C(6)_{HetAr}), 127,71 (C(5)_{HetAr}), 123,64 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 122,63 (>C=C(-CH₃)-), 121,55 (C_{HetAr}), 120,50 (C_{HetAr}), 116,33 (C_{Ar}-CH₃), 107,30 (C_{Ar}-COO-), 68,99 (Ar-CH₂O-), 61,03 (Ar-OCH₃), 34,69 (-CH₂-CONH-), 34,46 (-CH₂-CH₂-), 22,89 (Ar-CH₂-), 21,39 (HetAr-CH₃), 16,48 (=C(-CH₃)-), 11,41 (Ar-CH₃)

HRMS (m/z) obliczone dla C₂₅H₂₆N₂O₅S [M-H]⁻: 465,1484, zmierzone: 465,1721

Czystość: 98,99%; R_{T,HPLC} = 13,755 min

N-(5,6-dimetylobenzo[d]tiazol-2-ylo) mykofenolamid (**A10**)



Metoda syntezy: A; 1,0 eq DIPEA

Wydajność: 77%

Wygląd: białe ciało stałe

Temperatura topnienia [°C]: 246-247 (z rozkładem)

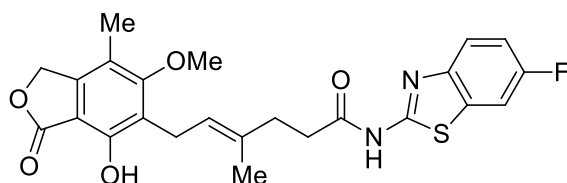
¹H NMR: δ_H (DMSO-*d*₆): 12,12 (s, 1H, -NH-), 9,36 (s, 1H, Ar-OH), 7,66 (s, 1H, CH_{HetAr}), 7,50 (s, 1H, CH_{HetAr}), 5,17 (t, *J* = 6,6 Hz, 1H, >C=CH-), 5,08 (s, 2H, Ar-CH₂O-), 3,64 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,28 (d, *J* = 6,7 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 2,57 – 2,51 (m, 2H, -CH₂-), 2,33 (m, 8H, -CH₂-, HetAr(5)-CH₃, i HetAr(6)-CH₃), 1,96 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,78 (s, 3H, -CH₃)

¹³C NMR: δ_C (DMSO-*d*₆): 171,93 (-CONH-), 170,57 (-COO-), 162,86 (C_{Ar}-OMe), 157,33 (C(2)_{HetAr}), 153,08 (C_{Ar}-OH), 147,48 (C(3a)_{HetAr}), 146,13 (C_{Ar}-CH₂O-), 135,06 (C(7a)_{HetAr}), 133,70 (>C=C(-CH₃)-), 132,64 (C(6)_{HetAr}), 129,22 (C(5)_{HetAr}), 123,59 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 122,67 (>C=C(-CH₃)-), 121,77 (C(7)_{HetAr}), 121,24 (C(4)_{HetAr}), 116,26 (C_{Ar}-CH₃), 107,30 (C_{Ar}-COO-), 68,90 (Ar-CH₂O-), 60,99 (Ar-OCH₃), 34,68 (-CH₂-CONH-), 34,32 (-CH₂-CH₂-), 22,88 (Ar-CH₂-), 20,17 (HetAr-CH₃), 20,01 (HetAr-CH₃), 16,50 (=C(-CH₃)-), 11,42 (Ar-CH₃)

HRMS (m/z) obliczono dla C₂₆H₂₈N₂O₅S [M-H]⁻: 479,1641, zmierzone: 479,1893

Czystość: 97,49%; R_{T,HPLC} = 14,909 min

N-(6-fluorobenzo[d]thiazol-2-yl) mykofenolamid (**A11**)



Metoda syntezy: A; 2,0 eq DIPEA

Wydajność: 71%

Wygląd: białe ciało stałe

Temperatura topnienia [°C]: 232-236 (z rozkładem)

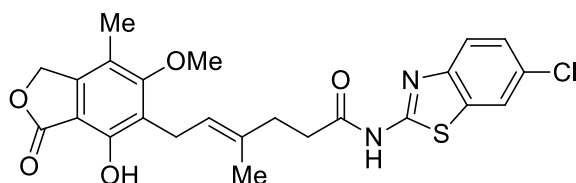
¹H NMR: δ_H (DMSO-*d*₆): 12,26 (s, 1H, -NH-), 9,35 (s, 1H, Ar-OH), 7,86 (dd, *J* = 8,7, 2,5 Hz, 1H, CH_{HetAr}), 7,71 (dd, *J* = 8,8, 4,8 Hz, 1H, CH_{HetAr}), 7,28 (td, *J* = 9,1, 2,6 Hz, 1H, CH_{HetAr}), 5,17 (t, *J* = 6,7 Hz, 1H, >C=CH-), 5,08 (s, 2H, Ar-CH₂O-), 3,65 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,28 (d, *J* = 6,8 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 2,55 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H, -CH₂-), 2,29 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H, -CH₂-), 1,98 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,78 (s, 3H, -CH₃)

¹³C NMR: δ_C (DMSO-*d*₆): 172,26 (-CONH-), 170,66 (-COO-), 163,04 (C_{Ar}-OMe), 160,02 (C(2)_{HetAr}), 158,20 (d, *J* = 21,3 Hz, C(6)_{HetAr}), 153,14 (C_{Ar}-OH), 145,98 (C_{Ar}-CH₂O-), 145,71 (C(3a)_{HetAr}), 133,70 (>C=C(-CH₃-)), 133,20 (d, *J* = 11,1 Hz, C(7a)_{HetAr}), 123,65 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 122,63 (>C=C(-CH₃-)), 121,90 (d, *J* = 9,2 Hz, C(4)_{HetAr}), 116,34 (C_{Ar}-CH₃), 114,45 (d, *J* = 24,5 Hz, C(5)_{HetAr}), 108,37 (d, *J* = 26,8 Hz, C(7)_{HetAr}), 107,28 (C_{Ar}-COO-), 69,02 (Ar-CH₂O-), 61,02 (Ar-OCH₃), 34,63 (-CH₂-CONH-), 34,43 (-CH₂-CH₂-), 22,89 (Ar-CH₂-), 16,47 (=C(-CH₃-)), 11,40 (Ar-CH₃)

HRMS (*m/z*) obliczono dla C₂₄H₂₃FN₂O₅S [*M*-H]⁻: 469,1233, zmierzone: 469,1488

Czystość: 99,58%; *R*_{T,HPLC} = 12,970 min

N-(6-chlorobenzo[d]thiazol-2-yl) mykofenolamid (**A12**)



Metoda syntezy: A; 1,0 eq DIPEA

Wydajność: 78%

Wygląd: białe ciało stałe

Temperatura topnienia [°C]: 261-264 (z rozkładem)

¹H NMR: δ_H (DMSO-*d*₆): 12,33 (s, 1H, -NH-), 9,38 (s, 1H, Ar-OH), 8,09 (s, 1H, C(7)_{HetAr}), 7,70 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H, CH_{HetAr}), 7,45 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H, CH_{HetAr}), 5,17 (t, *J* = 6,2 Hz, 1H, >C=CH-), 5,08 (s, 2H, Ar-CH₂O-), 3,67 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,28 (d, *J* = 6,6 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 2,56 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H, -CH₂-), 2,29 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H, -CH₂-), 1,97 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,78 (s, 3H, -CH₃)

¹³C NMR: δ_C (DMSO-*d*₆): 172,40 (-CONH-), 170,61 (-COO-), 162,96 (C_{Ar}-OMe), 159,12 (C(2)_{HetAr}), 153,12 (C_{Ar}-OH), 147,86 (C(3a)_{HetAr}), 146,02 (C_{Ar}-CH₂O-), 133,64 (>C=C(-CH₃-)),

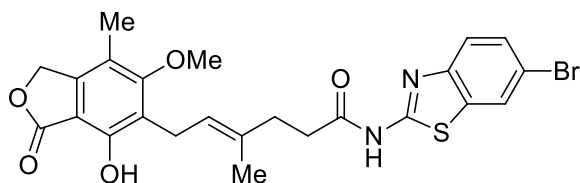


127,90 ($\underline{\text{C}}_{\text{HetAr}}$), 126,77 ($\underline{\text{C}}_{\text{HetAr}}$), 123,67 ($\underline{\text{C}}_{\text{Ar-CH}_2\text{-CH=}}$), 122,64 ($>\underline{\text{C}}=\text{C}(-\text{CH}_3)-$), 122,04 (C_{HetAr}), 121,69 (C_{HetAr}), 116,30 ($\underline{\text{C}}_{\text{Ar-CH}_3}$), 107,28 ($\underline{\text{C}}_{\text{Ar-COO-}}$), 68,96 ($\text{Ar-CH}_2\text{O-}$), 61,01 (Ar-OCH_3), 34,62 ($-\underline{\text{CH}_2\text{-CONH-}}$), 34,41 ($-\underline{\text{CH}_2\text{-CH}_2-}$), 22,89 (Ar-CH_2-), 16,48 ($=\text{C}(-\underline{\text{CH}_3})-$), 11,41 (Ar-CH_3)

HRMS (m/z) obliczono dla $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{ClN}_2\text{O}_5\text{S}$ [$\text{M}-\text{H}$] $^-$: 485,0938, zmierzone: 485,1186

Czystość: 97,55%; $R_{\text{T,HPLC}}$ = 14,845 min

N-(6-bromobenzo[d]tiazol-2-ylo) mykofenolamid (**A13**)



Metoda syntezy: A; 1,0 eq DIPEA; dodano 0,15 mL suchego 1,4-dioksanu, by zwiększyć rozpuszczalność reagentów

Wydajność: 80%

Wygląd: ciało stałe koloru kremowego

Temperatura topnienia [$^{\circ}\text{C}$]: 265-267 (z rozkładem)

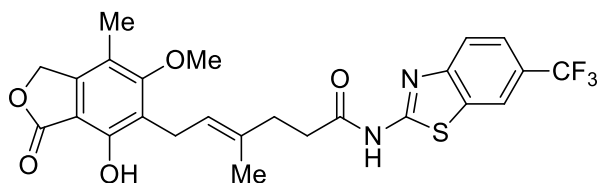
^1H NMR: δ_{H} ($\text{DMSO}-d_6$): 12,33 (s, 1H, -NH-), 9,37 (s, 1H, Ar-OH), 8,22 (d, J = 1,2 Hz, 1H, CH_{HetAr}), 7,67 (d, J = 8,6 Hz, 1H, CH_{HetAr}), 7,57 (dd, J = 8,6, 1,4 Hz, 1H, CH_{HetAr}), 5,17 (t, J = 6,6 Hz, 1H, $>\text{C}=\text{CH}-$), 5,08 (s, 2H, Ar- $\text{CH}_2\text{O-}$), 3,64 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,28 (d, J = 6,8 Hz, 2H, Ar- CH_2-), 2,56 (t, J = 7,4 Hz, 2H, -CH₂-), 2,29 (t, J = 7,4 Hz, 2H, -CH₂-), 1,97 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,76 (s, 3H, -CH₃)

^{13}C NMR: δ_{C} ($\text{DMSO}-d_6$): 172,41 ($-\underline{\text{CONH-}}$), 170,65 ($-\underline{\text{COO-}}$), 163,02 ($\underline{\text{C}}_{\text{Ar-OMe}}$), 159,10 ($\underline{\text{C}}(2)_{\text{HetAr}}$), 153,14 ($\underline{\text{C}}_{\text{Ar-OH}}$), 148,18 ($\underline{\text{C}}(3a)_{\text{HetAr}}$), 145,99 ($\underline{\text{C}}_{\text{Ar-CH}_2\text{O-}}$), 134,18 ($\underline{\text{C}}(7a)_{\text{HetAr}}$), 133,66 ($>\text{C}=\underline{\text{C}}(-\text{CH}_3)-$), 129,45 ($\underline{\text{C}}(7a)_{\text{HetAr}}$), 124,50 ($\underline{\text{C}}_{\text{HetAr}}$), 123,68 ($\underline{\text{C}}_{\text{Ar-CH}_2\text{-CH=}}$), 122,62 ($>\underline{\text{C}}=\text{C}(-\text{CH}_3)-$), 122,45 ($\underline{\text{C}}_{\text{HetAr}}$), 116,33 ($\underline{\text{C}}_{\text{Ar-CH}_3}$), 115,73 ($\underline{\text{C}}(6)_{\text{HetAr}}$), 107,29 ($\underline{\text{C}}_{\text{Ar-COO-}}$), 68,99 (Ar- $\text{CH}_2\text{O-}$), 61,02 (Ar-OCH₃), 34,63 ($-\underline{\text{CH}_2\text{-CONH-}}$), 34,46 ($-\underline{\text{CH}_2\text{-CH}_2-}$), 22,89 (Ar- CH_2-), 16,47 ($=\text{C}(-\underline{\text{CH}_3})-$), 11,40 (Ar-CH₃)

HRMS (m/z) obliczono dla $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{BrN}_2\text{O}_5\text{S}$ [$\text{M}-\text{H}$] $^-$: 529,0433, 531,0415, zmierzone: 529,0703, 531,0687

Czystość: 97,88%; $R_{\text{T,HPLC}}$ = 15,319 min

N-[6-(trifluorometylo)benzo[d]tiazol-2-ylo] mykofenolamid (**A14**)



Metoda syntezy: A; 2,0 eq DIPEA

Wydajność: 65%

Wygląd: białe ciało stałe

Temperatura topnienia [$^{\circ}\text{C}$]: 261-264 (z rozkładem)

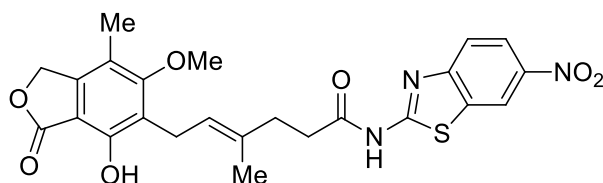
¹H NMR: δ_H (DMSO-*d*₆): 12,49 (s, 1H, -NH), 9,34 (s, 1H, Ar-OH), 8,47 (s, 1H, C(7)H_{HetAr}), 7,87 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H, CH_{HetAr}), 7,74 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H, CH_{HetAr}), 5,18 (t, *J* = 6,8 Hz, 1H, >C=CH-), 5,05 (s, 2H, Ar-CH₂O-), 3,64 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,28 (d, *J* = 6,9 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 2,59 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H, -CH₂-), 2,37 – 2,24 (m, 2H, -CH₂-), 1,96 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,79 (s, 3H, -CH₃)

¹³C NMR: δ_C (DMSO-*d*₆): 172,66 (-CONH-), 170,59 (-COO-), 162,96 (C_{Ar}-OMe), 161,47 (C(2)_{HetAr}), 153,11 (C_{Ar}-OH), 151,74 (C(3a)_{HetAr}), 145,99 (C_{Ar}-CH₂O-), 133,60 (>C=C(-CH₃)-), 132,50 (C(7a)_{HetAr}), 126,14 (C_{HetAr}), 124,09 (d, *J* = 31,9 Hz, HetAr-CF₃) 123,70 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 123,24 (d, *J* = 3,4 Hz, C_{HetAr}), 122,63 (>C=C(-CH₃)-), 121,24 (C_{HetAr}), 120,14 (d, *J* = 4,1 Hz, C(4)_{HetAr}), 116,28 (C_{Ar}-CH₃), 107,27 (C_{Ar}-COO-), 68,91 (Ar-CH₂O-), 61,00 (Ar-OCH₃), 34,57 (-CH₂-CONH-), 34,44 (-CH₂-CH₂-), 22,89 (Ar-CH₂-), 16,48 (=C(-CH₃)-), 11,37 (Ar-CH₃)

HRMS (*m/z*) obliczono dla C₂₅H₂₃F₃N₂O₅S [M-H]⁻: 519,1202, zmierzone: 519,1484

Czystość: 97,28%; R_{T,HPLC} = 15,435 min

N-(6-nitrobenzo[d]tiazol-2-ylo) mykofenolamid (**A15**)



Metoda syntezy: A; 1,0 eq DIPEA; dodano 0,6 mL suchego DMF i 1,0 ml suchego ACN w celu poprawienia rozpuszczalności reagentów

Wydajność: 42%

Wygląd: ciało stałe w kolorze beżowym

Temperatura topnienia [°C]: 278-280 (z rozkładem)

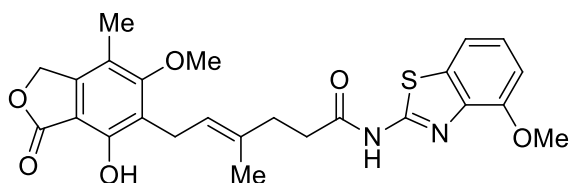
¹H NMR: δ_H (DMSO-*d*₆): 12,66 (s, 1H, -NH-), 9,37 (s, 1H, Ar-OH), 9,03 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H, CH_{HetAr}), 8,28 (dd, *J* = 8,0, 4,0 Hz, 1H, CH_{HetAr}), 7,86 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H, CH_{HetAr}), 5,18 (t, *J* = 6,6 Hz, 1H, >C=CH-), 5,08 (s, 2H, Ar-CH₂O-), 3,65 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,28 (d, *J* = 6,7 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 2,61 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H, -CH₂-), 2,31 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H, -CH₂-), 1,97 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,80 (s, 3H, -CH₃)

¹³C NMR: δ_C (DMSO-*d*₆): 172,96 (-CONH-), 170,57 (-COO-), 163,82 (C(2)_{HetAr}), 162,98 (C_{Ar}-OMe), 153,92 (C(6)_{HetAr}), 153,12 (C_{Ar}-OH), 146,02 (C_{Ar}-CH₂O-), 143,41 (C(3a)_{HetAr}), 133,58 (>C=C(-CH₃)-), 132,66 (C(7a)_{HetAr}), 123,73 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 122,63 (>C=C(-CH₃)-), 122,12 (C(5)_{HetAr}), 120,90 (C(4)_{HetAr}), 119,28 (C(7)_{HetAr}), 116,31 (C_{Ar}-CH₃), 107,28 (C_{Ar}-COO-), 68,99 (Ar-CH₂O-), 61,02 (Ar-OCH₃), 34,52 (-CH₂-CONH-), 34,50 (-CH₂-CH₂-), 22,89 (Ar-CH₂-), 16,49 (=C(-CH₃)-), 11,41 (Ar-CH₃)

HRMS (*m/z*) obliczono dla C₂₄H₂₃N₃O₇S [M-H]⁻: 496,1178, zmierzone: 496,1442

Czystość: 97,60%; R_{T,HPLC} = 13,238 min

N-(4-metoksybenzo[d]tiazol-2-yl) mykofenolamid (**A16**)



Metoda syntezy: A; 1,0 eq DIPEA; gama rozpuszczalników do przemywania osadu ograniczona do acetonitrylu

Wydajność: 66%

Wygląd: białe ciało stałe

Temperatura topnienia [°C]: 165-168

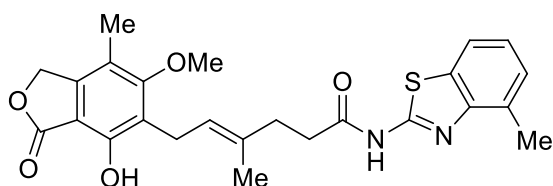
¹H NMR: δ_H (DMSO-*d*₆): 12,35 (s, 1H, -NH-), 9,34 (s, 1H, Ar-OH), 7,47 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H, CH_{HetAr}), 7,24 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H, C(6)H washing step limited to cold acetonitrile usage_{HetAr}), 6,99 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, CH_{HetAr}), 5,17 (t, *J* = 6,7 Hz, 1H, >C=CH-), 5,03 (s, 2H, Ar-CH₂O-), 3,91 (s, 3H, HetAr-OCH₃), 3,64 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,28 (d, *J* = 6,9 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 2,59 – 2,51 (m, 2H, -CH₂-), 2,29 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H, -CH₂-), 1,95 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,78 (s, 3H, -CH₃)

¹³C NMR: δ_C (DMSO-*d*₆): 171,92 (-CONH-), 170,67 (-COO-), 163,01 (C_{Ar}-OMe), 156,70 (C(2)_{HetAr}), 153,11 (C_{Ar}-OH), 152,35 (C(4)_{HetAr}), 145,98 (C_{Ar}-CH₂O-), 138,94 (C(3a)_{HetAr}), 133,66 (>C=C(-CH₃)-), 133,38 (C(7a)_{HetAr}), 124,73 (C(6)_{HetAr}), 123,71 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 122,59 (>C=C(-CH₃)-), 116,31 (C_{Ar}-CH₃), 113,85 (C(7)_{HetAr}), 108,31 (C(5)_{HetAr}), 107,27 (C_{Ar}-COO-), 69,00 (Ar-CH₂O-), 61,02 (Ar-OCH₃), 56,38 (HetAr-OCH₃), 34,70 (-CH₂-CONH-), 34,46 (-CH₂-CH₂-), 22,88 (Ar-CH₂-), 16,44 (=C(-CH₃)-), 11,35 (Ar-CH₃)

HRMS (m/z) obliczono dla C₂₅H₂₆N₂O₆S [M-H]⁻: 481,1433, zmierzone: 481,1695

Czystość: 98,12%; R_{T,HPLC} = 12,274 min

N-(4-metylobenzo[d]tiazol-2-yl) mykofenolamid (**A17**)



Metoda syntezy: A; 1,0 eq DIPEA; gama rozpuszczalników do przemywania osadu ograniczona do acetonitrylu

Wydajność: 67%

Wygląd: białe ciało stałe

Temperatura topnienia [°C]: 173-176

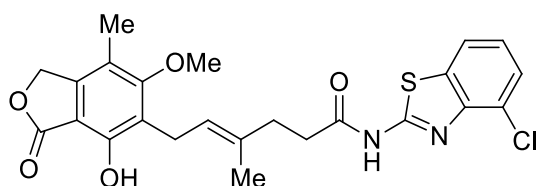
¹H NMR: δ_H (DMSO-*d*₆): 12,32 (s, 1H, -NH-), 9,31 (s, 1H, Ar-OH), 7,74 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H, CH_{HetAr}), 7,25 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H, CH_{HetAr}), 7,20 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H, C(6)H_{HetAr}), 5,18 (t, *J* = 6,8 Hz, 1H, >C=CH-), 4,95 (s, 2H, Ar-CH₂O-), 3,65 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,27 (d, *J* = 6,9 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 2,60 – 2,52 (m, 5H, -CH₂- i HetAr-CH₃), 2,29 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H, -CH₂-), 1,93 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,78 (s, 3H, -CH₃)

¹³C NMR: δ_c (DMSO-*d*₆): 172,11 ($-\underline{\text{CONH}}-$), 170,56 ($-\underline{\text{COO}}-$), 168,41, 162,78 ($\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}\text{-OMe}$), 157,39 ($\underline{\text{C}}(2)_{\text{HetAr}}$), 153,01 ($\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}\text{-OH}$), 147,95 ($\underline{\text{C}}(3a)_{\text{HetAr}}$), 145,99 ($\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}\text{-CH}_2\text{O}-$), 133,55 ($>\underline{\text{C}}=\underline{\text{C}}(-\text{CH}_3)-$), 131,52 ($\underline{\text{C}}(7a)_{\text{HetAr}}$), 130,17 ($\underline{\text{C}}_{\text{HetAr}}$), 126,93 ($\underline{\text{C}}_{\text{HetAr}}$), 123,75 ($\underline{\text{C}}_{\text{HetAr}}$), 123,67 ($\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}\text{-CH}_2\text{-CH=}$), 122,61 ($>\underline{\text{C}}=\underline{\text{C}}(-\text{CH}_3)-$), 119,38 ($\underline{\text{C}}(7)_{\text{HetAr}}$), 116,16 ($\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}\text{-CH}_3$), 107,19 ($\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}\text{-COO}-$), 68,83 ($\text{Ar-}\underline{\text{CH}}_2\text{O}-$), 60,96 ($\text{Ar-O}\underline{\text{CH}}_3$), 34,72 ($-\underline{\text{CH}}_2\text{-CONH}-$), 34,24 ($-\underline{\text{CH}}_2\text{-CH}_2-$), 22,86 ($\text{Ar-}\underline{\text{CH}}_2-$), 18,44 ($\text{HetAr-}\underline{\text{CH}}_3$), 16,49 ($=\underline{\text{C}}(-\underline{\text{CH}}_3)-$), 11,35 ($\text{Ar-}\underline{\text{CH}}_3$)

HRMS (*m/z*) obliczono dla C₂₅H₂₆N₂O₅S [*M*—*H*]⁺: 465,1484, zmierzone: 465,1731

Czystość: 100,00%; *R*_{T,HPLC} = 14,096 min

N-(4-chlorobenzo[d]tiazol-2-ylo) mykofenolamid (**A18**)



Metoda syntezy: A; 1,0 eq DIPEA

Wydajność: 76%

Wygląd: ciało stałe o kolorze i konsystencji kredy

Temperatura topnienia [°C]: 223-227

¹H NMR: δ_H (DMSO-*d*₆): 12,64 (s, 1H, -NH-), 9,33 (s, 1H, Ar-OH), 7,93 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H, CH_{HetAr}), 7,52 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H, CH_{HetAr}), 7,30 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H, C(6)H_{HetAr}), 5,18 (t, *J* = 6,8 Hz, 1H, >C=CH-), 5,01 (s, 2H, Ar-CH₂O-), 3,64 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,28 (d, *J* = 6,9 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 2,62 – 2,53 (m, 2H, -CH₂-), 2,29 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H, -CH₂-), 1,94 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,78 (s, 3H, -CH₃)

¹³C NMR: δ_c (DMSO-*d*₆): 172,48 ($-\underline{\text{CONH}}-$), 170,53 ($-\underline{\text{COO}}-$), 162,79 ($\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}\text{-OMe}$), 159,34 ($\underline{\text{C}}(2)_{\text{HetAr}}$), 153,05 ($\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}\text{-OH}$), 145,99 ($\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}\text{-CH}_2\text{O}-$), 145,77 ($\underline{\text{C}}(3a)_{\text{HetAr}}$), 133,48 ($>\underline{\text{C}}=\underline{\text{C}}(-\text{CH}_3)-$), 126,55 ($\underline{\text{C}}_{\text{HetAr}}$), 124,70 ($\underline{\text{C}}_{\text{HetAr}}$), 123,76 ($\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}\text{-CH}_2\text{-CH=}$), 122,60 ($>\underline{\text{C}}=\underline{\text{C}}(-\text{CH}_3)-$), 121,17 ($\underline{\text{C}}_{\text{HetAr}}$), 116,19 ($\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}\text{-CH}_3$), 107,21 ($\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}\text{-COO}-$), 68,85 ($\text{Ar-}\underline{\text{CH}}_2\text{O}-$), 60,95 ($\text{Ar-O}\underline{\text{CH}}_3$), 34,68 ($-\underline{\text{CH}}_2\text{-CONH}-$), 34,27 ($-\underline{\text{CH}}_2\text{-CH}_2-$), 22,87 ($\text{Ar-}\underline{\text{CH}}_2-$), 16,44 ($=\underline{\text{C}}(-\underline{\text{CH}}_3)-$), 11,33 ($\text{Ar-}\underline{\text{CH}}_3$)

HRMS (*m/z*) obliczono dla C₂₄H₂₃ClN₂O₅S [*M*—*H*]⁺: 485,0938, zmierzone: 485,1194

Czystość: 97,67%; *R*_{T,HPLC} = 13,969 min

Inne syntezy

Inne techniki otrzymywania amidów MPA

Metoda chloromrówczanowa

W wysuszonej płomieniem palnika i przedmuchanej strumieniem argonu kolbie okrągłodennej, umieszczono 50 mg **MPA** (0,156 mmol, 1,0 eq) i zawieszono w 2 mL suchego acetonitrylu z dodatkiem 5 kropeł DMF. Mieszaninę schłodzono do -15°C przy pomocy mieszaniny lodu i bezwodnego chlorku wapnia, a następnie jednocześnie dodano 22 μL trietyloaminy (*d* = 0,726 g·mL⁻¹, 0,156 mmol, 1,0 eq) i 21 μL chloromrówczanu *i*-butylu (*d* = 1,04 g·mL⁻¹, 0,156 mmol, 1,0 eq). Mieszano przez 15 min w tej temperaturze. Po tym czasie, dodano

24 mg 2-aminobenzo[d]tiazolu ($P = 97\%$, 0,156 mmol, 1,0 eq), w jednej porcji. Układ mieszano przez 96 godzin, w atmosferze gazu obojętnego, w międzyczasie pozwoleliśmy na osiągnięcie temperatury pokojowej. Po tym czasie powstały osad został odsączony i odmyty zimnymi rozpuszczalnikami (acetonitryl, metanol, chlorek metylenu), i wysuszony. Uzyskano produkt w postaci białego proszku z wydajnością 17% (12 mg). Jego czystość i strukturę ustalono dzięki zastosowaniu techniki ^1H NMR. W przypadku użycia 15 μL chloromrówczanu etylu ($d = 1,403 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 0,156 mmol, 1,0 eq), zamiast chloromrówczanu *i*-butylu, wydajność procesu wynosiła 21% (14 mg).

Metoda z DEPBT

W wysuszonej płomieniem palnika i przedmuchanej strumieniem argonu kolbie okrągłodennej, umieszczono 50 mg **MPA** (0,156 mmol, 1,0 eq) i 27 mg 2-aminobenzo[d]tiazolu ($P = 97\%$, 0,172 mmol, 1,1 eq), a następnie zawieszono w 1,5 mL suchego acetonitrylu i dodano 0,05 mL suchego DMF. W dalszej kolejności, dodano 27 μL DIPEA ($d = 0,742 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 0,321 mmol, 2,0 eq) i 78 mg DEPBT ($P = 90\%$, 0,234 mmol, 1,5 eq) i układ mieszano przez co najmniej 72 godziny, w atmosferze gazu obojętnego. Po tym czasie powstały osad został odsączony i odmyty zimnymi rozpuszczalnikami (acetonitryl, metanol, chlorek metylenu), i wysuszony. Uzyskano produkt w postaci białego proszku z wydajnością 38% (27 mg). Jego czystość i strukturę ustalono dzięki zastosowaniu techniki ^1H NMR.

Metoda z HOSu

W wysuszonej płomieniem palnika i przedmuchanej strumieniem argonu kolbie okrągłodennej, umieszczono 50 mg **MPA** (0,156 mmol, 1,0 eq) i 27 mg *N*-hydroksysukcynoimidu (0,234 mmol, 1,5 eq), a następnie zawieszono w 1,5 mL suchego acetonitrylu. Dodano 5 kropeł suchego DMF w celu poprawienia rozpuszczalności składników. W dalszej kolejności, wprowadzono 45 mg EDCI (0,234 mmol, 1,5 eq), w jednej porcji. Układ mieszano przez 24 godziny w temperaturze pokojowej, w obecności gazu obojętnego. Po tym czasie, do mieszaniny wprowadzono 26 mg 2-aminobenzo[d]tiazolu (0,172 mmol, 1,1 eq). Ponownie pozostawiono na mieszadle magnetycznym na okres 24 godzin. Kolejnym krokiem było odsączenie osadu, który powstał w trakcie reakcji, i odmycie go niewielkimi ilościami zimnych rozpuszczalników (acetonitryl, metanol, chlorek metylenu). Uzyskano produkt w postaci białego proszku z wydajnością 9% (7 mg). Jego czystość i strukturę ustalono dzięki zastosowaniu techniki ^1H NMR.

Metoda z T3P

W tym wariantie skorzystano z Metody B — synteza pochodnych **MPA** z wykorzystaniem amin alifatycznych lub aromatycznych, zaprezentowanej już wcześniej. Nie udało się otrzymać pożądanej pochodnej tą metodą, co zostało określone poprzez analizę TLC.

Metoda z EEDQ

W wysuszonej płomieniem palnika i przedmuchanej strumieniem argonu kolbie okrągłodennej, umieszczono 24 mg 2-aminobenzo[d]tiazolu ($P = 97\%$, 0,156 mmol, 1,0 eq),

a następnie rozpuszczono w 2 mL suchego acetonitrylu i 0,5 mL suchego DMF. Stale mieszając, dodano kolejno 50 mg **MPA** (0,156 mmol, 1,0 eq) i 58 mg EEDQ (0,234 mmol, 1,5 eq). Układ mieszano przez około 48 godzin, kontrolując postęp reakcji przy pomocy TLC. Nie udało się otrzymać pożądanego pochodnego tą metodą.

Metoda z chlorkiem oksalilu

W wysuszonej płomieniem palnika i przedmuchanej strumieniem argonu kolbie okrągłodennej, umieszczono 50 mg **MPA** (0,156 mmol, 1,0 eq), zawieszono w 2 mL suchego acetonitrylu, dodano 17 μ L chlorku oksalilu ($d = 1,500 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 0,195 mmol, 1,25 eq), a następnie 5 kropel suchego DMF. Układ mieszano w temperaturze pokojowej przez 1,5 godziny, a później po schłodzeniu kolby do 0°C, przy pomocy łaźni lodowej, wkroplono roztwór 97 mg 2-aminobenzo[d]tiazolu ($P = 97\%$, 0,624 mmol, 4,0 eq) w 1 mL suchego acetonitrylu. Mieszano przez co najmniej 72 godziny, kontrolując postęp reakcji przy pomocy TLC. Nie udało się otrzymać pożądanego pochodnego tą metodą.

Metoda z chlorkiem tytanu(IV)

W wysuszonej płomieniem palnika i przedmuchanej strumieniem argonu kolbie okrągłodennej, umieszczono 50 mg **MPA** (0,156 mmol, 1,0 eq) i rozpuszczono w 5 mL suchej pirydyny. Układ schłodzono do około -20°C przy pomocy mieszaniny lodu i bezwodnego chlorku wapnia. Następnie wkroplono 51 μ L chlorku tytanu(IV) przy pomocy strzykawki ($d = 1,730 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 0,468 mmol, 3,0 eq), w atmosferze argonu, stale mieszając. Po 10 min mieszania w tej temperaturze, dodano 24 mg 2-aminobenzo[d]tiazolu ($P = 97\%$, 0,156 mmol, 1,0 eq) w jednej porcji. Układ doprowadzono do temperatury pokojowej, a następnie ogrzewano w 85°C przez 2 godziny, obserwując postęp reakcji przy pomocy TLC. Nie udało się otrzymać pożądanego pochodnego tą metodą.

Otrzymywanie innych pochodnych amidowych

Metoda syntezy

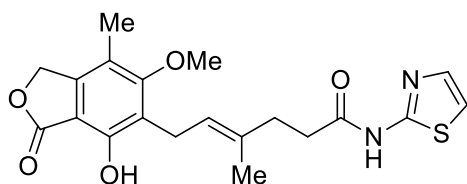
Związki te otrzymano tą samą metodą co wcześniej (Metoda A — synteza pochodnych **MPA** z wykorzystaniem amin heteroaromatycznych).

Ilości użytych reagentów w syntezie pochodnej 2-aminotiazolu: 50 mg **MPA** (0,156 mmol, 1,0 eq), 18 mg 2-aminotiazolu (0,172 mmol, 1,1 eq), 55 μ L DIPEA ($d = 0,742 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 0,312 mmol, 2,0 eq), 24 mg HOBt·H₂O (0,156 mmol, 1,0 eq), 51 mg TBTU (0,156 mmol, 1,0 eq), 1,5 mL acetonitrylu. Produkt otrzymano jako biały proszek z wydajnością 60% (38 mg).

Ilości użytych reagentów w syntezie pochodnej 2-amino-4-metylotiazolu: 50 mg **MPA** (0,156 mmol, 1,0 eq), 20 mg 2-amino-4-metylotiazolu (0,172 mmol, 1,1 eq), 55 μ L DIPEA ($d = 0,742 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 0,312 mmol, 2,0 eq), 24 mg HOBt·H₂O (0,156 mmol, 1,0 eq), TBTU (0,156 mmol, 1,0 eq), 1,5 mL acetonitrylu. Produkt otrzymano jako biały proszek z wydajnością 46% (30 mg).

Zestawienie właściwości pochodnej 2-aminotiazolu

N-(tiazol-2-yl) mykofenolamid



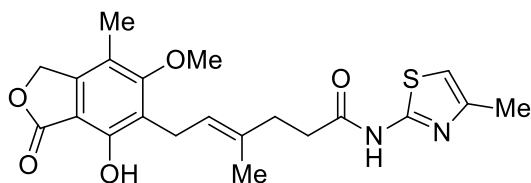
Wydajność: 60%

Wygląd: biały proszek

¹H NMR: δ_H (DMSO-*d*₆): 12,00 (s, 1H, -CONH-), 9,38 (s, 1H, Ar-OH), 7,42 (d, *J* = 3,5 Hz, 1H, C_{HetAr}(4)-H), 7,15 (d, *J* = 3,5 Hz, 1H, C_{HetAr}(5)-H), 5,23 (s, 2H, Ar-CH₂O-), 5,15 (t, *J* = 6,5 Hz, 1H, >C=CH-), 3,64 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,28 (d, *J* = 6,8 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 2,48 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CO-), 2,26 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-CO-), 2,04 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,76 (s, 3H, -CH₃)

Zestawienie właściwości pochodnej 2-amino-4-metylotiazolu

N-(4-metylotiazol-2-yl) mykofenolamid



Wydajność: 46%

Wygląd: biały proszek

¹H NMR: δ_H (DMSO-*d*₆): 11,91 (s, 1H, -CONH-), 9,36 (s, 1H, Ar-OH), 6,69 (s, 1H, C_{HetAr}(5)-H), 5,23 (s, 2H, Ar-CH₂O-), 5,14 (t, *J* = 6,6 Hz, 1H, >C=CH-), 3,64 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,28 (d, *J* = 6,8 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 2,46 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H, -CH₂-CH₂-CO-), 2,28 – 2,21 (m, 5H, HetAr-CH₃ + -CH₂-CH₂-CO-), 2,05 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,76 (s, 3H, -CH₃)

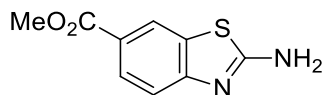
Otrzymywanie innych pochodnych amidowych

Metoda syntezy

W kolbie okrągłodennej umieszczono 0,5 g 4-aminobenzoesu metylu (3,310 mmol, 1,0 eq) i zadano go 12 mL lodowatego kwasu octowego. Po 30 minutach mieszania, dodano 1,3 g tiocyjanianu potasu (13,230 mmol, 4,0 eq), w jednej porcji. Układ schłodzony do około 17°C (moment przed zakrzepnięciem lodowatego kwasu octowego), i wkraplano 1,1 g bromu cząsteczkowego (*d* = 3,119 g·mL⁻¹, 0,339 mL, 6,620 mmol, 2,0 eq) w 3 mL lodowatego kwasu octowego. Mieszano przez około 15 godzin w temperaturze pokojowej. Po tym czasie, roztwór zneutralizowano 25% wodą amoniakalną do pH równego 8 (około 50 mL). Powstały osad odsączono, dobrze odmyto zimną wodą i wysuszono na powietrzu. Surowy produkt (2,15 g) zawieszono w metanolu, ogrzano do osiągnięcia temperatury wrzenia i przesączono na gorąco. Z przesączu wykrystalizowuje produkt, który należy następnie odsączyć pod zmniejszonym

ciśnieniem i odmyć niewielką porcją zimnego metanolu. Produkt powstaje z wydajnością 38% (262 mg). Część substancji można odzyskać z przesączu. Jego czystość analizowano przy pomocy techniki ^1H NMR.

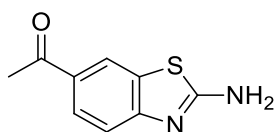
Zestawienie właściwości 2-aminobenzo[d]tiazolo-6-karboksylan metylu



Wydajność: 38%

^1H NMR: δ_{H} (DMSO- d_6): 8,30 (t, $J = 3,8$ Hz, 1H, $\text{C}_{\text{HetAr}}\text{-H}$, $\text{C}_{\text{HetAr}}(7)\text{-H}$), 7,92 (s, 2H, -NH_2), 7,82 (dd, $J = 8,4, 1,8$ Hz, 1H, $\text{C}_{\text{HetAr}}(5)\text{-H}$), 7,37 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, $\text{C}_{\text{HetAr}}(4)\text{-H}$), 3,83 (s, 3H, $\text{-CO}_2\text{Me}$)

Zestawienie właściwości 1-(2-aminobenzo[d]tiazol-6-ylo)etanonu

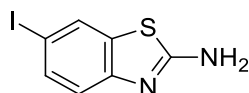


Wydajność: 31%

Wygląd: pomarańczowy proszek

^1H NMR: δ_{H} (DMSO- d_6): 8,34 (t, $J = 4,4$ Hz, 1H, $\text{C}_{\text{HetAr}}(7)\text{-H}$), 7,94 (s, 2H, -NH_2), 7,83 (dd, $J = 8,4, 1,6$ Hz, 1H, $\text{C}_{\text{HetAr}}(5)\text{-H}$), 7,37 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, $\text{C}_{\text{HetAr}}(4)\text{-H}$), 2,55 (s, 3H, -C(=O)CH_3)

Zestawienie właściwości 2-amino-6-jodobenzo[d]tiazolu



Wydajność: 54% (surowy)

^1H NMR: δ_{H} (DMSO- d_6): 8,07 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, $\text{C}_{\text{HetAr}}(7)\text{-H}$), 7,85 (s, 2H, -NH_2), 7,52 – 7,46 (m, 1H, $\text{C}_{\text{HetAr}}(5)\text{-H}$), 7,41 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, $\text{C}_{\text{HetAr}}(4)\text{-H}$)

Otrzymywanie 2-aminotiazoli

Metoda syntezy — A

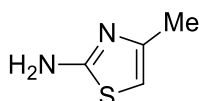
2,0 g tiomocznika (26,270 mmol, 1,0 eq) zawieszono w 5 mL acetonu, w kolbie okrągłodennej. Następnie, do układu wprowadzono 3,33 g jodu cząsteczkowego (13,140 mmol, 0,5 eq) i kolbę zaopatrzono w chłodnicę zwrotną. Zawiesinę ogrzewano w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez 4 godziny. Po tym czasie, mieszaninę poreakcyjną doprowadzono do temperatury pokojowej, a rozpuszczalnik odгонiono. Mieszaninę wylano na lód i zadawano stałym wodorotlenkiem sodu, aby doprowadzić pH do wartości 8-9. Powstałą warstwę wodną ekstrahowano kilkukrotnie eterem dietylowym. Fazę organiczną wysuszono wodorotlenkiem sodu, środek suszący odsączono, a rozpuszczalniki odparowano na wyparce próżniowej. Surowy produkt oczyszczono na kolumnie chromatograficznej z wykorzystaniem układu toluen:octan

etylu, 1:1 (v/v), oraz toluen:octan etylu, 1:2 (v/v), jako eluentów. Powstały produkt otrzymano z 10% wydajnością (313 mg). Jego czystość i strukturę określono przy pomocy techniki ^1H NMR.

Metoda syntezy — B

W kolbie okrągłodennej umieszczono 0,72 g acetofenonu ($d = 1,03 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $P = 98\%$, 6,000 mmol, 1,0 eq) i 0,23 g tiomocznika (3,000 mmol, 0,5 eq), i zadano je 18 mL bezwodnego etanolu. Układ nieznacznie schłodzono przy pomocy łaźni lodowej i dodano kolejno: 0,12 g tlenku miedzi(II) (1,5000 mmol, 0,25 eq) oraz 1,53 g jodu cząsteczkowego (6,000 mmol, 1,0 eq). Mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez noc (około 15 godzin), pod chłodnicą zwrotną i w atmosferze gazu obojętnego. Po tym czasie, układ schłodzono do temperatury pokojowej, zneutralizowano do pH obojętnego przy pomocy 25% wody amoniakalnej (jeśli jest taka potrzeba), i ekstrahowano octanem etylu. Warstwę organiczną wysuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu, środek suszący odsączono, a przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszczano na kolumnie chromatograficznej z wykorzystaniem mieszaniny eter naftowy:octan etylu, 4:1 (v/v), jako eluentu. Produkt otrzymano z 31% wydajności (325 mg). Jego czystość i strukturę określono przy pomocy techniki ^1H NMR.

Zestawienie właściwości 2-amino-4-metylotiazolu



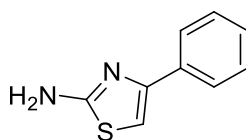
Wydajność: 10%, metoda A

Eluent: toluen:octan etylu, 1:1 (v/v) i 1:2 (v/v)

$R_F = 0,33$ (toluen:octan etylu, 1:2, v/v)

^1H NMR: δ_H (CDCl_3): 6,08 (s, 1H, $\text{C}_{\text{HetAr}}(5)\text{-H}$), 5,14 (bs, 2H, -NH_2), 2,22 (s, 3H, -CH_3)

Zestawienie właściwości 2-amino-4-fenylotiazolu



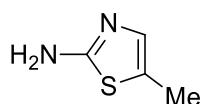
Wydajność: 31%, metoda B

Eluent: eter naftowy:octan etylu, 4:1 (v/v)

$R_F = 0,63$ (toluen:octan etylu, 1:1, v/v)

^1H NMR: δ_H ($\text{DMSO-}d_6$): 7,84 – 7,76 (m, 2H, $\text{C}_{\text{Ar}}(2, 6)\text{-H}$), 7,36 (t, $J = 7,7 \text{ Hz}$, 2H, $\text{C}_{\text{Ar}}(3, 5)\text{-H}$), 7,25 (t, $J = 7,3 \text{ Hz}$, 1H, $\text{C}_{\text{Ar}}(4)\text{-H}$), 7,07 (bs, 2H, -NH_2), 7,01 (s, 1H, $\text{C}_{\text{HetAr}}(5)\text{-H}$)

Zestawienie właściwości 2-amino-5-metylotiazolu



Wydajność: 11%, metoda B; użyto 1,0 eq propanalu

Eluent: toluen:octan etylu, 1:1 (v/v)

$R_F = 0,27$ (toluen:octan etylu, 1:1, v/v)

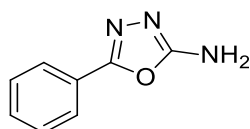
$^1\text{H NMR}$: δ_H (DMSO- d_6): 6,65 (bs, 2H, -NH₂), 6,57 (s, 1H, C_{HetAr}(4)-H), 2,18 (s, 3H, -CH₃)

Otrzymywanie 2-amino-1,3,4-oksadiazoli

Metoda syntezy

Do wysuszonej w płomieniu palnika i przedmuchanej strumieniem argonu kolby okrągłodennej, wprowadzono 0,45 g chlorowodoru semikarbazydu (4,000 mmol, 1,0 eq) i rozpuszczono go w 8 mL wody destylowanej. Następnie, dodano 0,33 bezwodnego octanu sodu (4,000 mmol, 1,0 eq), w jednej porcji. W osobnym naczyniu przygotowano roztwór 0,48 g benzaldehydu (4,000 mmol, 1,0 eq) w 8 mL metanolu. Metanolowy roztwór benzaldehydu wkroplono następnie do, uwolnionego z formy chlorowodoru, semikarbazydu, przy pomocy pipety Pasteura. Układ mieszano przez co najmniej 10 min (najlepiej całą noc, około 15 godzin), na wysokim nastawie liczby obrotów wirnika mieszadła magnetycznego. Nadmiar rozpuszczalników odgoniono na wyparce próżniowej, uzyskując surowy półprodukt. Ten ostatni, zawieszono później w 40 mL 1,4-dioksanu i wprowadza kolejno: 1,66 g bezwodnego węgla potasu (12,000 mmol, 3,0 eq) i 1,22 g jodu cząsteczkowego (4,800 mmol, 1,2 eq). Mieszaninę ogrzewano w 80°C przez 4 godziny, pod chłodnicą zwrotną i w atmosferze gazu obojętnego. Po tym czasie, układ ochłodzono do temperatury pokojowej i zadano 5% roztworem tiosiarczanu sodu. Uzyskaną warstwę hydrofilową ekstrahowano kilkakrotnie mieszaniną chlorek metylenu:metanol, 10:1 (v/v). Połączone fazy organiczne wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu, środek suszący odsączono, a przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszczano na kolumnie chromatograficznej z wykorzystaniem mieszanki eter naftowy:octan etylu, 1:2 (v/v), jako eluentu. Produkt otrzymano z 75% wydajnością (0,48 g). Jego czystość i strukturę określono przy pomocy techniki $^1\text{H NMR}$.

Zestawienie właściwości 2-amino-5-fenyl-1,3,4-oksadiazolu



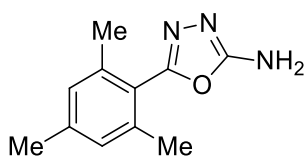
Wydajność: 75%

Eluent: eter naftowy:octan etylu, 1:2 (v/v)

$R_F = 0,36$ (eter naftowy:octan etylu, 1:2, v/v)

$^1\text{H NMR}$: δ_H (DMSO- d_6): 7,82 – 7,78 (m, 2H, C_{Ar}(2, 6)-H), 7,56 – 7,50 (m, 3H, C_{Ar}(3, 4, 5)-H), 7,27 (bs, 2H, -NH₂)

Zestawienie właściwości 2-amino-5-metylo-1,3,4-oksadiazolu



Wydajność: 62%

¹H NMR: δ_H (DMSO-*d*₆): 7,09 (bs, 2H, C_{Ar}(3, 5)-H lub -NH₂), 7,00 (bs, 2H, C_{Ar}(3, 5)-H lub -NH₂), 2,29 (s, 3H, C_{Ar}(4)-CH₃), 2,18 (s, 6H, C_{Ar}(2, 6)-CH₃)

7.1.3. Badania biologiczne

Materiały badawcze

T-Jurkat (E6-1, ATCC TIB-152), czyli ludzką linię limfoblastoidalną T, pochodzącą z ostrej białaczki T-komórkowej, otrzymano z banku komórek Zakładu Immunologii Medycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Przed badaniem, komórki rozmrożono i pasażowano przez około 7 dni, aby osiągnąć logarytmiczną fazę ich wzrostu. PBMCs pobrano z kożuszka leukocyтарnego anonimowych, zdrowych ochotników, średnio w wieku 33 ± 6 lat, z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Gdańsku (zaakceptowane i zatwierdzone przez komisję bioetyczną przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym o numerze NKBBN/376-410/2021).

Pożywka

Linie komórek T-Jurkat zawieszono w mieszaninie zawierającej: pożywkę RPMI-1640 (Sigma Aldrich, Poznań, Polska), 10% FBS (Sigma Aldrich, Poznań, Polska), penicylinę (100 U/mL) i streptomycynę (100 mg/mL, Sigma Aldrich, Poznań, Polska). PBMCs zawieszono w mieszaninie zawierającej: pożywkę X-VIVO20 (X-VIVO 20, Lonza, Verviers, Belgia), 10% inaktywowaną termicznie ludzką surowicę AB (Narodowy Bank Krwi, Racibórz, Polska), penicylinę (100 U/mL) i streptomycynę (100 mg/ml).

Przygotowanie pochodnych MPA do badań

W celu przygotowania odpowiednich stężeń badanych związków, substancje rozpuszczano w DMSO (Sigma Aldrich, Polska) z 1% dodatkiem solubilizatora — Tween-20, do uzyskania końcowego stężenia 0,01 M pochodnej. Roztwór rozcieńczano 10-krotnie, a następnie 5-krotnie w odpowiednim medium bez dodatków (RPMI-1640 dla linii komórkowej T-Jurkat; XVIVO20 dla PBMCs) w celu uzyskania następujących stężeń: 200, 20, 2, 0,2, 0,02 μ M.

Izolacja PBMCs

PBMCs izolowano poprzez wirowanie gradientowy, tak jak opisano już wcześniej [246]. Kożuszki leukocyтарne rozcieńczono solą fizjologiczną buforowaną fosforanami (PBS, pH = 7,4, ThermoFisher Scientific) w stosunku 1:1, pokryto z wykorzystaniem Ficoll-Paque™ PLUS (VWR

International) i wirowano przy 800 x g przez 20 minut. Warstwę PBMCs zebrano i przemyto dwukrotnie PBS (pierwsze płukanie: 600 x g przez 10 minut; drugie płukanie: 600 x g przez 5 minut). Ilość i żywotność komórek oceniano przy użyciu automatycznego licznika komórek Bio-Rad TC20™ w połączeniu z barwieniem błękitem trypanowym.

Test cytotoksyczności *in vitro* z barwnikiem XTT

Efekt cytotoksyczny pochodnych **MPA** został zmierzony w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem 2,3-bis(2-metoksy-4-nitro-5-sulfofenilo)-2H-tetrazolio-5-karboksyanilidzu (XTT) (Roche, Bazylea, Szwajcaria). PBMCs zawieszone w pożywce X-VIVO20 i komórki T-Jurkat zawieszone w pożywce RPMI-1640, nałożono na 96-dołkową płytkę w stężeniach 5×10^5 komórek/50 μ L/dołek. 50 μ L badanych związków, przygotowanych tak jak opisano powyżej, dodano do dołków w celu uzyskania końcowych stężeń wynoszących: 100, 10, 1, 0,1, 0,01 μ M. Jako tło stosowana była pożywka bez komórek, zaś jako kontrola dodatnia — komórki niepotraktowane związkami. Po 48 godzinach, dla komórek T-Jurkat, i 72 godzinach, dla PBMCs, inkubacji w atmosferze o podwyższonej wilgotności względnej, z 5% zawartością CO₂, w temperaturze 37°C, do wszystkich próbek dodano 50 μ L świeżo przygotowanego odczynnika XTT. Płytki inkubowano przez 24 godziny (5% CO₂ w 37°C). Konwersję rozpuszczalnej w wodzie żółtej soli tetrazoliowej XTT do pomarańczowego formazanu monitorowano mierząc gęstość optyczną (OD) przy długości fali równej 450 nm, na spektrofotometrze mikropłytkowym Agilent BioTek Epoch (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia), przy długości fali dla tła równej 690 nm. Dane wyrażono jako IC₅₀ co oznacza stężenie związku, przy którym następuje zmniejszenie żywotności komórek do 50% w odniesieniu do komórek kontrolnych. Próbę dla każdej z pochodnych wykonano w trzech powtórzeniach. Końcowe stężenie DMSO w hodowli nie miało wpływu na żywotność komórek. Żywotność komórek określano przy najwyższym stężeniu badanego związku. W celu wyliczenia tego parametru zastosowano urządzenie zliczające komórki o nazwie TC20 (Biorad, Hercules, Kalifornia) z wykorzystaniem testu wykluczenia błękitu trypanowego.

Test proliferacji *in vitro* na bazie barwnika VPD450

Komórki PBMCs i komórki T-Jurkat przemyto dwukrotnie ciepłym PBS (37°C), zawieszono w świeżym PBS z osiągnięciem końcowego stężenia równego $10\text{--}30 \times 10^6$ komórek/ml i znakowano 1 μ L VPD450 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) w 37°C przez 15 min. Komórki odwirowywano co 5 min w celu zapewnienia jednolitego wybarwienia [181, 247]. Następnie, komórki przemywano PBS i odpowiednią pożywką (XVIVO20 dla PBMCs i RPMI-1640 dla komórek T-Jurkat). Po tym etapie, komórki zawieszono w świeżej pożywce i umieszczono na 96-dołkowej płytce (1×10^6 komórek/dołek). PBMCs zostały dodatkowo zastymulowane drobinami magnetycznymi pokrytymi przeciwciałami anti-CD3 i anti-CD28 (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornia) w stosunku komórki:drobiny, jak 2:1. Równolegle, wybarwione i niestymulowane komórki, jak również wybarwione i stymulowane komórki wysiano w tym samym stężeniu co komórki kontrolne. Po 48 godzinach dla T-Jurkat i 72 godzinach dla PBMCs, komórki analizowano

za pomocą cytometru przepływowego LSRFortessa (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) i oprogramowania do analizy cytometrii przepływowej Kaluza C (Beckman Coulter, Brea, Kalifornia). Dane wyrażono jako EC₅₀ czyli stężenie związku, przy którym proliferacja komórek zostaje zahamowana w 50% w odniesieniu do komórek kontrolnych. Żywotność komórek określano przy najwyższym stężeniu badanego związku. W tym celu zastosowano urządzenie zliczające komórki TC20 (Biorad) z zastosowaniem metodologii wykluczania błękitu trypanowego.

Analiza apoptozy komórkowej

Udział komórek apoptotycznych i nekrotycznych powstałych w wyniku działania pochodnych amidowych wykrywano przy użyciu zestawu FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences). Zgodnie z metodologią wskazaną przez producenta, komórki przemyto zimnym PBS, a następnie zawieszono w buforze Annexin V Binding Buffer, osiągając stężenie końcowe równe 10⁶ komórek/ml. Do materiału zawierającego 10⁵ komórek, dodano 5 µL aneksyny V-FITC i 5 µL jodku propidyny (PI). Po 15 minutach, w temperaturze pokojowej, w ciemności, przeprowadzono analizę metodą cytometrii przepływowej. Komórki zostały podzielone na cztery grupy zgodnie z wybarwieniem układem aneksyna V/PI: komórki żywe (aneksyna V-ujemna, PI-ujemna); komórki wczesnej apoptozy (Aneksyna V-dodatnia, PI-ujemna), komórki późnej apoptozy (Aneksyna V-dodatnia, PI-dodatnia) i komórki nekrotyczne (Aneksyna V-ujemna, PI-dodatnia). Komórki analizowano z pomocą cytometru przepływowego LSRFortessa i oprogramowania do analizy cytometrii przepływowej — Kaluza C.

Test GMP

PBMCs zawieszono w probówce wirówkowej 15 mL w stężeniu 10-30 × 10⁶ komórek w 1 mL PBS, dodano 2 µL 1 mM roztworu barwnika VPD 450, inkubowano przez 15 min w 37°C, przepłukano 9-krotną objętością ciepłego PBS i odwirowano z przyspieszeniem 400 x g przez 5 min. Następnie, komórki zawieszono w 10 mL pożywki X-VIVO z 10% dodatkiem FBS i ponownie odwirowano z przyspieszeniem 400 x g w ciągu 5 min. Po zawieszeniu komórek w kompletnym medium sprawdzano stan wybarwienia z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Tak otrzymane komórki stymulowano przeciwciałami anty-CD3/anty-CD28, jak opisano wcześniej (*vide* Test proliferacji *in vitro* na bazie barwnika VPD450). W celu wykonania testu GMP, do każdego z dołków dodano taką ilość GMP, aby osiągnąć jego finalne stężenie równe 50 µM, a w późniejszym etapie inkubowano przez 72 godziny. Aktywność proliferacyjną badano w obecności różnych stężeń związków (50; 25; 10; 1 i 0,1 µM; **MPA** i wybrane pochodne amidowe) lub bez ich dodatku. Proliferacja komórek była oceniana ponownie przy użyciu cytometrii przepływowej.

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu GraphPad Prism w wersji 9 (GraphPad Software Inc., La Jolla, Kalifornia). Do oceny różnic pomiędzy **MPA** a nowymi pochodnymi amidowymi **MPA** zastosowano dwustronny, niesparowany test t-Studenta. Różnice

uznano za istotne statystycznie, gdy $p < 0,05$. Wartości EC_{50} i IC_{50} obliczono metodą 4-parametrycznej regresji nieliniowej przy użyciu programu wskazanego wyżej. Istotność obliczono za pomocą testu t, wyniki istotne oznaczono * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) lub *** ($p < 0,001$).

7.2. Estrowe pochodne MPA

7.2.1. Synteza

Informacje ogólne

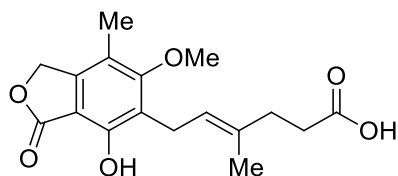
Substraty (**MPA**, związki fenolowe, DMAP, DCC) zostały pozyskane od Sigma-Aldrich, Apollo Scientific, Chemat, a także Alfa Aesar. Rozpuszczalniki oczyszczono i osuszono z wykorzystaniem standardowych procedur preparatywnych. Stosowane metody chromatograficzne były takie same jak opisano w syntezie amidów **MPA** (7.1.2. Synteza).

Widma NMR zarejestrowano z wykorzystaniem tego samego sprzętu oraz technik opisywania jak w przypadku analizy amidów **MPA** (7.1.2. Synteza). Jako wewnętrzny standard wykorzystano jednak tym razem piki szczątkowe chloroformu (7,26 ppm dla ^1H NMR i 77,16 ppm dla ^{13}C NMR).

Analiza czystości techniką HPLC była prowadzona z wykorzystaniem tej samej aparatury i metod. Jedyna różnica związana była z eluentem, który w tym wypadku zawierał: 10 mM mrówczan amonu (rozpuszczalnik A) i układ acetonitryl:metanol, 1:1 (v/v) (rozpuszczalnik B), stosowane w metodzie gradientowej, gdzie skład B rozpoczynał się na 50%, a kończył na 100% tego składnika, w czasie 25 min analizy. Dodatkowo, rejestracja pików była prowadzona przy długości fali równej 254 i 305 nm.

Dokładna masa cząsteczkowa próbek (do 4 miejsc po przecinku) była ustalana techniką HRMS w tych samych warunkach co wcześniej — ESI(-)-QTOF, na tym samym chromatografie. Dodatkowo, ciśnienie nebulizacji, natężenie przepływu gazowego azotu, temperatura gazu suszącego, natężenie przepływu gazu suszącego i temperatura gazu nośnego były następujące: 45 psi, 5 L·min⁻¹, 300°C, 11 L·min⁻¹, i 250°C. Napięcie na kapilarze wynosiło 3,5 kV a napięcie fragmentacji odpowiednio 150 i 200 V.

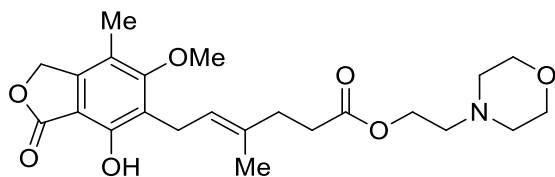
Dane eksperymentalne zebrane dla MPA



$R_F = 0,42$ (toluen:aceton, 3:1, v/v)

Pozostałe dane zebrano już wcześniej w 7.1.2. Synteza.

Dane eksperymentalne zebrane dla MMF



$R_F = 0,58$ (dichlorometan:metanol, 20:1, v/v)

$^1\text{H NMR}$: δ_H (CDCl_3): 7,97 (s, 1H, Ar-OH), 5,23 – 5,16 (m, 3H, $>\text{C}=\text{CH}-$ i Ar- $\text{CH}_2\text{O}-$), 4,12 (t, $J = 5,8$ Hz, 2H, $-\text{COOCH}_2-$), 3,74 (s, 3H, Ar- OCH_3), 3,72 – 3,64 (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2-$), 3,36 (d, $J = 6,9$ Hz, 2H, Ar- CH_2-), 2,57 (t, $J = 5,8$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2\text{N}<$), 2,48 (s, 4H, $-\text{CH}_2\text{N}-\text{CH}_2-$), 2,39 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-$), 2,28 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-$), 2,13 (s, 3H, Ar- CH_3), 1,78 (s, 3H, $-\text{CH}_3$)

$^{13}\text{C NMR}$: δ_C (CDCl_3): δ 173,19 ($-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{N}<$), 172,76 ($-\text{COO}-$), 163,54 ($\text{C}_{\text{Ar}}-\text{OME}$), 153,60 ($\text{C}_{\text{Ar}}-\text{OH}$), 144,06 ($\text{C}_{\text{Ar}}-\text{CH}_2\text{O}-$), 133,92 ($>\text{C}=\text{C}(-\text{CH}_3)-$), 122,81 ($\text{C}_{\text{Ar}}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{C}(-\text{CH}_3)-$), 122,16 ($>\text{C}=\text{C}(-\text{CH}_3)-$), 116,60 ($\text{C}_{\text{Ar}}-\text{CH}_3$), 106,35 ($\text{C}_{\text{Ar}}-\text{COO}-$), 69,93 (Ar- $\text{CH}_2\text{O}-$), 66,83 (2C, $-\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2-$), 61,71 ($-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}<$), 60,99 (Ar- OCH_3), 57,01 ($\text{COOCH}_2-\text{CH}_2-\text{N}<$), 53,91 (2C, $-\text{CH}_2-\text{N}-\text{CH}_2-$), 34,63 ($-\text{CH}_2-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 32,97 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 22,62 (Ar- CH_2-), 16,07 ($=\text{C}(-\text{CH}_3)-$), 11,54 (Ar- CH_3)

HRMS (m/z) obliczone dla $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{NO}_7$ [$\text{M}-\text{H}$] $^-$: 432,2022, zmierzone: 432,2100

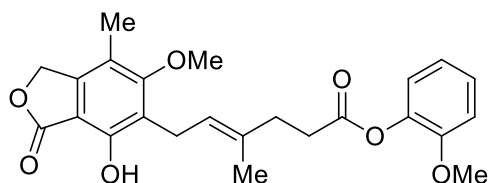
Czystość: 100,00%; $R_{T,\text{HPLC}} = 14,093$ min

Ogólna metoda syntezy pochodnych estrowych MPA

W kolbie wysuszonej nad płomieniem palnika i przedmuchanej strumieniem argonu umieszczono 200 mg **MPA** (0,624 mmol, 1,00 eq) i 81 mg gwajakolu (74 μL , 0,656 mmol, 1,05 eq). Substraty rozpuszczono następnie w 4 mL suchego dichlorometanu lub chloroformu. Po rozpuszczeniu reagentów, kolbę przedmuchano strumieniem gazu obojętnego. W dalszej kolejności dodano 8 mg DMAP (0,062 mmol, 0,10 eq). Mieszaninę schłodzono do 0°C i 155 mg of DCC (0,749 mmol, 1,20 eq) wrzucono w jednej porcji. Układ mieszano na mieszadłe magnetycznym przez co najmniej 72 godziny, w międzyczasie pozwoliwszy osiągnąć mu temperaturę pokojową. Nadmiernemu parowaniu lotnego rozpuszczalnika można zapobiec podkładając pod kolbę naczynie z wodą w temperaturze pokojowej. Przejmie ono wówczas ciepło wyprodukowane w czasie pracy mieszadła magnetycznego. Mieszaninę reakcyjną rozcieńczono następnie co najmniej 5 mL chlorku metylenu i ekstrahowano kolejno: nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu, 1 M kwasem solnym i nasyconą solanką. Fazę organiczną wysuszone nad bezwodnym siarczanem sodu lub magnezu, odsączono i zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Jeśli w zatężonej mieszaninie znajduje się znaczna ilość drobnokrystalicznego, mocznikowego produktu ubocznego, do układu wprowadza się niewielką ilość chlorku metylenu, chłodzi do 0°C , a następnie sączy odrzucając osad. Przesącz zagęszcza się pod zmniejszonym ciśnieniem. Surową mieszaninę oczyszczano na kolumnie chromatograficznej w odpowiednim układzie rozpuszczalników. W przypadku **MP1** użyto eluentu: eter naftowy:octan etylu, jak 3:1 (v/v). **MP1** uzyskano jako biały proszek z 13% wydajnością (35 mg).

Zestawienie właściwości pochodnych metoksyLOWANYCH fenoli (MP1-MP9)

Mykofenolan gwajakolu, mykofenolan gwajakylu (MP1)



Wydajność: 13%

Wygląd: białe ciało stałe

Eluent: eter naftowy:octan etylu, 3:1 (v/v)

R_F = 0,33 (dichlorometan)

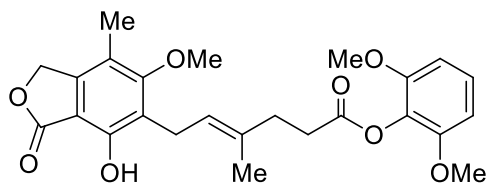
¹H NMR: δ_H (CDCl₃): 7,68 (s, 1H, Ar-OH), 7,17 (t, J = 7,7 Hz, 1H, C_{Ar,MP}(6)-H), 6,91 (dt, J = 15,2, 7,9 Hz, 3H, C_{Ar,MP}(3, 4 i 5)-H), 5,33 (t, J = 6,9 Hz, 1H, >C=CH-), 5,20 (s, 2H, Ar-CH₂O-), 3,82 – 3,73 (m, 6H, Ar-OCH₃ i Ar_{MP}-OCH₃), 3,41 (t, J = 10,4 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 2,72 – 2,63 (m, 2H, -CH₂-), 2,44 (dd, J = 18,9, 11,4 Hz, 2H, -CH₂-), 2,15 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,86 (s, 3H, -CH₃)

¹³C NMR: δ_C (CDCl₃): 172,92 (-COO-Ar_{MP}), 171,38 (-COO-), 163,67 (C_{Ar}-OMe), 153,59 (C_{Ar}-OH), 151,07 (C_{Ar,MP}-OMe), 144,01 (C_{Ar}-CH₂O-), 139,70 (C_{Ar,MP}-OOC-), 134,02 (>C=C(-CH₃)-), 126,74 (C_{Ar,MP}(4)-H), 122,92 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 122,76 (>C=C(-CH₃)-), 122,10 (C_{Ar,MP}(5)-H), 120,62 (C_{Ar,MP}(6)-H), 116,74 (C_{Ar}-CH₃), 112,31 (C_{Ar,MP}(3)-H), 106,34 (C_{Ar}-COO-), 70,05 (Ar-CH₂O-), 61,01 (Ar-OCH₃), 55,77 (Ar_{MP}-OCH₃), 34,60 (-CH₂-COO-Ar_{MP}), 32,75 (-CH₂-CH₂-), 22,62 (Ar-CH₂-), 16,17 (=C(-CH₃)-), 11,58 (Ar-CH₃)

HRMS (m/z) obliczone dla C₂₄H₂₆O₇ [M-H]⁻: 425,1600, zmierzone: 425,1673

Czystość: 100,00%; R_{T,HPLC} = 14,093 min

Mykofenolan syryngolu, mykofenolan syryngylu (MP2)



Wydajność: 36%

Wygląd: niskotopliwy biały proszek

Eluent: chloroform

R_F = 0,22 (dichlorometan)

¹H NMR: δ_H (CDCl₃): 7,68 (s, 1H, Ar-OH), 7,11 (t, J = 8,4 Hz, 1H, C_{Ar,MP}(4)-H), 6,59 (d, J = 8,4 Hz, 2H, C_{Ar,MP}(3 i 5)-H), 5,32 (t, J = 6,8 Hz, 1H, >C=CH-), 5,20 (s, 2H, Ar-CH₂O-), 3,77 (d, J = 10,0 Hz, 9H, Ar-OCH₃ i Ar_{MP}-OCH₃), 3,42 (d, J = 6,9 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 2,76 – 2,65 (m, 2H, -CH₂-), 2,52 – 2,41 (m, 2H, -CH₂-), 2,15 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,86 (s, 3H, -CH₃)

¹³C NMR: δ_C (CDCl₃): 172,93 (-COO-Ar_{MP}), 171,14 (-COO-), 163,70 (C_{Ar}-OMe), 153,59 (C_{Ar}-OH), 152,28 (2C, C_{Ar,MP}-OMe), 143,99 (C_{Ar}-CH₂O-), 134,21 (>C=C(-CH₃)-), 128,68 (C_{Ar,MP}-OOC-), 126,11 (C_{Ar,MP}(4)-H), 122,76 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 122,15 (>C=C(-CH₃)-), 116,72 (C_{Ar}-CH₃), 106,32

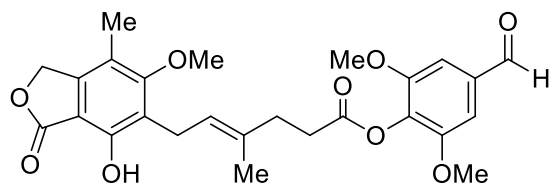


($\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}\text{-COO-}$), 104,78 (2C, $\text{C}_{\text{Ar,MP}}(3 \text{ i } 5)\text{-H}$), 70,05 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{O-}$), 61,02 ($\text{Ar-O}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 56,07 (2C, $\text{Ar}_{\text{MP}}\text{-O}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 34,57 ($\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-COO-Ar}_{\text{MP}}$), 32,64 ($\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 22,62 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-}$), 16,15 ($=\text{C}(\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_3)\text{-}$), 11,57 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}\text{H}_3$)

HRMS (m/z) obliczone dla $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{O}_8$ [M-H] $^-$: 455,1706, zmierzone: 455,1788

Czystość: 97,40%; $R_{\text{T,HPLC}} = 13,838$ min

Mykofenolan syryngaldehydu, mykofenolan 4-formylosyryngylu (**MP3**)



Wydajność: 18%

Wygląd: niskotopliwy biały osad

Eluent: chloroform

$R_F = 0,11$ (dichlorometan)

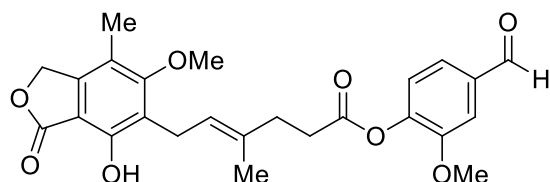
$^1\text{H NMR}$: δ_{H} (CDCl_3): 9,89 (s, 1H, $\text{Ar}_{\text{MP}}\text{-CHO}$), 7,68 (s, 1H, Ar-OH), 7,14 (d, $J = 11,1$ Hz, 2H, $\text{C}_{\text{Ar,MP}}(3 \text{ i } 5)\text{-H}$), 5,33 (t, $J = 7,5, 6,4$ Hz, 1H, $>\text{C}=\text{CH-}$), 5,19 (s, 2H, $\text{Ar-CH}_2\text{O-}$), 3,87 (s, 6H, $\text{Ar}_{\text{MP}}\text{-OCH}_3$), 3,76 (s, 3H, Ar-OCH_3), 3,42 (d, $J = 6,9$ Hz, 2H, $\text{Ar-CH}_2\text{-}$), 2,72 (dd, $J = 9,0, 6,9$ Hz, 2H, $\text{-CH}_2\text{-}$), 2,49 – 2,40 (m, 2H, $\text{-CH}_2\text{-}$), 2,15 (s, 3H, Ar-CH_3), 1,86 (s, 3H, -CH_3)

$^{13}\text{C NMR}$: δ_{C} (CDCl_3): 191,06 ($\text{Ar}_{\text{MP}}\text{-CHO}$), 172,92 ($\text{-COO-Ar}_{\text{MP}}$), 170,46 (-COO-), 163,66 ($\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}\text{-OMe}$), 153,59 ($\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}\text{-OH}$), 152,86 (2C, $\underline{\text{C}}_{\text{Ar,MP}}\text{-OMe}$), 144,02 ($\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}\text{-CH}_2\text{O-}$), 134,19 ($>\text{C}=\text{C}(\text{-CH}_3)\text{-}$), 133,95 ($\underline{\text{C}}_{\text{Ar,MP}}\text{-OOC-}$), 133,82 ($\underline{\text{C}}_{\text{Ar,MP}}\text{-CHO}$), 122,91 ($\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}\text{-CH}_2\text{-CH=}$), 122,07 ($>\text{C}=\text{C}(\text{-CH}_3)\text{-}$), 116,73 ($\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}\text{-CH}_3$), 106,35 ($\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}\text{-COO-}$), 106,03 (2C, $\text{C}_{\text{Ar,MP}}(3 \text{ i } 5)\text{-H}$), 70,05 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{O-}$), 61,01 ($\text{Ar-O}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 56,31 (2C, $\text{Ar}_{\text{MP}}\text{-O}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 34,46 ($\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-COO-Ar}_{\text{MP}}$), 32,58 ($\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 22,63 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-}$), 16,15 ($=\text{C}(\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_3)\text{-}$), 11,58 ($\text{Ar-}\underline{\text{C}}\text{H}_3$)

HRMS (m/z) obliczone dla $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_9$ [M-H] $^-$: 483,1655, zmierzone: 483,1742

Czystość: 100,00%; $R_{\text{T,HPLC}} = 13,452$ min

Mykofenolan waniliny, mykofenolan wanilinyłu (**MP4**)



Wydajność: 14%

Wygląd: bezbarwny olej

Eluent: eter naftowy:octan etylu, 3:1 (v/v)

$R_F = 0,28$ (dichlorometan)

$^1\text{H NMR}$: δ_{H} (CDCl_3): 9,93 (s, 1H, $\text{Ar}_{\text{MP}}\text{-CHO}$), 7,69 (s, 1H, Ar-OH), 7,47 (d, $J = 1,5$ Hz, 1H, $\text{C}_{\text{Ar,MP}}(3)\text{-H}$), 7,42 (dd, $J = 8,0, 1,6$ Hz, 1H, $\text{C}_{\text{Ar,MP}}(5 \text{ lub } 6)\text{-H}$), 7,13 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, $\text{C}_{\text{Ar,MP}}(5 \text{ lub } 6)\text{-H}$), 5,34 (t, $J = 6,7$ Hz, 1H, $>\text{C}=\text{CH-}$), 5,20 (s, 2H, $\text{Ar-CH}_2\text{O-}$), 3,87 (s, 3H, $\text{Ar}_{\text{MP}}\text{-OCH}_3$), 3,77 (s,

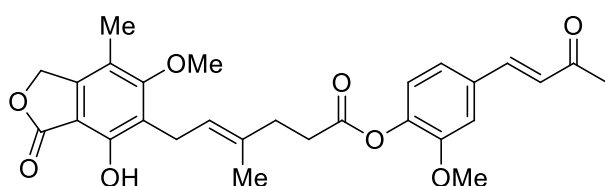
3H, Ar-OCH₃), 3,42 (d, *J* = 6,9 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 2,74 – 2,65 (m, 2H, -CH₂-), 2,45 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H, -CH₂-), 2,16 (d, *J* = 10,8 Hz, 3H, Ar-CH₃), 1,86 (s, 3H, -CH₃)

¹³C NMR: δ_C (CDCl₃): 191,06 (Ar_{MP}-CHO), 172,91 (-COO-Ar_{MP}), 170,72 (-COO-), 163,63 (C_{Ar}-OMe), 153,59 (C_{Ar}-OH), 151,92 (C_{Ar,MP}-OMe), 144,94 (C_{Ar,MP}-OOC-), 144,05 (C_{Ar}-CH₂O-), 135,06 (C_{Ar,MP}-CHO), 133,78 (>C=C(-CH₃)-), 124,62 (C_{Ar,MP}(6)-H), 123,37 (C_{Ar,MP}(5)-H), 123,08 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 122,01 (>C=C(-CH₃)-), 116,76 (C_{Ar}-CH₃), 110,75 (C_{Ar,MP}(3)-H), 106,37 (C_{Ar}-COO-), 70,06 (Ar-CH₂O-), 61,01 (Ar-OCH₃), 56,02 (Ar_{MP}-OCH₃), 34,49 (CH₂-COO-Ar_{MP}), 32,70 (-CH₂-CH₂-), 22,62 (Ar-CH₂-), 16,15 (=C(-CH₃)-), 11,58 (Ar-CH₃)

HRMS (m/z) obliczone dla C₂₅H₂₆O₈ [M-H]⁻: 453,1549, zmierzone: 453,1632

Czystość: 99,70%; R_{T,HPLC} = 13,334 min

Mykofenolan dehydrozingeronu, mykofenolan dehydrozingeronylu (**MP5**)



Wydajność: 12%

Wygląd: żółtawy proszek

Eluent: eter naftowy:octan etylu, 3:1 (v/v)

R_F = 0,10 (dichlorometan)

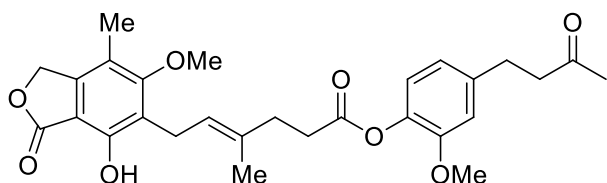
¹H NMR: δ_H (CDCl₃): 7,69 (s, 1H, Ar-OH), 7,45 (d, *J* = 16,2 Hz, 1H, Ar_{MP}-CH=), 7,09 (d, *J* = 7,3 Hz, 2H, C_{Ar,MP}-H), 6,98 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, C_{Ar,MP}-H), 6,65 (d, *J* = 16,2 Hz, 1H, >C=CH- (MP)), 5,33 (t, *J* = 6,9 Hz, 1H, >C=CH-), 5,20 (s, 2H, Ar-CH₂O-), 3,83 (s, 3H, Ar_{MP}-OCH₃), 3,76 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,42 (d, *J* = 6,9 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 2,73 – 2,63 (m, 2H, -CH₂-), 2,44 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H, -CH₂-), 2,38 (s, 3H, -(C=O)-CH₃ (MP)), 2,15 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,86 (s, 3H, -CH₃)

¹³C NMR: δ_C (CDCl₃): 198,26 (-CH=CH-(C=O)-CH₃ (MP)), 172,91 (-COO-Ar_{MP}), 171,08 (-COO), 163,65 (C_{Ar}-OMe), 153,58 (C_{Ar}-OH), 151,43 (C_{Ar,MP}-OMe), 144,03 (C_{Ar}-CH₂O-), 142,72 (C_{Ar,MP}-CH=CH-), 141,62 (C_{Ar,MP}-OOC-), 133,86 (>C=C(-CH₃)-), 133,20 (C_{Ar,MP}-CH=CH-), 127,21 (C_{Ar,MP}-CH=CH-), 123,29 (C_{Ar,MP}(6)-H), 123,01 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 122,04 (>C=C(-CH₃)-), 121,42 (C_{Ar,MP}(5)-H), 116,75 (C_{Ar}-CH₃), 111,15 (C_{Ar,MP}(3)-H), 106,35 (C_{Ar}-COO-), 70,06 (Ar-CH₂O-), 61,01 (Ar-OCH₃), 55,86 (Ar_{MP}-OCH₃), 34,52 (-CH₂-COO-Ar_{MP}), 32,71 (-CH₂-CH₂-), 27,53 (-CH₂-(C=O)-CH₃ (MP)), 22,62 (Ar-CH₂-), 16,16 (=C(-CH₃)-), 11,58 (Ar-CH₃)

HRMS (m/z) obliczone dla C₂₈H₃₀O₈ [M-H]⁻: 493,1862, zmierzone: 493,1951

Czystość: 98,50%; R_{T,HPLC} = 14,068 min

Mykofenolan zingeronu, mykofenolan zingeronylu (MP6)



Wydajność: 19%

Wygląd: bezbarwny olej

Eluent: eter naftowy:octan etylu, 3:1 (v/v)

R_F = 0,10 (dichlorometan)

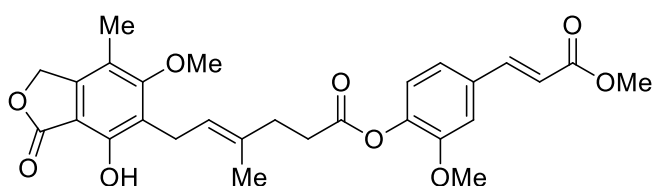
¹H NMR: δ_H (CDCl₃): 7,68 (s, 1H, Ar-OH), 6,82 (d, J = 8,0 Hz, 1H, C_{Ar,MP}-H), 6,76 (d, J = 1,6 Hz, 1H, C_{Ar,MP}-H), 6,68 (dd, J = 8,1, 1,7 Hz, 1H, C_{Ar,MP}-H), 5,32 (t, J = 6,5 Hz, 1H, >C=CH-), 5,20 (s, 2H, Ar-CH₂O-), 3,77 (d, J = 6,4 Hz, 6H, Ar-OCH₃ i Ar_{MP}-OCH₃), 3,42 (d, J = 6,9 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 2,86 (t, J = 7,5 Hz, 2H, Ar_{MP}-CH₂-), 2,75 (t, J = 7,5 Hz, 2H, -CH₂-C(=O)- (MP)), 2,69 – 2,61 (m, 2H, -CH₂-), 2,43 (t, J = 7,7 Hz, 2H, -CH₂-), 2,16 (d, J = 11,9 Hz, 6H, Ar-CH₃ i -(C=O)-CH₃ (MP)), 1,85 (s, 3H, -CH₃)

¹³C NMR: δ_C (CDCl₃): 207,79 (-CH₂-C(=O)-CH₃ (MP)), 172,92 (-COO-Ar_{MP}), 171,53 (-COO-), 163,66 (C_{Ar}-OMe), 153,59 (C_{Ar}-OH), 150,83 (C_{Ar,MP}-OMe), 144,01 (C_{Ar}-CH₂O-), 139,89 (C_{Ar,MP}-OOC-), 137,91 (C_{Ar,MP}-CH₂-CH₂-), 134,02 (>C=C(-CH₃)-), 122,89 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 122,57 (C_{Ar,MP}(6)-H), 122,10 (>C=C(-CH₃)-), 120,20 (C_{Ar,MP}(5)-H), 116,74 (C_{Ar}-CH₃), 112,58 (C_{Ar,MP}(3)-H), 106,34 (C_{Ar}-COO-), 70,06 (Ar-CH₂O-), 61,01 (Ar-OCH₃), 55,77 (Ar_{MP}-OCH₃), 45,12 (-CH₂-(C=O)-CH₃ (MP)), 34,59 (-CH₂-COO-Ar_{MP}), 32,74 (-CH₂-CH₂-), 30,13 (-CH₂-(C=O)-CH₃ (MP)), 29,54 (Ar_{MP}-CH₂-CH₂-(C=O)-), 22,61 (Ar-CH₂-), 16,16 (=C(-CH₃)-), 11,58 (Ar-CH₃)

HRMS (m/z) obliczone dla C₂₈H₃₂O₈ [M-H]⁻: 495,2019, zmierzone: 495,2118

Czystość: 97,70%; R_{T,HPLC} = 14,332 min

Mykofenolan (ferulanu metylu) (MP7)



Wydajność: 14%

Wygląd: żółtawy proszek

Eluent: dichlorometan

R_F = 0,15 (dichlorometan)

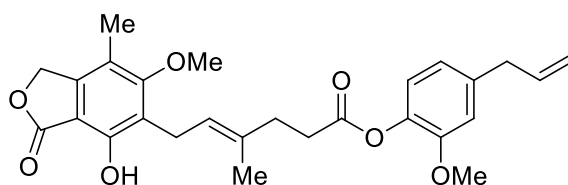
¹H NMR: δ_H (CDCl₃): 7,69 (s, 1H, Ar-OH), 7,63 (d, J = 16,0 Hz, 1H, Ar_{MP}-CH=), 7,06 (d, J = 5,7 Hz, 2H, C_{Ar,MP}-H), 6,95 (d, J = 8,6 Hz, 1H, C_{Ar,MP}-H), 6,37 (d, J = 16,0 Hz, 1H, >C=CH- (MP)), 5,33 (t, J = 6,8 Hz, 1H, >C=CH-), 5,20 (s, 2H, Ar-CH₂O-), 3,81 (d, J = 9,4 Hz, 6H, Ar-OCH₃ i Ar_{MP}-OCH₃), 3,76 (s, 3H, -COOCH₃ (MP)), 3,42 (d, J = 6,9 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 2,68 (t, J = 7,7 Hz, 2H, -CH₂-), 2,44 (t, J = 7,7 Hz, 2H, -CH₂-), 2,14 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,86 (s, 3H, -CH₃)

¹³C NMR: δ_C (CDCl₃): 172,91 ($-\text{COO}-\text{Ar}_{\text{MP}}$), 171,11 ($-\text{COO}-$), 167,26 ($-\text{COOCH}_3$ (MP)), 163,64 ($\text{C}_{\text{Ar}}-\text{OMe}$), 153,59 ($\text{C}_{\text{Ar}}-\text{OH}$), 151,35 ($\text{C}_{\text{Ar,MP}}-\text{OMe}$), 144,15 ($\text{Ar}_{\text{MP}}-\text{CH}=\text{CH}-$), 144,02 ($\text{C}_{\text{Ar}}-\text{CH}_2\text{O}-$), 141,42 ($\text{C}_{\text{Ar,MP}}-\text{OOC}-$), 133,88 ($>\text{C}=\text{C}(-\text{CH}_3)-$), 133,16 ($\text{C}_{\text{Ar,MP}}-\text{CH}=\text{CH}-$), 123,21 ($\text{C}_{\text{Ar,MP}}(6)-\text{H}$), 122,99 ($\text{C}_{\text{Ar}}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 122,05 ($>\text{C}=\text{C}(-\text{CH}_3)-$), 121,10 ($\text{C}_{\text{Ar,MP}}(5)-\text{H}$), 117,90 ($\text{Ar}_{\text{MP}}-\text{CH}=\text{CH}-$), 116,74 ($\text{C}_{\text{Ar}}-\text{CH}_3$), 111,15 ($\text{C}_{\text{Ar,MP}}(3)-\text{H}$), 106,35 ($\text{C}_{\text{Ar}}-\text{COO}-$), 70,05 ($\text{Ar}-\text{CH}_2\text{O}-$), 61,01 ($\text{Ar}-\text{OCH}_3$), 55,84 ($\text{Ar}_{\text{MP}}-\text{OCH}_3$), 51,76 ($-\text{COOCH}_3$ (MP)), 34,53 ($-\text{CH}_2-\text{COO}-\text{Ar}_{\text{MP}}$), 32,72 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 22,62 ($\text{Ar}-\text{CH}_2-$), 16,16 ($=\text{C}(-\text{CH}_3)-$), 11,58 ($\text{Ar}-\text{CH}_3$)

HRMS (m/z) obliczone dla C₂₈H₃₀O₉ [M—H][–]: 509,1811, zmierzone: 509,1908

Czystość: 100,00%; R_{T,HPLC} = 15,660 min

Mykofenolan eugenolu, mykofenolan eugenylu (**MP8**)



Wydajność: 30%

Wygląd: białe, gęste ciało stałe

Eluent: dichlorometan

R_F = 0,30 (dichlorometan)

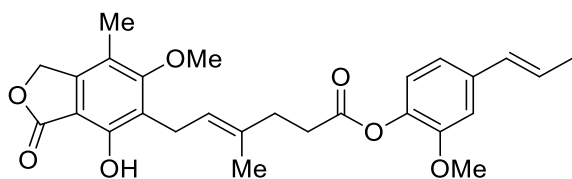
¹H NMR: δ_H (CDCl₃): 7,71 (s, 1H, Ar-OH), 6,85 (d, J = 8,0 Hz, 1H, C_{Ar,MP}-H), 6,78 (s, 1H, C_{Ar,MP}-H), 6,71 (t, J = 8,6 Hz, 1H, C_{Ar,MP}-H), 5,97 (ddt, J = 16,8, 10,1, 6,7 Hz, 1H, $-\text{CH}=\text{C}<$ (MP)), 5,35 (t, J = 6,8 Hz, 1H, $>\text{C}=\text{CH}-$), 5,22 (s, 2H, Ar-CH₂O-), 5,11 (dd, J = 13,3, 6,3 Hz, 2H, $>\text{C}=\text{CH}_2$ (MP)), 3,80 (t, J = 6,6 Hz, 6H, Ar-OCH₃ i Ar_{MP}-OCH₃), 3,44 (d, J = 6,9 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 3,38 (d, J = 6,7 Hz, 2H, Ar_{MP}-CH₂-), 2,73 – 2,64 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$), 2,46 (t, J = 7,7 Hz, 2H, $-\text{CH}_2-$), 2,17 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,88 (s, 3H, $-\text{CH}_3$)

¹³C NMR: δ_C (CDCl₃): 172,92 ($-\text{COO}-\text{Ar}_{\text{MP}}$), 171,52 ($-\text{COO}-$), 163,67 ($\text{C}_{\text{Ar}}-\text{OMe}$), 153,60 ($\text{C}_{\text{Ar}}-\text{OH}$), 150,82 ($\text{C}_{\text{Ar,MP}}-\text{OMe}$), 144,00 ($\text{C}_{\text{Ar}}-\text{CH}_2\text{O}-$), 138,83 ($\text{C}_{\text{Ar,MP}}-\text{OOC}-$), 137,90 ($\text{C}_{\text{Ar,MP}}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 137,04 ($\text{Ar}_{\text{MP}}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 134,04 ($>\text{C}=\text{C}(-\text{CH}_3)-$), 122,90 ($\text{C}_{\text{Ar}}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 122,46 ($\text{C}_{\text{Ar,MP}}(6)-\text{H}$), 122,10 ($>\text{C}=\text{C}(-\text{CH}_3)-$), 120,52 ($\text{C}_{\text{Ar,MP}}(5)-\text{H}$), 116,74 ($\text{C}_{\text{Ar}}-\text{CH}_3$), 116,12 ($\text{Ar}_{\text{MP}}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 112,63 ($\text{C}_{\text{Ar,MP}}(3)-\text{H}$), 106,34 ($\text{C}_{\text{Ar}}-\text{COO}-$), 70,05 ($\text{Ar}-\text{CH}_2\text{O}-$), 61,01 ($\text{Ar}-\text{OCH}_3$), 55,75 ($\text{Ar}_{\text{MP}}-\text{OCH}_3$), 40,07 ($\text{Ar}_{\text{MP}}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 34,61 ($-\text{CH}_2-\text{COO}-\text{Ar}_{\text{MP}}$), 32,76 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 22,62 ($\text{Ar}-\text{CH}_2-$), 16,17 ($=\text{C}(-\text{CH}_3)-$), 11,58 ($\text{Ar}-\text{CH}_3$)

HRMS (m/z) obliczone dla C₂₇H₃₀O₇ [M—H][–]: 465,1913, zmierzone: 465,1994

Czystość: 100,00%; R_{T,HPLC} = 16,843 min

Mykofenolan izoeugenolu, mykofenolan izoeugenylu (**MP9**)



Wydajność: 18%

Wygląd: bezbarwny olej

Eluent: dichlorometan

R_F = 0,37 (dichlorometan)

¹H NMR: δ_H (CDCl₃): 7,68 (s, 1H, Ar-OH), 6,88 (d, J = 6,0 Hz, 1H, C_{Ar,MP}(3)-H), 6,85 – 6,80 (m, 2H, C_{Ar,MP}(5 lub 6)-H), 6,40 – 6,30 (m, 1H, Ar_{MP}-CH=C<), 6,17 (dq, J = 13,3, 6,6 Hz, 1H, >C=CH-(MP)), 5,33 (t, J = 6,8 Hz, 1H, >C=CH-), 5,20 (s, 2H, Ar-CH₂O-), 3,78 (d, J = 17,8 Hz, 6H, Ar-OCH₃ i Ar_{MP}-OCH₃), 3,42 (d, J = 6,9 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 2,67 (dd, J = 14,9, 7,6 Hz, 2H, -CH₂-), 2,44 (t, J = 7,7 Hz, 2H, -CH₂-), 2,14 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,91 – 1,83 (m, 6H, -CH₃ i -CH₃ (MP))

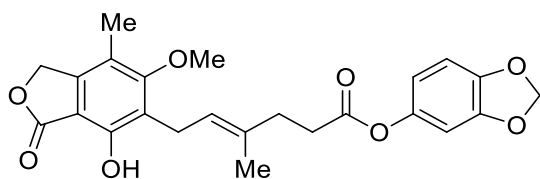
¹³C NMR: δ_C (CDCl₃): 172,92 (-COO-Ar_{MP}), 171,46 (-COO-), 163,67 (C_{Ar}-OMe), 153,59 (C_{Ar}-OH), 150,93 (C_{Ar,MP}-OMe), 144,00 (C_{Ar}-CH₂O-), 138,51 (C_{Ar,MP}-OOC-), 136,88 (C_{Ar,MP}-CH=CH-CH₃), 134,01 (>C=C(-CH₃)-), 130,41 (Ar_{MP}-CH=CH-CH₃), 126,00 (Ar_{MP}-CH=CH-CH₃), 122,92 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 122,60 (C_{Ar,MP}(6)-H), 122,09 (>C=C(-CH₃)-), 118,22 (C_{Ar,MP}(5)-H), 116,73 (C_{Ar}-CH₃), 109,50 (C_{Ar,MP}(3)-H), 106,33 (C_{Ar}-COO-), 70,05 (Ar-CH₂O-), 61,01 (Ar-OCH₃), 55,73 (Ar_{MP}-OCH₃), 34,61 (-CH₂-COO-Ar_{MP}), 32,76 (-CH₂-CH₂-), 22,62 (Ar-CH₂-), 18,43 (Ar_{MP}-CH=CH-CH₃), 16,16 (=C(-CH₃)-), 11,58 (Ar-CH₃)

HRMS (m/z) obliczone dla C₂₇H₃₀O₇ [M-H]⁻: 465,1913, zmierzone: 465,2001

Czystość: 99,60%; R_{T,HPLC} = 17,097 min

Zestawienie pochodnych fenoli (P1-P7)

Mykofenolan sezamolu, mykofenolan sezamylu (**P1**)



Wydajność: 40%

Wygląd: biały osad

Eluent: dichlorometan

R_F = 0,31 (dichlorometan)

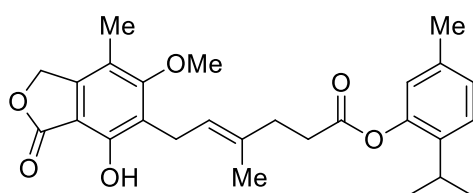
¹H NMR: δ_H (CDCl₃): 7,71 (s, 1H, Ar-OH), 6,73 (d, J = 8,3 Hz, 1H, C_{Ar,P}(3)-H), 6,47 – 6,39 (m, 2H, C_{Ar,P}(3)-H), 5,98 (s, 2H, -O-CH₂O- (P)), 5,35 (t, J = 6,8 Hz, 1H, >C=CH-), 5,22 (s, 2H, Ar-CH₂O-), 3,78 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,44 (d, J = 6,9 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 2,64 (t, J = 7,4 Hz, 2H, -CH₂-), 2,45 (t, J = 7,4 Hz, 2H, -CH₂-), 2,17 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,88 (s, 3H, -CH₃)

¹³C NMR: δ_C (CDCl₃): 172,89 (-COO-Ar_P), 172,08 (-COO-), 163,62 (C_{Ar}-OMe), 153,54 (C_{Ar}-OH), 147,82 (C_{Ar,P}-OOC-), 145,19 (C_{Ar,P}(4)-H), 144,95 (C_{Ar,P}(3)-H), 144,09 (C_{Ar}-CH₂O-), 133,75 (>C=C(-CH₃)-), 123,17 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 121,97 (>C=C(-CH₃)-), 116,74 (C_{Ar}-CH₃), 113,79 (C_{Ar,P}(6)-H), 107,83 (C_{Ar,P}(5)-H), 106,37 (C_{Ar}-COO-), 103,68 (C_{Ar,P}(2)-H), 101,63 (-O-CH₂-O- (P)), 70,05 (Ar-CH₂O-), 61,00 (Ar-OCH₃), 34,66 (-CH₂-COO-Ar_P), 32,90 (-CH₂-CH₂-), 22,60 (Ar-CH₂-), 16,16 (=C(-CH₃)-), 11,57 (Ar-CH₃)

HRMS (m/z) obliczone dla C₂₄H₂₄O₈ [M-H]⁻: 439,1393, zmierzone: 439,1473

Czystość: 99,30%; R_{T,HPLC} = 14,063 min

Mykofenolan tymolu, mykofenolan tymylu (**P2**)



Wydajność: 30%

Wygląd: bezbarwny olej

Eluent: toluen:chloroform, 3:1 (v/v)

R_F = 0,33 (dichlorometan)

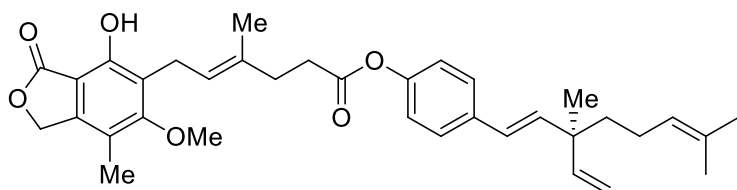
¹H NMR: δ_H (CDCl₃): 7,69 (s, 1H, Ar-OH), 7,17 (d, J = 7,9 Hz, 1H, C_{Ar,P}(3)-H), 7,01 (t, J = 8,3 Hz, 1H, C_{Ar,P}(3)-H), 6,73 (s, 1H, C_{Ar,P}(3)-H), 5,34 (dd, J = 7,0, 6,0 Hz, 1H, >C=CH-), 5,20 (s, 2H, Ar-CH₂O-), 3,77 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,43 (d, J = 6,9 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 2,93 (hept, J = 6,9 Hz, 1H, -CH< (P)), 2,72 – 2,63 (m, 2H, -CH₂-), 2,46 (t, J = 7,7 Hz, 2H, -CH₂-), 2,28 (s, 3H, Ar_P-CH₃), 2,15 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,87 (s, 3H, -CH₃), 1,16 (d, J = 6,9 Hz, 6H, >C(CH₃)₂ (P))

¹³C NMR: δ_C (CDCl₃): 172,91 (-COO-Ar_P), 172,04 (-COO-), 163,67 (C_{Ar}-OMe), 153,62 (C_{Ar}-OH), 147,85 (C_{Ar,P}-OOC-), 144,03 (C_{Ar}-CH₂O-), 136,95 (C_{Ar,P}(2)-H), 136,45 (C_{Ar,P}(5)-H), 133,95 (>C=C(-CH₃)-), 127,02 (C_{Ar,P}(3)-H), 126,32 (C_{Ar,P}(4)-H), 122,93 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 122,66 (C_{Ar,P}(6)-H), 122,01 (>C=C(-CH₃)-), 116,73 (C_{Ar}-CH₃), 106,37 (C_{Ar}-COO-), 70,05 (Ar-CH₂O-), 61,01 (Ar-OCH₃), 34,63 (-CH₂-COO-Ar_P), 33,01 (-CH₂-CH₂-), 27,01 (Ar_P-CH(CH₃)₂), 23,00 (2C, Ar_P-CH(CH₃)₂), 22,63 (Ar-CH₂-), 20,79 (Ar_P-CH₃), 16,22 (=C(-CH₃)-), 11,58 (Ar-CH₃)

HRMS (m/z) obliczone dla C₂₇H₃₂O₆ [M-H]⁻: 451,2121, zmierzone: 451,2208

Czystość: 100,00%; R_{T,HPLC} = 18,736 min

Mykofenolan bakuchiolu (P3)



Wydajność: 33%

Wygląd: żółty olej

Eluent: toluene:chloroform, 1:1 (v/v)

R_F = 0,50 (dichlorometan)

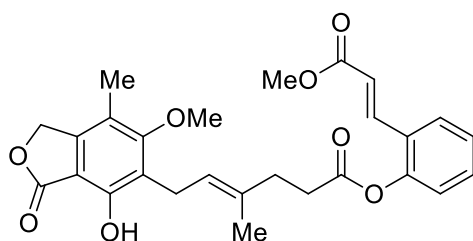
¹H NMR: δ_H (CDCl₃): 7,69 (s, 1H, Ar-OH), 7,29 (d, J = 8,6 Hz, 2H, C_{Ar,P}(3 i 5)-H), 6,91 (d, J = 8,6 Hz, 2H, C_{Ar,P}(2 i 6)-H), 6,28 (d, J = 16,2 Hz, 1H, Ar_P-C(1')H=), 6,14 (d, J = 16,2 Hz, 1H, >C(1')=C(2')H-), 5,87 (dd, J = 17,5, 10,7 Hz, 1H, >C(3')-CH=), 5,34 (dd, J = 7,0, 5,9 Hz, 1H, >C=CH-), 5,19 (s, 2H, Ar-CH₂O-), 5,10 (t, J = 7,1 Hz, 1H, -C(6')H=), 5,03 (ddd, J = 18,7, 14,1, 1,2 Hz, 2H, >C(3')-CH=CH₂), 3,75 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,42 (d, J = 6,9 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 2,64 (t, J = 7,6 Hz, 2H, -CH₂-), 2,43 (t, J = 7,5 Hz, 2H, -CH₂-), 2,14 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,94 (dd, J = 16,4, 7,6 Hz, 2H, -C(5')H₂-), 1,86 (s, 3H, -CH₃), 1,67 (s, 3H, =C(7')-CH₃), 1,57 (s, 3H, =C(7')-CH₃), 1,49 (ddd, J = 21,7, 9,9, 6,2 Hz, 2H, -C(4')H₂-), 1,20 (s, 3H, >C(3')-CH₃)

¹³C NMR: δ_C (CDCl₃): 172,90 (-COO-Ar_P), 171,81 (-COO-), 163,63 (C_{Ar}-OMe), 153,59 (C_{Ar}-OH), 149,54 (C_{Ar,P}-OOC-), 145,62 (C(3')-CH=CH₂), 144,01 (C_{Ar}-CH₂O-), 138,11 (C_{Ar,P}-CH=CH-R), 135,50 (C_{Ar,P}-CH=CH-R), 133,81 (>C=C(-CH₃)-), 131,38 (C(7')), 126,82 (2C, C_{Ar,P}(3 i 5)-H), 126,23 (C_{Ar,P}-CH=CH-R), 124,66 (C(6')), 123,11 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 122,01 (>C=C(-CH₃)-), 121,45 (2C, C_{Ar,P}(2 i 6)-H), 116,72 (C_{Ar}-CH₃), 112,12 (C(3')-CH=CH₂), 106,34 (C_{Ar}-COO-), 70,03 (Ar-CH₂O-), 61,00 (Ar-OCH₃), 42,63 (C(4')), 41,18 (C(3')), 34,65 (-CH₂-COO-Ar_P), 33,08 (-CH₂-CH₂-), 25,70 (C(3')-CH₃), 23,24 (C(7')-(CH₃)₂), 23,20 (C(5')), 22,62 (Ar-CH₂-), 17,65 (C(7')-(CH₃)₂), 16,17 (=C(-CH₃)-), 11,57 (Ar-CH₃)

HRMS (m/z) obliczone dla C₃₅H₄₂O₆ [M-H]⁻: 557,2903, zmierzone: 557,3008

Czystość: 97,20%; R_{T,HPLC} = 22,579 min

Mykofenolan (o-kumaranu metylu) (P4)



Wydajność: 24%

Wygląd: niskotopliwe, opalizujące, białe ciało stałe

Eluent: dichlorometan

R_F = 0,25 (dichlorometan)

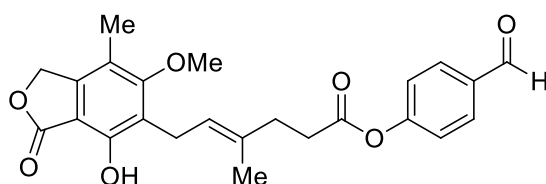
¹H NMR: δ_H (CDCl₃): δ 7,74 (d, J = 16,1 Hz, 1H, Ar-CH=C< (P)), 7,70 (s, 1H, Ar-OH), 7,63 (d, J = 7,8 Hz, 1H, C_{Ar,P}(3)-H), 7,36 (t, J = 7,7 Hz, 1H, C_{Ar,P}(5)-H), 7,26 (t, J = 7,6 Hz, 1H, C_{Ar,P}(4)-H), 7,04 (d, J = 8,1 Hz, 1H, C_{Ar,P}(6)-H), 6,44 (d, J = 16,1 Hz, 1H, >C=CH- (P)), 5,37 (t, J = 6,5 Hz, 1H, >C=CH-), 5,22 (s, 2H, Ar-CH₂O-), 3,80 (d, J = 14,5 Hz, 6H, -COOCH₃ (P) i Ar-OCH₃), 3,45 (d, J = 6,9 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 2,76 (t, J = 7,7 Hz, 2H, -CH₂-), 2,50 (t, J = 7,6 Hz, 2H, -CH₂-), 2,17 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,90 (s, 3H, -CH₃)

¹³C NMR: δ_C (CDCl₃): 172,88 (-COO-Ar_P), 171,48 (-COO-), 167,08 (-COOCH₃ (P)), 163,63 (C_{Ar}-OMe), 153,59 (C_{Ar}-OH), 149,28 (C_{Ar,P}-OOC-), 144,02 (C_{Ar}-CH₂O-), 138,14 (Ar_P-CH=CH-), 133,65 (>C=C(-CH₃)-), 131,00 (C_{Ar,P}(5)-H), 127,46 (C_{Ar,P}(3)-H), 126,99 (C_{Ar,P}-CH=CH-), 126,19 (C_{Ar,P}(4)-H), 123,23 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 123,05 (C_{Ar,P}(6)-H), 121,99 (>C=C(-CH₃)-), 119,74 (Ar_P-CH=CH-), 116,72 (C_{Ar}-CH₃), 106,35 (C_{Ar}-COO-), 70,03 (Ar-CH₂O-), 61,00 (Ar-OCH₃), 51,78 (-COOCH₃ (P)), 34,54 (-CH₂-COO-Ar_P), 32,92 (-CH₂-CH₂-), 22,60 (Ar-CH₂-), 16,18 (=C(-CH₃)-), 11,57 (Ar-CH₃)

HRMS (m/z) obliczone dla C₂₇H₂₈O₈ [M-H]⁻: 479,1706, zmierzone: 479,1799

Czystość: 98,50%; R_{T,HPLC} = 15,151 min

Mykofenolan 4-hydroksybenzaldehydu (P5)



Wydajność: 42%

Wygląd: żółty olej

Eluent: eter naftowy:octan etylu, 3:1 (v/v)

R_F = 0,34 (dichlorometan)

¹H NMR: δ_H (CDCl₃): 9,97 (s, 1H, Ar-CHO (P)), 7,84 (d, J = 8,5 Hz, 2H, C_{Ar,P}(3 i 5)-H), 7,72 (brs, 1H, Ar-OH), 7,16 (d, J = 8,5 Hz, 2H, C_{Ar,P}(2 i 6)-H), 5,35 (t, J = 6,7 Hz, 1H, >C=CH-), 5,20 (s, 2H, Ar-CH₂O-), 3,75 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,42 (d, J = 6,9 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 2,69 (t, J = 7,5 Hz, 2H, -CH₂-), 2,45 (t, J = 7,5 Hz, 2H, -CH₂-), 2,14 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,87 (s, 3H, -CH₃)

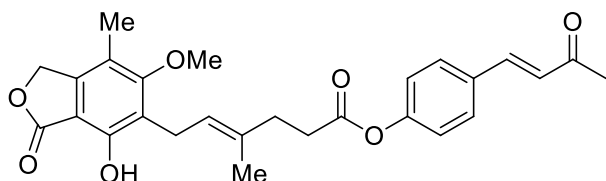


¹³C NMR: δ_C (CDCl₃): 190,93 (Ar_P-CHO), 172,88 (-COO-Ar_P), 171,07 (-COO-), 163,59 (C_{Ar}-OMe), 155,38 (C_{Ar,P}-OOC-), 153,57 (C_{Ar}-OH), 144,09 (C_{Ar}-CH₂O-), 133,81 (>C=C(-CH₃)-), 133,58 (C_{Ar,P}-CHO), 131,06 (2C, C_{Ar,P}(3 i 5)-H), 123,30 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 122,28 (2C, C_{Ar,P}(2 i 6)-H), 121,90 (>C=C(-CH₃)-), 116,77 (C_{Ar}-CH₃), 106,37 (C_{Ar}-COO-), 70,06 (Ar-CH₂O-), 60,99 (Ar-OCH₃), 34,57 (-CH₂-COO-Ar_P), 33,04 (-CH₂-CH₂-), 22,63 (Ar-CH₂-), 16,13 (=C(-CH₃)-), 11,58 (Ar-CH₃)

HRMS (m/z) obliczone dla C₂₄H₂₄O₇ [M-H]⁻: 423,1444, zmierzone: 423,1524

Czystość: 97,80%; R_{T,HPLC} = 13,015 min

Mykofenolan dehydroframbinonu, mykofenolan dehydroframbinonylu (**P6**)



Wydajność: 55%

Wygląd: żółtawy proszek

Eluent: eter naftowy:octan etylu, 3:1 (v/v)

R_F = 0,19 (dichlorometan)

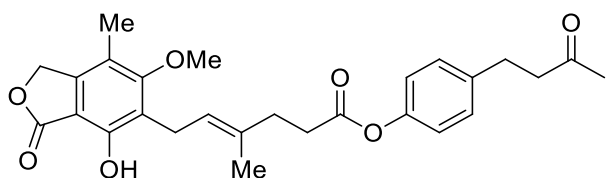
¹H NMR: δ_H (CDCl₃): 7,68 (s, 1H, Ar-OH), 7,53 – 7,44 (m, 3H, C_{Ar,P}(3 i 5)-H i Ar-CH=C< (P)), 7,07 – 7,02 (m, 2H, C_{Ar,P}(2 i 6)-H), 6,66 (d, *J* = 16,2 Hz, 1H, -CH=C< (P)), 5,33 (td, *J* = 6,9, 1,2 Hz, 1H, >C=CH-), 5,19 (s, 2H, Ar-CH₂O-), 3,76 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,42 (d, *J* = 6,9 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 2,66 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H, -CH₂-), 2,44 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H, -CH₂-), 2,38 (s, 3H, -(C=O)-CH₃ (P)), 2,14 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,86 (s, 3H, -CH₃)

¹³C NMR: δ_C (CDCl₃): 198,26 (-CH=CH-(C=O)-CH₃ (P)), 172,90 (-COO-Ar_P), 171,44 (-COO-), 163,61 (C_{Ar}-OMe), 153,57 (C_{Ar}-OH), 152,29 (C_{Ar,P}-OOC-), 144,03 (C_{Ar}-CH₂O-), 142,26 (C_{Ar,P}-CH=CH-), 133,69 (>C=C(-CH₃)-), 131,95 (C_{Ar,P}-CH=CH-), 129,27 (2C, C_{Ar,P}(3 i 5)-H), 127,11 (C_{Ar,P}-CH=CH-), 123,19 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 122,16 (2C, C_{Ar,P}(2 i 6)-H), 121,96 (>C=C(-CH₃)-), 116,75 (C_{Ar}-CH₃), 106,35 (C_{Ar}-COO-), 70,05 (Ar-CH₂O-), 61,00 (Ar-OCH₃), 34,56 (-CH₂-COO-Ar_P), 33,05 (-CH₂-CH₂-), 27,63 (=CH-(C=O)-CH₃ (P)), 22,62 (Ar-CH₂-), 16,17 (=C(-CH₃)-), 11,59 (Ar-CH₃)

HRMS (m/z) obliczone dla C₂₇H₂₈O₇ [M-H]⁻: 463,1757, zmierzone: 463,1759

Czystość: 99,80%; R_{T,HPLC} = 14,021 min

Mykofenolan ketonu malinowego, mykofenolan frambinonu, mykofenolan frambinonylu (**P7**)



Wydajność: 53%

Wygląd: żółtawe, gęste ciało stałe

Eluent: toluen:chloroform, 1:1 (v/v)

R_F = 0,28 (dichlorometan)

¹H NMR: δ_H (CDCl₃): 7,68 (s, 1H, Ar-OH), 7,12 (d, J = 8,4 Hz, 2H, C_{Ar,P}(3 i 5)-H), 6,88 (d, J = 8,4 Hz, 2H, C_{Ar,P}(2 i 6)-H), 5,33 (t, J = 6,6 Hz, 1H, >C=CH-), 5,20 (s, 2H, Ar-CH₂O-), 3,75 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,42 (d, J = 6,9 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 2,86 (t, J = 7,5 Hz, 2H, -CH₂- (P)), 2,74 (t, J = 7,5 Hz, 2H, -CH₂- (P)), 2,63 (t, J = 7,5 Hz, 2H, -CH₂-), 2,43 (t, J = 7,5 Hz, 2H, -CH₂-), 2,14 (d, J = 2,5 Hz, 6H, Ar-CH₃ i -(C=O)-CH₃ (P)), 1,86 (s, 3H, -CH₃)

¹³C NMR: δ_C (CDCl₃): 207,76 (-CH₂-(C=O)-CH₃ (P)), 172,90 (-COO-Ar_P), 171,91 (-COO-), 163,64 (C_{Ar}-OMe), 153,58 (C_{Ar}-OH), 148,91 (C_{Ar,P}-OOC-), 144,03 (C_{Ar}-CH₂O-), 138,44 (C_{Ar,P}-CH₂-CH₂-), 133,82 (>C=C(-CH₃)-), 129,16 (2C, C_{Ar,P}(3 i 5)-H), 123,08 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 122,02 (>C=C(-CH₃)-), 121,45 (2C, C_{Ar,P}(2 i 6)-H), 116,76 (C_{Ar}-CH₃), 106,34 (C_{Ar}-COO-), 70,06 (Ar-CH₂O-), 61,00 (Ar-OCH₃), 45,05 (-CH₂-(C=O)-CH₃ (P)), 34,62 (-CH₂-COO-Ar_P), 33,04 (-CH₂-CH₂-), 30,10 (-CH₂-(C=O)-CH₃ (P)), 28,97 (Ar_P-CH₂-CH₂-(C=O)-), 22,61 (Ar-CH₂-), 16,17 (=C(-CH₃)-), 11,58 (Ar-CH₃)

HRMS (m/z) obliczone dla C₂₇H₃₀O₇ [M-H]⁻: 465,1913, zmierzone: 465,2003

Czystość: 98,90%; R_{T,HPLC} = 14,148 min

Inne procedury

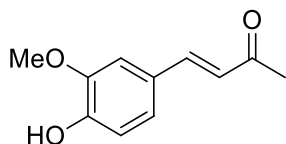
Produkty kondensacji aldehydów z acetonem

Metoda ogólna

1,25 g waniliny (8,200 mmol, 1,0 eq) rozpuszczono w 50 mL acetonu, w kolbie okrągłodennej. Układ osłonięto przed dostępem światła, schłodzono do 0°C przy pomocy łaźni lodowej i następnie wkroplono roztwór 3,5 g wodorotlenku sodu (87,500 mmol, 10,7 eq) w 31,5 g wody destylowanej (c = 10%). Roztwór mieszano przez noc (około 15 godzin) w temperaturze pokojowej, pozwoliwszy w międzyczasie na stopienie się lodu w mieszaninie chłodzącej kolbę. Po tym czasie, nadmiar acetonu odgoniono, a surową mieszaninę ekstrahowano wobec wody, 1 M kwasu solnego i octanu etylu. Warstwę organiczną wysuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu, środek suszący odsączono, zaś przesącz zatężono na próżniowym, rotacyjnym aparacie wyparnym. Surowy produkt krystalizowano z 96% etanolu (1,469 g związku na 5 mL rozpuszczalnika). Produkt otrzymano jako żółte ciało stałe z wydajnością 53% (0,832 g). Jego czystość i strukturę potwierdzono przy pomocy techniki ¹H NMR. Możliwe jest dodatkowe oczyszczenie związku z wykorzystaniem kolumny chromatograficznej.

Zestawienie właściwości dehydrozingeronu

(E)-4-(4-hydroksy-3-metoksyfenylo)but-3-en-2-on



Wydajność: 53%

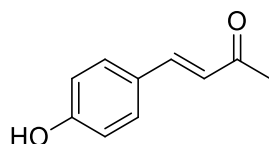
Wygląd: żółte ciało stałe

R_F = 0,77 (toluen:aceton, 1:1, v/v)

¹H NMR: δ_H (CDCl₃): 7,47 (d, J = 16,2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-), 7,11 (dd, J = 8,2, 1,6 Hz, 1H, C_{Ar}-H), 7,08 (d, J = 1,5 Hz, 1H, C_{Ar}-H), 6,95 (d, J = 8,1 Hz, 1H, C_{Ar}-H), 6,61 (d, J = 16,2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-), 6,04 (bs, 1H, Ar-OH), 3,95 (s, 3H, ArOCH₃), 2,39 (s, 3H, -C(=O)CH₃)

Zestawienie właściwości dehydroframbinonu

(E)-4-(4-hydroksyfenilo)but-3-en-2-on



Wydajność: 68%

Wygląd: żółte ciało stałe

Eluent: eter naftowy:octan etylu, 3:1 (v/v)

R_F = 0,45 (eter naftowy:octan etylu, 2:1, v/v)

¹H NMR: δ_H (CDCl₃): δ_H (CDCl₃): 7,51 (d, J = 16,2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-), 7,45 (d, J = 8,6 Hz, 2H, C_{Ar}(3, 5)-H), 7,00 (bs, 1H, Ar-OH), 6,91 (t, J = 5,6 Hz, 2H, C_{Ar}(2, 6)-H), 6,61 (d, J = 16,2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-), 2,39 (s, 3H, -C(=O)CH₃)

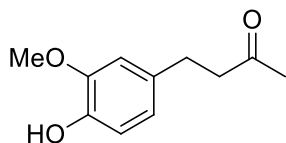
Selektywna redukcja wiązania podwójnego

Metoda

0,192 g dehydrozingeronu (1,000 mmol, 1,0 eq) rozpuszczono w 12 mL bezwodnego metanolu, w kolbie okrągłodennej. Następnie, do roztworu dodano 2,370 g sześciowodnego chlorku niklu(II) (10,00 mmol, 10,0 eq) i 2 mL wody destylowanej. Układ zaopatrzonego w prostą chłodnicę zwrotną. W dalszej kolejności, dodano 0,150 g borowodorku sodu (4,000 mmol, 4,0 eq), w jednej porcji, i mieszano przy pomocy mieszadła magnetycznego przez 55 minut, w temperaturze pokojowej. Postęp reakcji kontrolowano przy pomocy TLC. Po tym czasie, dodano kolejną porcję borowodorku sodu w ilości 0,075 g (2,000 mmol, 2,0 eq) i mieszano jeszcze przez 1,5 godziny. Po tym czasie, dodano 5 mL metanolu, 50 mL wody, a powstały roztwór ekstrahowano chlorkiem metylenu. Warstwę organiczną wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu, środek suszący odsączono, a rozpuszczalnik odgoniono pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszczano na kolumnie chromatograficznej, gdzie chloroform pełnił rolę eluentu. Produkt otrzymano jako niskotopliwe, białe ciało stałe z wydajnością 57% (165 mg). Jego strukturę oraz czystość potwierdzono z wykorzystaniem techniki ¹H NMR.

Zestawienie właściwości zingeronu

4-(4-hydroksy-3-metoksyfenylo)butan-2-on



Wydajność: 57%

Wygląd: niskotopliwe, białe ciało stałe

Eluent: chloroform

R_F = 0,42 (chloroform)

¹H NMR: δ_H (CDCl₃): 6,84 (d, J = 8,0 Hz, 1H, C_{Ar}-H), 6,75 – 6,65 (m, 2H, C_{Ar}-H), 5,52 (bs, 1H, Ar-OH), 3,89 (s, 3H, ArOCH₃), 2,85 (t, J = 7,5 Hz, 2H, Ar-CH₂-CH₂-), 2,75 (t, J = 7,4 Hz, 2H, Ar-CH₂-CH₂-), 2,16 (s, 3H, C(=O)CH₃)

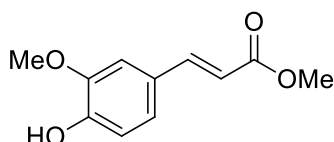
Otrzymywanie estrów metylowych

Metoda ogólna

W kolbie umieściłem 2,0 g kwasu ferulowego (10,300 mmol, 1,0 eq) i rozpuściłem go w 50 mL metanolu. Do układu wkropliłem 0,61 mL stężonego kwasu siarkowego(VI), a następnie na kolbę nakłożyłem chłodnicę zwrotną zaopatrzoną w rurkę chroniącą przed dostępem wilgoci. Ogrzewałem w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez noc. Po tym czasie, układ schłodziłem do temperatury pokojowej, rozpuszczalnik odgoniłem. Surową mieszaninę ekstrahowałem wobec nasyconego roztworu wodorowęglanu sodu i octanu etylu. Warstwę organiczną odmywałem nasyconą solanką, następnie wysuszyłem bezwodnym siarczanem magnezu, środek suszący odsączyłem, a przesącz zatężyłem na wyparce próżniowej. Jeśli analiza TLC wykaże obecność dwóch związków w mieszaninie, konieczne jest przeprowadzenie oczyszczania z wykorzystaniem kolumny chromatograficznej (eluent: chloroform). Produkt otrzymałem jako niskotopliwe, białe ciało stałe z wydajnością 64% (1,373 g). Użyłem w dalszych etapach bez dodatkowego oczyszczania. Jego czystość i strukturę potwierdziłem z wykorzystaniem techniki ¹H NMR.

Zestawienie właściwości ferulanu metylu

(E)-3-(4-hydroksy-3-metoksyfenylo)akrylan metylu



Wydajność: 64%

Wygląd: niskotopliwe, białe ciało stałe

Eluent: chloroform

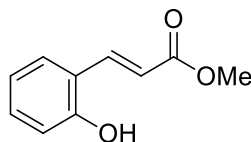
R_F = 0,18 (eter naftowy:chloroform, 2:1, v/v)



¹H NMR: δ_H (CDCl₃): 7,62 (d, J = 15,9 Hz, 1H, Ar-CH=CH-), 7,07 (dd, J = 8,2, 1,8 Hz, 1H, C_{Ar}-H), 7,02 (d, J = 1,8 Hz, 1H, C_{Ar}-H), 6,92 (d, J = 8,2 Hz, 1H, C_{Ar}-H), 6,29 (d, J = 15,9 Hz, 1H, Ar-CH=CH-), 5,90 (s, 1H, Ar-OH), 3,92 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,79 (s, 3H, -CO₂CH₃)

Zestawienie właściwości o-kumaranu metylu

(E)-3-(2-hydroksyfenilo)akrylan metylu



Wydajność: 74%

Wygląd: białe ciało stałe

R_F = 0,57 (dichlorometan)

¹H NMR: δ_H (CDCl₃): 8,05 (d, J = 16,2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-), 7,49 (d, J = 7,7 Hz, 1H, C_{Ar}(6)-H), 7,26 (t, J = 8,3 Hz, 1H, C_{Ar}(4)-H), 6,95 (t, J = 7,5 Hz, 1H, C_{Ar}(5)-H), 6,88 (d, J = 9,7 Hz, 1H, C_{Ar}(3)-H), 6,66 (d, J = 16,2 Hz, 1H, Ar-CH=CH-), 6,55 – 6,13 (bs, 1H, Ar-OH), 3,85 (s, 3H, -CO₂CH₃)

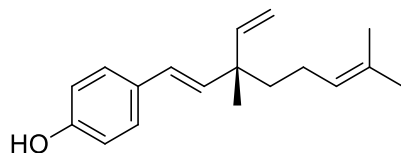
Izolacja bakuchiolu z preparatu kosmetycznego

Metoda

1 g surowego bakuchiolu (Zrób Sobie Krem, Prochowice, Polska) (<https://www.zrobsobiekiem.pl/pl/p/Bakuchiol-roslinny-retinoid/1018>, dostęp dnia 07.11.2024 r.), o barwie ciemnobrązowej, oczyszczano na kolumnie chromatograficznej, wykorzystując chlorek metylenu jako eluent. Próbkę rozpuszczono w 4 mL chloroformu i naniesiono na uprzednio przygotowany żel krzemionkowy. Po zebraniu właściwej frakcji i odgonieniu rozpuszczalnika, produkt otrzymano jako lekko żółty olej z wydajnością procesu oczyszczania równą 73% (0,728 g), i użyto bez dalszego oczyszczania. Związek ten w czasie przechowywania w zamrażalniku żółknie. Jego czystość oceniono przy pomocy techniki ¹H NMR.

Zestawienie właściwości bakuchiolu

4-[(1E,3S)-3-etenilo-3,7-dimetylookta-1,6-dienylo]fenol



Wydajność procesu oczyszczania: 73%

Wygląd: żółty olej

Eluent: chlorek metylenu

R_F = 0,48 (dichlorometan)

¹H NMR: δ_H (CDCl₃): 7,25 (dd, J = 9,3, 2,1 Hz, 2H, C_{Ar,P}(3, 5)-H), 6,80 – 6,75 (m, 2H, C_{Ar,P}(2, 6)-H), 6,26 (d, J = 16,2 Hz, 1H, C(1')-H), 6,06 (d, J = 16,2 Hz, 1H, C(2')-H), 5,88 (dt, J = 14,5, 7,3

Hz, 1H, >C(3')-CH=), 5,11 (t, J = 7,1 Hz, 1H, C(6')-H), 5,07 – 4,99 (m, 2H, C(3')-CH=CH₂), 1,96 (dd, J = 16,5, 7,5 Hz, 2H, C(5')H₂), 1,67 (s, 3H, =C(7')-CH₃), 1,59 (s, 3H, =C(7')-CH₃), 1,49 (ddd, J = 14,1, 8,5, 4,1 Hz, 2H, C(4')H₂), 1,20 (s, 3H, >C(3')-CH₃)

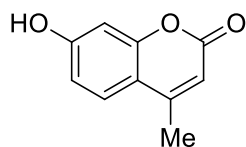
Synteza pochodnych kumaryny

Otrzymywanie hymekromonu

5,0 g rezorcyny (45,409 mmol, 1,0 eq) rozpuszczono w 20 mL 1,4-dioksanu, w kolbie okrągłodennej. Następnie, dodano 5,8 mL acetylooctanu etylu (d = 1,02 g·mL⁻¹, 45,409 mmol, 1,0 eq). Układ nieznacznie ochłodzono przy pomocy łaźni lodowej i wkroplono 1,4 mL stężonego kwasu siarkowego(VI). Mieszaninę ogrzewano w 65°C przez około 3 godziny, sprawdzając postęp reakcji przy pomocy TLC. Po tym czasie, kolbę schłodzono do 15°C, powstały osad odsączono, przepłukano chłodnym 1,4-dioksanem (nieznacznie powyżej 12°C) i wysuszono na powietrzu. Osad następnie odmyto zimnym heksanem. Produkt otrzymano jako żółtawy proszek z wydajnością 56% (4,467 g). Jego czystość i strukturę oceniono przy pomocy metody ¹H NMR.

Zestawienie właściwości hymekromonu

7-hydroksy-4-metylo-2H-chromen-2-on, 7-hydroksy-4-metylokumaryna



Wydajność: 56%

Wygląd: żółtawy proszek

R_F = 0,74 (toluen:aceton, 1:1, v/v)

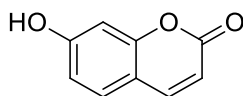
¹H NMR: δ_H (DMSO-*d*₆): 10,52 (s, 1H, Ar-OH), 7,55 (d, J = 8,7 Hz, 1H, C(5)-H), 6,77 (dt, J = 8,7, 2,5 Hz, 1H, C(6)-H), 6,68 (t, J = 2,9 Hz, 1H, C(8)-H), 6,09 (s, 1H, C(3)-H), 2,33 (t, J = 3,2 Hz, 3H, -CH₃)

Otrzymywanie umbelliferonu

W kolbie okrągłodennej umieszczono 12 mL stężonego kwasu siarkowego (VI). Następnie, dodano 2,80 g rezorcyny (25,429 mmol, 1,0 eq) i 3,75 g kwasu jabłkowego (27,972 g, 1,1 eq). Układ intensywnie mieszano przez 30 min w temperaturze pokojowej, a potem w 100°C przez 2,5 godziny. Po tym czasie mieszaninę schłodzono, zadano niewielką ilością lodowatej wody, intensywnie mieszając, a uzyskany osad przesączono. Otrzymany proszek odmywano wielokrotnie lodowatą wodą destylowaną. Po wysuszeniu na powietrzu, surowy produkt można krystalizować lub oczyszczać na kolumnie chromatograficznej. Produkt otrzymano z 49% wydajnością (2,0 g), jednak nadal zawierał zanieczyszczenia. Po odmywaniu lodowatym 25% metanolem i układem metanol:chloroform, 1:14 (v/v), otrzymano 0.467 g osadu, który scharakteryzowano przy pomocy techniki ¹H NMR.

Zestawienie właściwości umbelliferonu

7-hydrokso-2*H*-chromen-2-on, 7-hydroksykumaryna



Wydajność: 49% (surowy)

Wygląd: proszek w kolorze złamanej bieli

Eluent: aceton

$R_F = 0,35$ (toluen:aceton, 4:1, v/v)

$^1\text{H NMR}$: δ_H (DMSO- d_6): 10,59 (s, 1H, Ar-OH), 7,91 (d, $J = 9,4$ Hz, 1H, C(4)-H), 7,50 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, C(5)-H), 6,76 (dd, $J = 8,5, 2,3$ Hz, 1H, C(6)-H), 6,69 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, C(8)-H), 6,18 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H, C(3)-H)

7.2.2. Aktywność antyoksydacyjna (test DPPH)

Materiały badawcze

Odczynnik 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl (DPPH) został zakupiony w Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Metodologia

Po 400 μL roztworu każdego z przygotowanych związków, o różnych stężeniach (20–1000 $\mu\text{g/mL}$), dodano do 1,6 mL roztworu DPPH o stężeniu 100 $\mu\text{mol/L}$. Po dokładnym wymieszaniu składników, mieszanina była inkubowana przez 10 min w ciemności, w temperaturze pokojowej, a następnie zmierzono jej absorbancję przy długości fali równej 517 nm. Procentowa aktywność zmiatania rodników została obliczona na podstawie następującego wzoru:

$$\% \text{zmiatania rodników} = [(A_c - A_t)/A_c] \cdot 100\%,$$

gdzie: A_c = absorbancja próbki kontrolnej, A_t = absorbancja dla próbki po 10 minutach inkubacji.

Aktywność zmiatania rodników została wyrażona jako współczynnika IC_{50} zdefiniowany jako stężenie [mM] wymagane do wygaszenia rodników DPPH o 50%. Wartości IC_{50} zostały określone w oparciu o analizę regresji liniowej, korzystając z co najmniej trzech różnych stężeń, w dwóch powtórzeniach.

Analiza statystyczna

Próbki estrowych pochodnych **MPA** zostały przygotowane w trzech stężeniach, a każde z nich zostało przebadane dwukrotnie. Wyniki zaprezentowane zostały w postaci średniej arytmetycznej i odchylenia standardowego. Analiza statystyczna została przeprowadzona wykorzystując test HSD Tukeya ($p < 0,05$). W tej analizie zastosowano oprogramowanie statystyczne Statistica 10 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

Linia komórek AsPC-1

Hodowla komórkowa

Linia komórek nowotworu trzustki AsPC-1 (zakupiona od American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA, USA) była utrzymywana w pożywce RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) wraz z inaktywowaną termicznie, 10-procentową bydlęcą surowicą płodową (FBS; Biowest, Riverside, MO, USA), 100 µg/mL streptomycyny, i 100 jednostkami/mL penicyliny. Komórki były inkubowane w atmosferze o podwyższonej wilgotności względnej, z 5-procentową zawartością CO₂, w 37°C. Wszystkie eksperymenty przeprowadzono na komórkach będących w logarytmicznej fazie wzrostu.

Test żywotności komórek

W celu zbadania jaki efekt wywierają nowe pochodne estrowe **MPA** na przeżywalność komórek AsPC-1, przeprowadzono analizy kolorymetryczne z wykorzystaniem barwnika MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-2H-tetrazoliowy, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), którego efekt barwny oparty jest na redukcji tej żółtej substancji (zdążyła ona spenetrować aktywne metabolicznie komórki) do fioletowych kryształów formazanu. Komórki umieszczono na płytkach 96-dołkowych, w stężeniu 2·10³ komórek/dołek, i po 24 godzinach inkubacji (wykonanej w celu związania komórek z podłożem), komórki były potraktowane serią estrowych pochodnych **MPA** i gemcytabiną (kontrola dodatnia), w różnych stężeniach, których maksymalna wartość wynosiła 50 µM. Po 72 godzinach inkubowania, do każdego dołka dodano 20 µL MTT o stężeniu 4 mg/mL, na 3-4 godziny. Następnie, pożywkę usunięto, a kryształy formazanu rozpuszczono w DMSO. Absorbancja roztworów formazanu została zmierzona przy długości fali równej 540 nm za pomocą urządzenia iMark Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Stężenia leku wymagane do zahamowania wzrostu komórek o 50% (IC₅₀), w porównaniu z komórkami kontrolnymi, określono na podstawie krzywych przedstawiających przeżycie komórek w funkcji dawki. Wyniki uzyskano z co najmniej trzech niezależnych eksperymentów.

Analiza statystyczna

Analiza statystyczna wyników testu cytotoksycznego MTT została przeprowadzona przy użyciu programu GraphPad Prism 5.0 stosując dwustronnie niesparowany testu t-Studenta. Różnice ($p < 0,05$) pomiędzy **MPA** i jego pochodnymi estrowymi, a także gemcytabiną, zostały określone jako istotne statystycznie w oparciu o następujące kryteria: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$.

Linia komórek T-Jurkat i PMBCs

Materiały badawcze

Materiały badawcze, to jest: linia komórek T-Jurkat, PMBCs oraz pożywka, które zastosowano w tych badaniach, były podobne jak w przypadku testów pochodnych amidowych **MPA** (7.1.3. Badania biologiczne). Jedyna różnica dotyczy średniego wieku zdrowych dawców

krwi, z której pozyskuje się kożuszki leukocytarne, i wynosi 35 ± 4 lata, a nie 33 ± 6 lat. Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Gdańsku pozyskuje ten materiał na podstawie tej samej zgody komisji etycznej zlokalizowanej przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym.

Przygotowane próbek pochodnych MPA

W celu osiągnięcia pożądaných stężeń badanych związków, substancje w pierwszej kolejności zostały rozpuszczone w DMSO, doprowadzając uzyskane roztwory do stężenia 0,01 M. Przygotowany w ten sposób roztwór wyjściowy został odpowiednio rozcieńczony przy pomocy medium pozbawionego solubilizatora (RPMI-1640 dla komórek T-Jurkat i X-VIVO20 dla PBMCs) do odpowiednich stężeń: 100, 50, 20, 10, 2, 0,2, i 0,02 μM .

Izolacja PBMCs

Izolacja PBMCs została wykonana w dokładnie ten sam sposób w jaki opisano ją w części eksperymentalnej związanej z pochodnymi amidowymi **MPA** (7.1.3. Badania biologiczne).

Analiza cytotoksyczności pochodnych na bazie barwnika XTT

Cytotoksyczność badanych związków wobec linii komórek T-Jurkat oraz PBMCs została określona w podobny sposób, w jaki badano pochodne amidowe **MPA** (7.1.3. Badania biologiczne). Różnica polega jednak na tym, że stężenia badanych estrów **MPA** mieściły się w szeregu: 50, 25, 10, 5, 1, 0,1 i 0,01 μM .

Test proliferacji komórek na bazie barwnika VPD450

Wpływ badanych związków na proliferację komórek T-Jurkat oraz PBMCs został określony w podobny sposób, w jaki badano pochodne amidowe **MPA** (7.1.3. Badania biologiczne). Ponownie, stężenia badanych estrów **MPA** mieściły się w szeregu: 50, 25, 10, 5, 1, 0,1 i 0,01 μM , a nie 100, 10, 1, 0,1, 0,01 μM , jak w przypadku badań pochodnych **A1-A18**.

Test GMP

Test GMP wykonano w ten sam sposób jak przy badaniu amidowych pochodnych **MPA** (vide 7.1.3. Badania biologiczne).

Analiza statystyczna

Analiza statystyczna została przeprowadzona z wykorzystaniem oprogramowania GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc). Do oceny różnic pomiędzy **MMF**, **MPA** i jego nowych pochodnych, wykorzystano dwustronnie niesparowany test t-Studenta, którego istotność statystyczna została określona jako $p < 0,05$. Wartości współczynników IC_{50} i EC_{50} określono dopasowując dane do czteroparametrowego modelu regresji nieliniowej w programie GraphPad Prism 9. Istotność statystyczną oceniano za pomocą testu t.

7.3. Bioizosteryczne pochodne MPA

7.3.1. Odwrotne dokowanie

Przygotowanie ligandów

Wzory strukturalne pochodnych bioizosterycznych **MPA** i związków referencyjnych przygotowano z wykorzystaniem programu ChemDraw Ultra 12.0. Ich trójwymiarowe odpowiedniki wykonano w programie Vega ZZ [248] w odniesieniu do typowych struktur przestrzennych **MPA** i **MMF**. Każdy z analizowanych ligandów był odpowiednio przygotowany (równoważony) poprzez: (1) usunięcie atomów wodoru, (2) przypisanie charakteru częściowego wiązania podwójnego (struktury aromatyczne), (3) ponowne dodanie atomów wodoru, (4) określenie ładunku Gasteigera i równoważenie w polu siłowym MM+, (5) określenie najbardziej stabilnego konformeru z wykorzystaniem funkcji Ammp i (6) usytuowanie geometrii molekularnej narzędziem Mopac. Wyniki takich operacji zostały zapisane w rozszerzeniu .mol2 w celu poprawnego zakonserwowania wiązań podwójnych i przypisania atomów wodoru. Taki plik został użyty do odwrotnego dokowania na platformie PharmMapper [249] bez dodatkowych operacji.

Odwrotne dokowanie

Wcześniej wspomniany plik o rozszerzeniu .mol2 został wprowadzony do narzędzia PharmMapper (<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>) [249-251]. Maksymalna liczba wygenerowanych konformacji została ustalona na 300, zaś liczba ustawionych celów molekularnych wynosiła 1000, wykorzystując model *Druggable Pharmacophore Models*. Surowa lista celów molekularnych została zapisana w formacie .csv. Następnie, możliwe było wyekstrahowanie listy białek z tego pliku, w formie kodów PDB, i późniejsze użycie bez wprowadzania zmian.

W celu konwersji kodów PDB na listę genów kodujących poszczególne białka użyto oprogramowania Uniprot dostępnego w Internecie (<https://www.uniprot.org/id-mapping>) [252]. Pozyskaną uprzednio surową listę białek w formacie PDB wprowadzono do sekcji *Retrieve/ID mapping section*, tryb zamiany dotyczył struktur *3D/PDB*, które transformowano w format *UniProt/UniProtKB*. Możliwe jest wykrycie defektów w zapisie kodów PDB, wynikające ze zmian notacji, bądź wycofania struktury białek z tej bazy danych, z wykorzystaniem tego narzędzia. W celu zapewnienia kompletnej analizy danych, te niedoskonałości w zapisie należy skorygować ręcznie, posilając się ponownie bazą danych PDB lub literaturą. Po takim uzupełnieniu, konieczne jest wybranie listy ludzkich genów (możliwe jest także wybranie innego organizmu, np. bakterii), opisanej symbolami UniProtKB, i późniejsze pobranie jej w postaci pliku z rozszerzeniem .csv. Po ekstrakcji danych, możliwe jest użycie ich do dalszej analizy statystycznej.

Przeprowadzenie analizy odwrotnego dokowania dla danej cząsteczki daje w odpowiedzi mapę/zbiór białek/genów kodujących białka, do którego związek ten jest dobrze dopasowany strukturalnie. Liczba celów molekularnych oraz model dokowania zależny jest od zastosowanego narzędzia. Tego typu analiza obliczeniowa może prowadzić do znalezienia nowego celu

molekularnego dla cząsteczki o znanej strukturze, o różnym stopniu powiązania z innymi białkami.

Analiza danych

Baza danych STRING

W celu przeanalizowania bezpośrednich lub niebezpośrednich (funkcjonalnych) oddziaływań białko-białko, można użyć bazy danych STRING (<https://string-db.org/>) [253]. Te interakcje mogą być przedstawione w formie grafu-sieci, w którym poszczególne jednostki (białka) oddziałują ze sobą, a także zaprezentowany jest krótki opis poszczególnych elementów (np. analiza funkcji biochemicznych, występowanie w ustroju). Czynnikiem redukującym rozmiar puli oddziaływań jest parametr *degree*, który reprezentuje liczbę powiązań danego elementu. Pozwala to na usunięcie elementów słabo skoligowanych. Całościowym efektem tej analizy jest wysoce interaktywny graf, na którym zaprezentowano skrótowo nazwy białek, ich funkcje oraz stopień powiązania z innymi elementami.

Wykonanie grafu rozpoczyna się od wprowadzenia listy genów (pochodzącą z poprzedniego etapu) do sekcji *Multiple protein* na stronie Internetowej bazy danych STRING, a także wybrania organizmu, w ramach którego będzie prowadzona analiza. W efekcie, wyświetli się sieć STRING, która może być zapisana w tej postaci lub przetransportowana do oprogramowania Cytoscape [254], w którym można dokonać więcej manipulacji funkcjonalnych. Wybierając listę rozwijaną *Tools* i opcję *Analize* można wygenerować serię punktów węzłowych, *Nodes*, które określone są pewną wartością parametru *degree*. W zależności od wielkości zbioru danych, przyjmuje się parametr ten za 5 (duża seria danych), bądź 1 (mała seria danych). W tym przypadku, wybrana została ta druga wartość. Oznacza to, że każdy punkt węzłowy o parametrze *degree* mniejszym od 1 jest usuwany. Pozwala to na pozbycie się białek nieistotnych dla analizy. W efekcie możliwe jest pobranie listy genów/białek (format .csv) do dalszej analizy.

DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery)

Kolejnym narzędziem, użytecznym w analizie funkcjonalnej wyników odwrotnego dokowania, jest baza danych DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>) [255, 256]. Służy ono do bardziej złożonego odkrywania grup genów o charakterze funkcjonalnym, badania powiązań genów z chorobami i analizy ontologii genów. Interpretacja wprowadzonej listy genów oparta jest o 3 kryteria: proces biologiczny (BP), składnik komórki (CC) i funkcja molekularna (MF). Stanowi to alternatywę dla narzędzia STRING.

Możliwe jest pozyskanie listy celów molekularnych zaangażowanych w konkretne procesy biologiczne, ze wskazaniem dokładnej aktywności komórkowej, którą pełnią na poziomie molekularnym. Poprzez proste wprowadzenie listy genów zapisanych w formacie UniProtKB w wyszukiwarkę tej bazy danych i późniejsze wybranie opcji analizy funkcjonalnej, można uzyskać listę genów, które można ograniczyć przez parametry PValue i FDR, a ograniczenie to zazwyczaj wynosi 0,05 (odnosi się do możliwości, że wynik będzie fałszywie dodatni).

Diagram Venna

Jednym z najprostszych i łatwo dostępnych narzędzi do analizy zbioru danych jest diagram Venna. Jest to sposób na niezwykle łatwe porównanie maksymalnie 6 zbiorów danych, w tym wyłonienie ich części wspólnych oraz rozłącznych. Jest to możliwe dzięki zastosowaniu narzędzia jvenn (<http://jvenn.toulouse.inra.fr/app/example.html>) [257]. Pozwala to na wydzielenie części wspólnych wielu list genów pozyskanych dla szeregu pochodnych, bez konieczności nauki programowania.

Na początek należy załadować analizowany zbiór danych do sekcji *Example*. Narzędzie to jest niezwykle intuicyjne i wymaga jedynie wybrania odpowiednich parametrów zarówno edytorskich, jak i statystycznych, a następnie pobrania diagramu w postaci pliku graficznego lub dokumentu .csv. Jednym z podejść do analizy było wyłonienie białek, na które działają zarówno **MPA**, jak i wybrane ligandy.

Baza danych GeneCards

W procesie analizy wykorzystano listę genów związanych z procesem karcynogenezy pozyskaną z bazy danych GeneCards (<https://www.genecards.org/>) [258]. Proste wprowadzenie hasła *cancer* w wyszukiwarkę tej bazy danych pozwoliło na znalezienie 26 151 genomów, transkryptomów i proteosomów. Liczba wyników została ograniczona dzięki parametrowi istotności na poziomie 5,0. W efekcie, pozostało 2770 potencjalnych celów molekularnych, które następnie transformowano w kod UniProt. Stanowi to odtąd bazę pod listę istotnych genów odpowiedzialnych za powodowanie raka. Poprzez wyznaczenie części wspólnej pomiędzy tą listą, a listą genów pochodzącą z odwrotnego dokowania dla **MPA** i **MMF**, można określić użyteczną, własną bazę danych pod dalsze poszukiwanie celów molekularnych powiązanych zarówno z karcynogenezą, jak i aktywnością **MPA/MMF**.

7.3.2. Dokowanie molekularne

HDAC6

Przygotowanie ligandów

Przygotowanie ligandów zostało przeprowadzone w ten sam sposób jak przy odwrotnym dokowaniu (w programie Vega ZZ).

Przygotowanie białka i walidacja metody

Struktura białka ludzkiej deacetylazy histonowej 6 (HDAC6) została pozyskana z bazy danych PDB (kod PDB: 5EDU). Jej łańcuch B, reszta α -maltozy, trichostatyna A (TSA), a także jony potasu zostały usunięte. Modelowanie białka zostało wykonane na serwerze SWISS-MODEL [259]. Należało zwrócić szczególną uwagę na poprawne protonowanie reszt histydynowych, skąd wynikło zastosowanie serwera H++ (<http://biophysics.cs.vt.edu/H++>) [260-262]. Minimalizację białka przeprowadzono za pomocą oprogramowania GROMACS2019 [263], a także pola siłowego CHARMM [264]. Układ zawierał białko oraz jon cynku skoordynowany resztami Asp742, Asp649 i His651. Miejsce aktywne było zalokowane w sześcianie o boku 10 Å. W optymalizacji procesu uwodnienia zastosowano model TIP3P. Stężenie jonów potasu oraz

chlorkowych przyjęto za równe 0,15 M. Długość wiązania jon cynku-podjednostka aminokwasowa została przyjęta za taką samą jaką zakonserwowana jest w strukturze krystalograficznej (5EDU). Minimalizacja energii białka została osiągnięta po 1000 kroków, z wykorzystaniem metody najszybszego spadku (najwyższa siła mniejsza od wartości 10 kJ·mol⁻¹). Oddziaływania elektrostatyczne dalekiego zasięgu zostały zbadane z wykorzystaniem metody PME (*Particle Mesh Ewald*) [265].

Walidacja metody została przeprowadzona na drodze ponownego zadokowania TSA, znanego inhibitora HDAC6, obecnego w samej strukturze krystalograficznej 5EDU. Zastosowano metodę PLANTS (*Protein-Ligand ANT System*) [266], *chemplp*, centrując obszar dokowania na jonach cynku w miejscu aktywnym. Wyniki ponownego dokowania są podobne do tych uzyskanych z bazy danych PDB, w odniesieniu do cząsteczki TSA.

Dokowanie molekularne

Analiza dokowania molekularnego dla wszystkich uprzednio zoptymalizowanych ligandów była przeprowadzona przy użyciu metody *PLANT score chemplp*. Obszar dokowania, sfera o średnicy 15 Å, był wycentrowany na jon cynku. Najlepsze rezultaty dokowania zostały zwizualizowane przy użyciu oprogramowania Vega ZZ.

IMDPH II

Przygotowanie ligandów

Czynności związane z przygotowaniem liganda wykonywano w programie Vega ZZ [248]. Optymalizację struktur ligandów przeprowadzono za pomocą Ammp [267] zaimplementowanego w Vega ZZ. W tym celu wykorzystano pole siłowe SP4 zalecane przy użyciu Ammp oraz algorytm gradientu sprzężonego Polaka-Ribiere'a. Konformacje ligandów wykonano za pomocą Boltzmann Jump.

Przygotowanie białka i walidacja metody

Z bazy danych PDB strukturę białka IMPDH2 o kodzie PDB: 1JR1. Wybrano jego łańcuch B i oczyszczono strukturę z jonów i wody. Strukturę modelowano przy pomocy serwera Swiss-Model [259, 268-271]. Protonowanie aminokwasów, przy pH = 6.5, z ustaleniem tautomerii histydyny, zostało wykonane przy użyciu serwera H++ [260-262].

Walidację metody przeprowadzono poprzez ponowne dokowanie inhibitora IMPDH2, **MPA**, zawartego w zdeponowanej strukturze 1JR1. Do dokowania wykorzystano program Autodock Vina version 1.1.2 (The Molecular Graphic Laboratory, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA) [244], centrując obszar dokowania we wszystkich badaniach na atomie węgla β w SER58; ustalony wymiar siatki to 25 Å x 25 Å x 25 Å. Wynik dokowania był podobny, tak jak w strukturze 1JR1.

Dokowanie molekularne

Dokowanie molekularne równoważonych uprzednio ligandów, do wcześniej przygotowanego białka IMPDH2 (kod PDB: 1JR1) i zwalidowanej metody, wykonano przy użyciu



oprogramowania Autodock Vina 1.1.2 [244]. Parametry dokowania dla każdego liganda były takie same, pudełko symulacyjne wycelowane na atomie węgla β w podjednostce Ser276, o rozmiarze 25 Å x 25 Å x 25 Å. Opracowanie graficzne wyników dokowania wykonano przy użyciu programu PyMOL [272].

7.3.3. Komputerowe szacowanie właściwości fizykochemicznych i biologicznych (SwissADME)

Jednym z bardziej istotnych narzędzi używanych w nowoczesnym projektowaniu leków jest komputerowe przewidywanie właściwości fizykochemicznych cząsteczek. Rozpuszczalność, współczynnik podziału, a także aktywność metaboliczna to kilka z ważniejszych czynników analizowanych przy określaniu *skłonności do bycia lekiem* (ang. *druglikeness*), szczególnie dla związków małowcząsteczkowych. Jednym z narzędzi stosowanych w tym celu jest SwissADME [216]. Analizę wcześniej wymienionych czynników osiąga się poprzez wprowadzenie kodu SMILES związku do wyszukiwarki wbudowanej w silnik tego narzędzia, co generuje listę własności potrzebnych do wstępnej oceny profilu farmakokinetycznego.

Wzór strukturalny cząsteczki był przygotowany w oparciu o program ChemDraw Ultra 12.0. Jego transformowanie w kod SMILES dokonywane jest poprzez wybranie opcji: edytuj/skopiuj jako/SMILES, na odpowiedniej liście rozwijanej. Efekt analizy może być zapisany w postaci pliku .csv i użyty bez dodatkowej obróbki danych. Warto dodać, że strona internetowa SwissADME oferuje bardziej dogodne operowanie danymi.

Analiza wyników opiera się o porównanie uzyskanych parametrów ADME z tymi dostępnymi w literaturze [217].

7.3.4. Synteza

Informacje ogólne

MPA, kwasy karboksylowe, nityle, **MMF**, DIPEA, TEA, HOBt·H₂O, TBTU, T3P w octanie etylu, T3P w DMF i hydrat hydrazyny, zostały zakupione u następujących dostawców: Sigma Aldrich, Apollo Scientific, AmBeed, Maybridge, Acros, Angene, Chemat, Alfa Aesar i użyte bez dodatkowego oczyszczania. Ibuprofen został pozyskany z popularnego leku przeciwbólowego Ibuprom® (USP Zdrowie, Warszawa, Polska). Niewielkie ilości Panobinostat zostały pozyskane dzięki uprzejmości firmy Prochimia Surfaces Sp. z o.o. (Gdynia, Polska). Rozpuszczalniki organiczne zakupiono od dostawców: Sigma Aldrich, Fisher Scientific, Avantor i Chempur, i zostały wysuszone przed użyciem, zgodnie ze standardowymi procedurami. Odczynniki nieorganiczne pozyskano z zasobów Katedry Chemii Organicznej oraz jednostki Chem&Tech przynależącej do KU Leuven.

Widma NMR były rejestrowane na spektrometrach: Bruker Avance III HD 400 o częstotliwości roboczej 400 MHz dla widm ¹H NMR i 101 MHz dla widm ¹³C NMR (KU Leuven) oraz Varian Unity Inova 500 o częstotliwości roboczej 500 MHz dla widm ¹H NMR i 126 MHz dla widm ¹³C NMR (Politechnika Gdańska). Wartości przesunięcia chemicznego (δ) zostały podane w częściach na milion (ppm), w odniesieniu do tetrametylosilanu (TMS) i pików resztkowego rozpuszczalników, jako standardu wewnętrznego (CDCl₃: 7,26 ppm dla ¹H NMR i 77,16 ppm dla

^{13}C NMR; DMSO- d_6 : 2,50 ppm dla ^1H NMR i 39,52 ppm dla ^{13}C NMR). Stałe sprzężenia (J) przedstawiono w hercach (Hz). Sygnały reszkowe pochodzące od rozpuszczalników, a szczególnie od: dichlorometanu, chloroformu, toluenu, octanu etylu i wody, mogą pojawić się na rejestrowanych widmach przy typowych dla siebie wartościach przesunięć chemicznych. Przypisanie poszczególnych pików możliwe jest w oparciu o sygnały pochodzące od **MPA**, a także od motywów aromatycznych/heteroaromatycznych wprowadzonych dzięki funkcjonalizacji.

Analiza TLC została przeprowadzona przy użyciu płytek firmy Supelco (silikażel, naniesiony na folię aluminiową, z fluoroforem pracującym przy 254 nm), a także Silica Gel 60 F254 Coated Aluminium-Backed TLC Sheets. Oczyszczanie z wykorzystaniem kolumny chromatograficznej było prowadzone na żelu krzemionkowym 60 (230-450 Mesh, Alfa Aesar) i 70–230 mesh silica 60 (Acros, Geel, Belgia). Wywoływanie chromatogramu osiągnęto przy użyciu lampy UV (długość fali: 254 nm) lub wybarwianiu parami jodu.

Analizę chromatograficzną HPLC przeprowadzono na chromatografie cieczowym Shimadzu series Prominence-i LC-2030C 3D Plus składającym się z autosamplera, termostатовanej kolumny i detektora diodowego (zakres długości fali: 190-800 nm). Próbkę rozpuszczono w układzie metanol:chlorek metylenu, 2:1 (v/v), i następnie 1 μL uzyskanego roztworu nanoszono na kolumnę Shim-pack GISS-HP C18 3,0 μm (2,1 x 100 mm), termostatowaną w 30°C. Natężenie przepływu fazy ruchomej wynosiło 0,35 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, zaś elucję wykonywano używając rozpuszczalnika A (0,1% kwas mrówkowy w wodzie) i B (0,1% kwas mrówkowy w metanolu), w trybie gradientowym, gdzie stopniowo zwiększano udział rozpuszczalnika B z 25% do 100%, w ciągu 15%, a następnie używano 100% B przez 20 min.

Widma mas zostały zarejestrowane na spektrometrze z analizatorem czasu przelotu, z kwadrupolowym przyspieszeniem ortogonalnym (Synapt G2 HDMS, Waters, Milford, MA). Próbkę wstrzykiwano przy natężeniu przepływu 3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, a widma uzyskiwano w trybie dodatniej (ujemnej) jonizacji, z rozdzielczością 15 000 Da (FWHM), stosując enkefalinę leucyny jako odnośnik.

Charakterystyka spektralna **MPA** oraz **MMF** została przedstawiona już wcześniej.

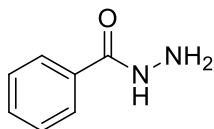
Metoda syntezy hydrazydów

W kolbie okrągłodennej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną i mieszadło magnetyczne, umieszczono 2,78 g estru metylowego kwasu izonikotynowego (20,249 mmol, 1,0 eq) (otrzymany na drodze estyfikacji Fischera z odpowiedniego kwasu karboksylowego) i rozpuszczono w 12 mL 96% (v/v) etanolu. Następnie, wkraplając, dodano 3,20 mL monohydratu hydrazyny (c = 80%). Układ ogrzewano w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez co najmniej 4 godziny (analiza skonsumowania substratów przy użyciu TLC). Później, kolbę schłodzono do temperatury pokojowej, nadmiar etanolu odgoniono na wyparce próżniowej, a pozostałość potraktowano 10 mL wody destylowanej. Po schłodzeniu w łaźni lodowej, osad (w przypadku niekryształizujących hydrazydów możliwe jest zastosowanie metod ekstrakcyjnych) odsączono, przemyto lodową wodą i wysuszono na powietrzu. Hydrazyd kwasu izonikotynowego otrzymano z 82% wydajności

(2,28 g) i użyto w kolejnym etapie bez dodatkowego oczyszczania (jeśli ester obecny jest w próbce to należy związek dodatkowo oczyścić technikami chromatograficznymi). Czystość i strukturę cząsteczki potwierdzono z wykorzystaniem techniki ^1H NMR oraz chromatografii cienkowarstwowej.

Zestawienie właściwości hydrazydów

Benzohydrazyd

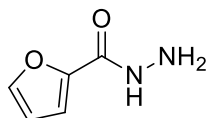


Wydajność: 32%

R_F = 0,39 (toluen:aceton, 1:1, v/v)

^1H NMR: δ_H (500 MHz, DMSO- d_6): 9,76 (s, 1H, -NH-), 7,82 – 7,77 (m, 2H, $C_{Ar}(2, 6)\text{-H}$), 7,51 – 7,47 (m, 1H, $C_{Ar}(4)\text{-H}$), 7,45 – 7,40 (m, 2H, $C_{Ar}(3, 5)\text{-H}$), 4,48 (s, 2H, -NH₂)

Hydrazyd kwasu 2-furanokarboksylowego

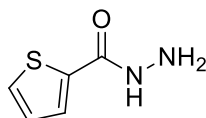


Wydajność: 67%

R_F = 0,53 (toluen:aceton, 1:1, v/v)

^1H NMR: δ_H (500 MHz, DMSO- d_6): 9,61 (s, 1H, -NH-), 7,78 (dd, J = 1,7, 0,7 Hz, 1H, $C_{HetAr}(5)\text{-H}$), 7,05 (dd, J = 3,5, 0,7 Hz, 1H, $C_{HetAr}(3)\text{-H}$), 6,57 (dd, J = 3,4, 1,7 Hz, 1H, $C_{HetAr}(4)\text{-H}$), 4,40 (s, 2H, -NH₂)

Hydrazyd kwasu 2-tiofenokarboksylowego

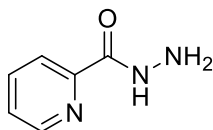


Wydajność: 100%

R_F = 0,65 (toluen:aceton, 1:1, v/v)

^1H NMR: δ_H (500 MHz, DMSO- d_6): 9,75 (s, 1H, -NH-), 7,79 – 7,59 (m, 2H, $C_{HetAr}(3, 5)\text{-H}$), 7,10 (dd, J = 5,0, 3,7 Hz, 1H, $C_{HetAr}(4)\text{-H}$), 4,48 (s, 2H, -NH₂)

Hydrazyd kwasu pikolinowego

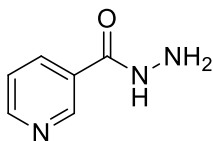


Wydajność: 65%

R_F = 0,55 (toluen:aceton, 1:1, v/v)

¹H NMR: δ_H (500 MHz, DMSO-*d*₆): 9,87 (s, 1H, -NH-), 8,58 (dt, *J* = 4,8, 1,3 Hz, 1H, C_{HetAr} (6)-H), 8,07 – 7,87 (m, 2H, C_{HetAr}(3, 4)-H), 7,63 – 7,44 (m, 1H, C_{HetAr}(5)-H), 4,54 (s, 2H, -NH₂)

Hydrazyd kwasu nikotynowego

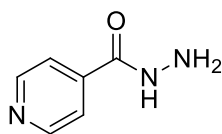


Wydajność: 79%

R_F = 0,18 (toluen:aceton, 1:1, v/v)

¹H NMR: δ_H (500 MHz, DMSO-*d*₆): 10,04 (s, 1H, -NH-), 8,96 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H, C_{HetAr}(2)-H), 8,66 (dd, *J* = 4,8, 1,5 Hz, 1H, C_{HetAr}(6)-H), 8,19 – 8,12 (m, 1H, C_{HetAr}(4)-H), 7,50 – 7,41 (m, 1H, C_{HetAr}(5)-H), 4,57 (s, 2H, -NH₂)

Hydrazyd kwasu izonikotynowego, izoniazyd



Wydajność: 82%

R_F = 0,17 (toluen:aceton, 1:1, v/v)

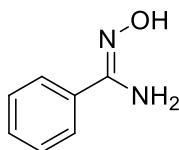
¹H NMR: δ_H (500 MHz, DMSO-*d*₆): 10,08 (s, 1H, -NH-), 8,68 (dd, *J* = 4,4, 1,6 Hz, 2H, C_{HetAr}(2, 6)-H), 7,70 (dd, *J* = 4,4, 1,6 Hz, 2H, C_{HetAr}(3, 5)-H), 4,57 (s, 2H, -NH₂)

Metoda syntezy amidoksymów

2,55 g bezwodnego węgla sodu (24,059 mmol, 1,25 eq) zawieszono w 12 mL 50% etanolu w kolbie okrągłodennej. Następnie, 2,00 g 2-cyjanopirydyny (19,210 mmol, 1,00 eq) dodano do tej mieszaniny w jednej porcji. Układ rozcieńczono 110 mL bezwodnego etanolu, z następczym dodaniem 1,70 g chlorowodoru hydroksyloaminy (24,059 mmol, 1,25 eq). Kolbę ogrzewano pod chłodnicą zwrotną, w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika, przez co najmniej 8 godzin (najlepiej przez całą noc, około 15 godzin). Później, mieszaninę schłodzono do temperatury pokojowej, odsączono z resztek nieprzereagowanego węgla sodu, i zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Surową mieszaninę poddano ekstrakcji ciecz-ciecz z wykorzystaniem octanu etylu i nasyconej solanki (lub układu octan etylu:metanol, 9:1 (v/v)). Fazę organiczną wysuszone nad węglanem magnezu, odsączono, a nadmiar rozpuszczalnika odgoniono na próżniowym, rotacyjnym aparacie wyparnym. Uzyskano produkt z 86% wydajności i użyto w następnym etapie bez dodatkowego oczyszczania. Wstępnej oceny czystości dokonano przy pomocy analizy ¹H NMR oraz chromatografii cienkowarstwowej.

Zestawienie właściwości amidoksymów (*N'*-hydroksylowanych karboksylimidoamidów)

N'-hydroksybenzenokarboksylimidoamid

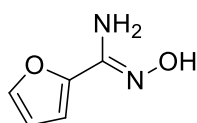


Wydajność: 88%

R_F = 0,66 (toluen:aceton, 1:1, v/v)

¹H NMR: δ_H (500 MHz, DMSO-*d*₆): 9,63 (s, 1H, =N-OH), 7,72 – 7,60 (m, 2H, C_{Ar}(2, 6)-H), 7,37 – 7,33 (m, 3H, C_{Ar}(3, 4, 5)-H), 5,79 (s, 2H, -NH₂)

N'-hydroksyfuran-2-ylokarboksylimidoamid

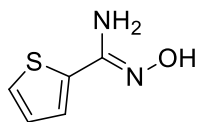


Wydajność: 67%

R_F = 0,40 (dichlorometan:aceton, 10:1, v/v)

¹H NMR: δ_H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 9,61 (s, 1H, =N-OH), 7,72 – 7,62 (m, 1H, C_{HetAr}(5)-H), 6,75 (dd, *J* = 3,4, 0,7 Hz, 1H, C_{HetAr}(3)-H), 6,52 (dd, *J* = 3,4, 1,8 Hz, 1H, C_{HetAr}(4)-H), 5,70 (s, 2H, -NH₂)

N'-hydroksytiofen-2-ylokarboksylimidoamid

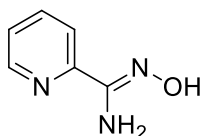


Wydajność: 57%

R_F = 0,54 (toluen:aceton, 1:1, v/v)

¹H NMR: δ_H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 9,60 (s, 1H, =N-OH), 7,45 (ddd, *J* = 6,2, 4,4, 1,1 Hz, 2H, C_{HetAr}(5, 3)-H), 7,04 (dd, *J* = 5,1, 3,6 Hz, 1H, C_{HetAr}(4)-H), 5,91 (bs, 2H, -NH₂)

N'-hydroksypiryd-2-ylokarboksylimidoamid



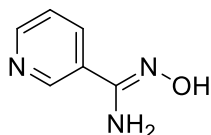
Wydajność: 86%

R_F = 0,54 (toluen:aceton, 1:1, v/v)

¹H NMR: δ_H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 9,92 (s, 1H, =N-OH), 8,56 (ddd, *J* = 4,9, 1,5, 1,0 Hz, 1H, C_{HetAr}(6)-H), 7,87 (dt, *J* = 8,0, 1,1 Hz, 1H, C_{HetAr}(3)-H), 7,81 (td, *J* = 7,7, 1,7 Hz, 1H, C_{HetAr}(4)-H), 7,40 (ddd, *J* = 7,2, 4,9, 1,3 Hz, 1H, C_{HetAr}(5)-H), 5,85 (bs, 2H, -NH₂)



N'-hydroksypiryd-3-ylokarboksylimidoamid

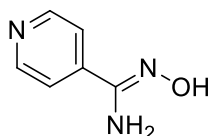


Wydajność: 31%

R_F = 0,23 (toluen:aceton, 1:1, v/v)

^1H NMR: δ_H (400 MHz, DMSO- d_6): 9,86 (s, 1H, =N-OH), 8,87 (dd, J = 2,2, 0,7 Hz, 1H, C_{HetAr} (2)-H), 8,68 – 8,46 (m, 1H, C_{HetAr} (6)-H), 8,18 – 7,85 (m, 1H, C_{HetAr} (4)-H), 7,41 (ddd, J = 8,0, 4,8, 0,8 Hz, 1H, C_{HetAr} (5)-H), 5,99 (bs, 2H, -NH₂)

N'-hydroksypiryd-4-ylokarboksylimidoamid



Wydajność: 74%

R_F = 0,32 (toluen:aceton, 1:1, v/v)

^1H NMR: δ_H (400 MHz, DMSO- d_6): 10,06 (s, 1H, =N-OH), 8,58 (dd, J = 4,6, 1,6 Hz, 2H, C_{HetAr} (2, 6)-H), 7,65 (dd, J = 4,6, 1,6 Hz, 2H, C_{HetAr} (3, 5)-H), 6,01 (s, 2H, -NH₂)

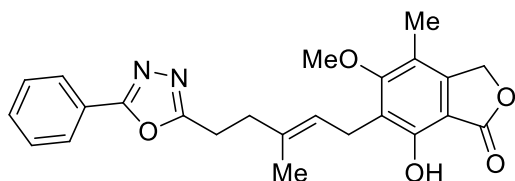
Metoda syntezy pochodnych bioizosterycznych

Do wysuszonej w płomieniu palnika, i przedmuchanej strumieniem argonu, kolby okrągłodennej dodano 200 mg **MPA** (0,624, 1,0 eq) oraz 89 mg hydrazidu kwasu 2-tiofenokarboksylowego (0,624 mmol, 1,0 eq). Substraty zawieszono w 5 mL suchego toluenu (możliwe jest dodanie niewielkiej ilości suchego 1,4-dioksanu w celu polepszenia rozpuszczalności) i następnie wkroplono 0,35 mL suchej trietyloaminy (d = 0,726 g·mL⁻¹, 252,7 mg, 2,497 mmol, 4,0 eq). Po 30 min ciągłego mieszania, wkroplono 0,93 mL 50% roztworu bezwodnika kwasu propanofosfonowego, T3P, w octanie etylu (d = 1,069 g·mL⁻¹, 496,6 mg, 1,561 mmol, 2,5 eq). Układ mieszano przez 10 min w temperaturze pokojowej i następnie przedmuchano strumieniem gazu obojętnego. Następnie, mieszaninę doprowadzono do temperatury wrzenia i ogrzewano pod chłodnicą zwrotną, w łaźni olejowej, przez noc (około 15 godzin). Układ był zabezpieczony przed dostępem powietrza przy pomocy balonu z argonem. Mieszaninę dwufazową schłodzono do temperatury pokojowej, rozcieńczono 10 mL octanu etylu i ekstrahowano nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu i nasyconą solanką. Warstwę organiczną wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu, odsączono i zatężono na wyparce próżniowej. Surową mieszaninę oczyszczano na kolumnie chromatograficznej w określonym eluencie (tu: toluen:octan etylu, 3:1 (v/v)). Produkt, **134OX_Tien**, otrzymano jako żółty proszek z 59% wydajności. Jego czystość/struktura została określona technikami NMR, MS oraz HPLC.



Zestawienie właściwości pochodnych 1,3,4-oksadiazolu (134OX)

(*E*)-7-hydroksy-5-metoksy-4-metylo-6-(3-metylo-5-(5-fenyl-1,3,4-oksadiazol-2-yl)pent-2-en-1-yl)izobenzofuran-1(3*H*)-on (134OX_Ph)



Wydajność: 48%

Wygląd: biały proszek

Eluent: eter naftowy:aceton, 3:1 (v/v)

R_F = 0,47 (toluen:aceton, 1:1, v/v)

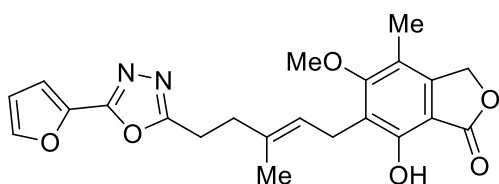
¹H NMR: δ_H (400 MHz, 0,10 M, DMSO-*d*₆): 9,27 (bs, 1H, Ar-OH), 7,90 – 7,83 (m, 2H, C_{Ar}(2, 6)-H), 7,62 – 7,50 (m, 3H, C_{Ar}(3, 4, 5)-H), 5,21 (dd, *J* = 7,0, 5,9 Hz, 1H, >C=CH-), 5,13 (s, 2H, Ar-CH₂O-), 3,57 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,25 (d, *J* = 6,9 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 3,03 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H, HetAr-CH₂-), 2,46 (q, *J* = 7,2 Hz, 2H, -CH₂-), 1,98 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,79 (s, 3H, -CH₃)

¹³C NMR: δ_C (101 MHz, 0,10 M, DMSO-*d*₆): 170,56 (-COO-), 166,77 (C(2)_{OKSADIAZOL}), 164,13 (C(5)_{OKSADIAZOL}), 162,84 (C_{Ar}-OMe), 153,07 (C_{Ar}-OH), 146,06 (C_{Ar}-CH₂O-), 132,93 (>C=C(-CH₃)-), 132,06 (C(4)_{FENYL}), 129,68 (2C, C(3, 5)_{FENYL}), 126,57 (2C, C(2, 6)_{FENYL}), 124,71 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 123,87 (C(1)_{FENYL}), 122,43 (>C=C(-CH₃)-), 116,25 (C_{Ar}-CH₃), 107,31 (C_{Ar}-COO-), 68,98 (Ar-CH₂O-), 60,91 (Ar-OCH₃), 36,04 (HetAr-CH₂-CH₂-), 23,89 (HetAr-CH₂-CH₂-), 22,84 (Ar-CH₂-), 15,99 (=C(-CH₃)-), 11,39 (Ar-CH₃)

HRMS (m/z) obliczone dla C₂₄H₂₄N₂O₅ [M + H]⁺: 421,1758, zmierzone: 421,1753

Czystość: 100,00%; R_{T,HPLC} = 11,94 min

(*E*)-6-(5-(5-(furan-2-yl)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)-3-metylopent-2-en-1-yl)-7-hydroksy-5-metoksy-4-metyloizobenzofuran-1(3*H*)-on (134OX_Fur)



Wydajność: 47%

Wygląd: żółtawy proszek

Eluent: toluen:octan etylu, 3:1 (v/v)

R_F = 0,74 (toluen:aceton, 1:1, v/v)

¹H NMR: δ_H (500 MHz, 0,02 M, DMSO-*d*₆): 9,30 (bs, 1H, Ar-OH), 8,06 – 7,92 (m, 1H, C_{HetAr}(5)-H), 7,23 – 7,09 (m, 1H, C_{HetAr}(3)-H), 6,80 – 6,62 (m, 1H, C_{HetAr}(4)-H), 5,26 – 5,14 (m, 3H, >C=CH- + Ar-CH₂O-), 3,61 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,26 (d, *J* = 6,8 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 3,05 – 2,95 (m, 2H, HetAr-CH₂-), 2,45 – 2,37 (m, 2H, -CH₂-), 2,03 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,79 (s, 3H, -CH₃)

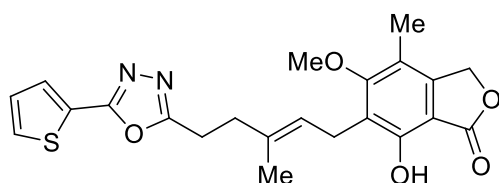
¹³C NMR: δ_C (101 MHz, 0,09 M, DMSO-*d*₆): 170,60 (CCOO-), 166,10 (C(2)_{OKSADIAZOL}), 162,92 (C_{Ar}OMe), 157,18 (C(5)_{OKSADIAZOL}), 153,13 (C_{Ar}-OH), 147,06 (C(2)_{FURAN}), 146,19 (C_{Ar}-CH₂O-), 139,16 (C(5)_{FURAN}), 132,96 (>C=C(-CH₃)-), 124,65 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 122,50 (>C=C(-CH₃)-), 116,31 (C_{Ar}-CH₃), 114,28 (C(3 lub 4)_{FURAN}), 112,86 (C(3 lub 4)_{FURAN}), 107,35 (C_{Ar}-COO-), 69,04 (Ar-CH₂O-), 60,95 (Ar-OCH₃), 36,00 (HetAr-CH₂-CH₂-), 23,76 (HetAr-CH₂-CH₂-), 22,85 (Ar-CH₂-), 16,05 (=C(-CH₃)-), 11,45 (Ar-CH₃)

HRMS (m/z) obliczone dla C₂₂H₂₂N₂O₆ [M + Na]⁺: 433,1370, zmierzone: 433,1367

Czystość: 93,20%*; R_{T,HPLC} = 11,19 min

* — taką czystość osiągnięto po 5-krotnym oczyszczaniu na kolumnie chromatograficznej; związek okazał się niemożliwy do oczyszczenia powyżej domyślnych 95% czystości

(*E*)-7-hydroksy-5-metoksy-4-metylo-6-(3-metylo-5-(5-(tiofen-2-ylo)-1,3,4-oksadiazol-2-ylo)pent-2-en-1-ylo)izobenzofuran-1(3*H*)-on (**134OX_Tien**)



Wydajność: 59%

Wygląd: żółty proszek

Eluent: toluen:octan etylu, 2:1 (v/v)

R_F = 0,76 (toluen:aceton, 1:1, v/v)

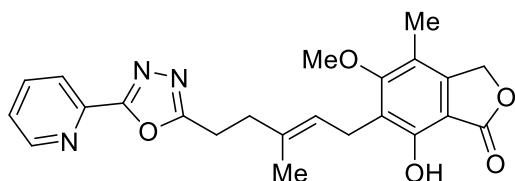
¹H NMR: δ_H (400 MHz, 0,10 M, DMSO-*d*₆): 9,27 (bs, 1H, Ar-OH), 7,88 (dd, *J* = 5,0, 1,2 Hz, 1H, C_{HetAr}(3)-H), 7,64 (dd, *J* = 3,7, 1,2 Hz, 1H, C_{HetAr}(5)-H), 7,21 (dd, *J* = 5,0, 3,7 Hz, 1H, C_{HetAr}(4)-H), 5,25 – 5,13 (m, 3H, >C=CH- + Ar-CH₂O-), 3,58 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,26 (d, *J* = 6,9 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 3,00 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H, HetAr-CH₂-), 2,42 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H, -CH₂-), 2,01 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,78 (s, 3H, -CH₃)

¹³C NMR: δ_C (101 MHz, 0,10 M, DMSO-*d*₆): 170,57 (CCOO-), 166,21 (C(2)_{OKSADIAZOL}), 162,85 (C_{Ar}OMe), 160,46 (C(5)_{OKSADIAZOL}), 153,08 (C_{Ar}-OH), 146,11 (C_{Ar}-CH₂O-), 132,89 (>C=C(-CH₃)-), 131,43 (C(2)_{TIOFEN}), 130,03 (C(5)_{TIOFEN}), 128,95 (C(3 lub 4)_{TIOFEN}), 124,86 (C(3 lub 4)_{TIOFEN}), 124,72 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 122,44 (>C=C(-CH₃)-), 116,30 (C_{Ar}-CH₃), 107,33 (C_{Ar}-COO-), 69,03 (Ar-CH₂O-), 60,92 (Ar-OCH₃), 36,01 (HetAr-CH₂-CH₂-), 23,79 (HetAr-CH₂-CH₂-), 22,85 (Ar-CH₂-), 16,01 (=C(-CH₃)-), 11,43 (Ar-CH₃)

HRMS (m/z) obliczone dla C₂₂H₂₂N₂O₅S₁ [M + H]⁺: 427,1322, zmierzone: 427,1321

Czystość: 98,50%; R_{T,HPLC} = 11,53 min

(E)-7-hydroksy-5-metoksy-4-metylo-6-(3-metylo-5-(5-(piryd-2-ylo)-1,3,4-oksadiazol-2-ylo)pent-2-en-1-ylo)izobenzofuran-1(3H)-on (**134OX_2-Py**)



Wydajność: 16%

Wygląd: żółty proszek

Eluent: toluen:octan etylu, 3:1 (v/v)

R_F = 0,74 (toluen:aceton, 1:1, v/v)

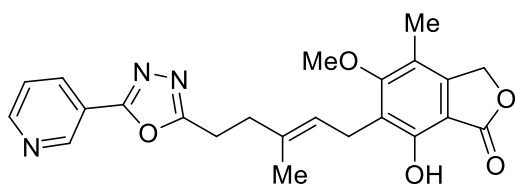
¹H NMR: δ_H (400 MHz, 0,09 M, DMSO-*d*₆): 9,26 (bs, 1H, Ar-OH), 8,70 (ddd, *J* = 21,5, 11,2, 3,0 Hz, 1H, C_{HetAr}(6)-H), 8,08 – 7,97 (m, 2H, C_{HetAr}(3, 4)-H), 7,60 (ddd, *J* = 7,2, 4,8, 1,5 Hz, 1H, C_{HetAr}(5)-H), 5,23 – 5,14 (m, 3H, >C=CH- + Ar-CH₂O-), 3,59 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,25 (d, *J* = 6,8 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 3,06 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H, HetAr-CH₂-), 2,45 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H, -CH₂-), 1,99 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,79 (s, 3H, -CH₃)

¹³C NMR: δ_C (101 MHz, 0,09 M, DMSO-*d*₆): 170,56 (-COO-), 167,65 (C(2)_{OKSADIAZOL}), 163,82 (C(5)_{OKSADIAZOL}), 162,90 (C_{Ar}-OMe), 153,15 (C_{Ar}-OH), 150,58 (C(6)_{PIRYDYNA}), 146,10 (C_{Ar}-CH₂O-), 143,29 (C(2)_{PIRYDYNA}), 138,16 (C(4)_{PIRYDYNA}), 132,95 (>C=C(-CH₃)-), 126,57 (C(3 lub 5)_{PIRYDYNA}), 124,69 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 122,96 (C(3 lub 5)_{PIRYDYNA}), 122,46 (>C=C(-CH₃)-), 116,24 (C_{Ar}-CH₃), 107,28 (C_{Ar}-COO-), 69,00 (Ar-CH₂O-), 60,95 (Ar-OCH₃), 36,05 (HetAr-CH₂-CH₂-), 24,02 (HetAr-CH₂-CH₂-), 22,85 (Ar-CH₂-), 16,06 (=C(-CH₃)-), 11,43 (Ar-CH₃)

HRMS (*m/z*) obliczone dla C₂₃H₂₃N₃O₅[M+H]⁺: 422,1710, zmierzone: 422,1708

Czystość: 97,50%; R_{T,HPLC} = 10,19 min

(E)-7-hydroksy-5-metoksy-4-metylo-6-(3-metylo-5-(5-(piryd-3-ylo)-1,3,4-oksadiazol-2-ylo)pent-2-en-1-ylo)izobenzofuran-1(3H)-on (**134OX_3-Py**)



Wydajność: 31%

Wygląd: żółty olej

Eluent: eter naftowy:aceton, 2:1 (v/v)

R_F = 0,47 (toluen:aceton, 1:1, v/v)

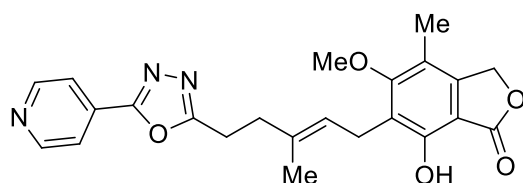
¹H NMR: δ_H (500 MHz, 0,03 M, DMSO-*d*₆): 9,42 – 9,07 (bs, 1H, Ar-OH), 9,01 (dd, *J* = 2,1, 0,7 Hz, 1H, C_{HetAr}(2)-H), 8,78 (ddd, *J* = 13,5, 4,8, 1,6 Hz, 1H, C_{HetAr}(6)-H), 8,26 – 8,16 (m, 1H, C_{HetAr}(4)-H), 7,62 – 7,50 (m, 1H, C_{HetAr}(5)-H), 5,21 (dd, *J* = 7,1, 6,0 Hz, 1H, >C=CH-), 5,14 (s, 2H, Ar-CH₂O-), 3,58 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,25 (d, *J* = 6,9 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 3,05 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H, HetAr-CH₂-), 2,46 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H, -CH₂-), 1,98 (d, *J* = 8,3 Hz, 3H, Ar-CH₃), 1,79 (s, 3H, -CH₃)

¹³C NMR: δ_C (101 MHz, 0,11 M, DMSO-*d*₆): 170,51 (COO-), 167,25 (C(2)_{OKSADIAZOL}), 162,82 (C_{Ar}OMe), 162,35 (C(5)_{OKSADIAZOL}), 153,06 (C_{Ar}-OH), 152,66 (C(6)_{PIRYDYNA}), 147,24 (C(2)_{PIRYDYNA}), 146,04 (C_{Ar}-CH₂O-), 134,13 (C(4)_{PIRYDYNA}), 132,84 (>C=C(-CH₃)-), 124,79 (C(3 lub 5)_{PIRYDYNA}), 124,65 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 122,41 (>C=C(-CH₃)-), 120,35 (C(3 lub 5)_{PIRYDYNA}), 116,24 (C_{Ar}-CH₃), 107,28 (C_{Ar}-COO-), 68,98 (Ar-CH₂O-), 60,91 (Ar-OCH₃), 36,00 (HetAr-CH₂-CH₂-), 23,87 (HetAr-CH₂-CH₂-), 22,83 (Ar-CH₂-), 15,95 (=C(-CH₃)-), 11,39 (Ar-CH₃)

HRMS (m/z) obliczone dla C₂₃H₂₃N₃O₅ [M + H]⁺: 422,1710, zmierzone: 422,1710

Czystość: 98,90%; R_{T,HPLC} = 10,35 min

(*E*)-7-hidroksy-5-metoksy-4-metylo-6-(3-metylo-5-(5-(piryd-4-ylo)-1,3,4-oksadiazol-2-ylo)pent-2-en-1-ylo)izobenzofuran-1(3*H*)-on (**134OX_4-Py**)



Wydajność: 87%

Wygląd: beżowy proszek

Eluent: toluen:octan etylu, 1:1 (v/v)

R_F = 0,81 (toluen:aceton, 1:1, v/v)

¹H NMR: δ_H (400 MHz, 0,11 M, DMSO-*d*₆): 9,25 (bs, 1H, Ar-OH), 8,76 (dd, *J* = 4,5, 1,6 Hz, 2H, C_{HetAr}(2, 6)-H), 7,78 (dd, *J* = 4,5, 1,6 Hz, 2H, C_{HetAr}(3, 5)-H), 5,24 – 5,16 (m, 1H, >C=CH-), 5,13 (s, 2H, Ar-CH₂O-), 3,57 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,24 (d, *J* = 6,9 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 3,07 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H, HetAr-CH₂-), 2,46 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H, -CH₂-), 1,97 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,79 (s, 3H, -CH₃)

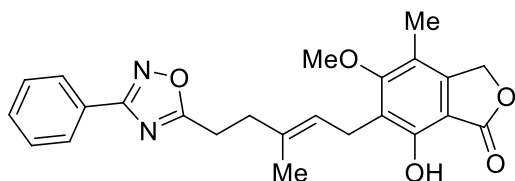
¹³C NMR: δ_C (101 MHz, 0,11 M, DMSO-*d*₆): 170,49 (COO-), 167,82 (C(2)_{OKSADIAZOL}), 162,82 (C_{Ar}OMe), 162,65 (C(5)_{OKSADIAZOL}), 153,06 (C_{Ar}-OH), 151,25 (2C, C(2, 6)_{PIRYDYNA}), 146,02 (C_{Ar}-CH₂O-), 132,81 (>C=C(-CH₃)-), 130,80 (C(4)_{PIRYDYNA}), 124,82 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 122,41 (>C=C(-CH₃)-), 120,22 (2C, C(3, 5)_{PIRYDYNA}), 116,24 (C_{Ar}-CH₃), 107,29 (C_{Ar}-COO-), 68,97 (Ar-CH₂O-), 60,91 (Ar-OCH₃), 35,94 (HetAr-CH₂-CH₂-), 23,92 (HetAr-CH₂-CH₂-), 22,83 (Ar-CH₂-), 15,94 (=C(-CH₃)-), 11,38 (Ar-CH₃)

HRMS (m/z) obliczone dla C₂₃H₂₃N₃O₅ [M + H]⁺: 422,1710, zmierzone: 422,1710

Czystość: 99,10%; R_{T,HPLC} = 10,08 min

Zestawienie właściwości pochodnych 1,2,4-oksadiazolu (124OX)

(*E*)-7-hydroksy-5-metoksy-4-metylo-6-(3-metylo-5-(3-fenyl-1,2,4-oksadiazol-5-yl)pent-2-en-1-yl)izobenzofuran-1(3*H*)-on (**124OX_Ph**)



Wydajność: 25%

Wygląd: kremowy proszek

Eluent: dichlorometan

R_F = 0,85 (toluen:aceton, 1:1, v/v)

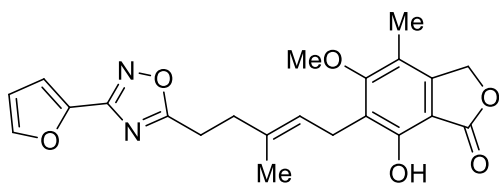
¹H NMR: δ_H (400 MHz, 0,10 M, DMSO-*d*₆): 9,29 (bs, 1H, Ar-OH), 7,95 – 7,85 (m, 2H, C_{Ar}(2, 6)-H), 7,63 – 7,46 (m, 3H, C_{Ar}(3, 4, 5)-H), 5,19 (t, J = 6,6 Hz, 1H, >C=CH-), 5,13 (s, 2H, Ar-CH₂O-), 3,60 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,27 (d, J = 6,8 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 3,08 (t, J = 7,4 Hz, 2H, HetAr-CH₂-), 2,47 (t, J = 7,4 Hz, 2H, -CH₂-), 1,98 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,78 (d, J = 14,1 Hz, 3H, -CH₃)

¹³C NMR: δ_C (101 MHz, 0,10 M, DMSO-*d*₆): 180,23 (C(5)_{OKSADIAZOL}), 170,56 (-COO-), 167,72 (C(3)_{OKSADIAZOL}), 162,87 (C_{Ar}-OMe), 153,09 (C_{Ar}-OH), 146,11 (C_{Ar}-CH₂O-), 132,78 (>C=C(-CH₃)-), 131,79 (C(6)_{FENYL}), 129,56 (2C, C(3, 5)_{FENYL}), 127,24 (2C, C(2, 6)_{FENYL}), 126,73 (C(1)_{FENYL}), 124,63 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 122,48 (>C=C(-CH₃)-), 116,27 (C_{Ar}-CH₃), 107,31 (C_{Ar}-COO-), 68,99 (Ar-CH₂O-), 60,91 (Ar-OCH₃), 35,99 (HetAr-CH₂-CH₂-), 25,11 (HetAr-CH₂-CH₂-), 22,86 (Ar-CH₂-), 16,15 (=C(-CH₃)-), 11,40 (Ar-CH₃)

HRMS (m/z) obliczone dla C₂₄H₂₄N₂O₅ [M-H]⁻: 421,1758, zmierzone: 421,1757

Czystość: 95,20%; R_{T,HPLC} = 13,29 min

(*E*)-6-(5-(3-(furan-2-yl)-1,2,4-oksadiazol-5-yl)-3-metylopent-2-en-1-yl)-7-hydroksy-5-metoksy-4-metyloizobenzofuran-1(3*H*)-on (**124OX_Fur**)



Wydajność: 43%

Wygląd: żółtawy proszek

Eluent: eter naftowy:octan etylu, 3:1 (v/v)

R_F = 0,78 (toluen:aceton, 1:1, v/v)

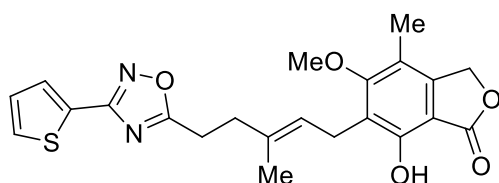
¹H NMR: δ_H (500 MHz, 0,03 M, DMSO-*d*₆): 9,31 (bs, 1H, Ar-OH), 7,96 (dd, J = 1,8, 0,7 Hz, 1H, C_{HetAr}(5)-H), 7,12 (dd, J = 3,5, 0,7 Hz, 1H, C_{HetAr}(3)-H), 6,72 (dd, J = 3,5, 1,8 Hz, 1H, C_{HetAr}(4)-H), 5,23 – 5,14 (m, 3H, >C=CH- + Ar-CH₂O-), 3,62 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,27 (d, J = 6,9 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 3,06 (t, J = 7,5 Hz, 2H, HetAr-CH₂-), 2,44 (t, J = 7,4 Hz, 2H, -CH₂-), 2,02 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,78 (d, J = 6,7 Hz, 3H, -CH₃)

¹³C NMR: δ_C (101 MHz, 0,11 M, DMSO-*d*₆): 180,12 (C(5)_{OKSADIAZOL}), 170,58 (-COO-), 162,91 (C_{Ar}-OMe), 160,79 (C(3)_{OKSADIAZOL}), 153,12 (C_{Ar}-OH), 146,68 (C(2)_{FURAN}), 146,18 (C_{Ar}-CH₂O-), 142,05 (C(5)_{FURAN}), 132,81 (>C=C(-CH₃)-), 124,58 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 122,53 (d, J = 6,4 Hz, (>C=C(-CH₃)-), 116,30 (C_{Ar}-CH₃), 114,42 (C(3 lub 4)_{FURAN}), 112,60 (C(3 lub 4)_{FURAN}), 107,34 (C_{Ar}-COO-), 69,03 (Ar-CH₂O-), 60,94 (Ar-OCH₃), 35,93 (HetAr-CH₂-CH₂-), 25,00 (HetAr-CH₂-CH₂-), 22,85 (Ar-CH₂-), 16,14 (=C(-CH₃)-), 11,44 (Ar-CH₃)

HRMS (m/z) obliczone dla C₂₂H₂₂N₂O₆ [M + H]⁺: 411,1551, zmierzone: 411,1546

Czystość: 97,60%; R_{T,HPLC} = 12,07 min

(*E*)-7-hidroksy-5-metoksy-4-metylo-6-(3-metylo-5-(3-(tiofen-2-ylo)-1,2,4-oksadiazol-5-ylo)pent-2-en-1-ylo)izobenzofuran-1(3*H*)-on (**124OX_Tien**)



Wydajność: 24%

Wygląd: brązowy proszek

Eluent: dichlorometan

R_F = 0,79 (toluen:aceton, 1:1, v/v)

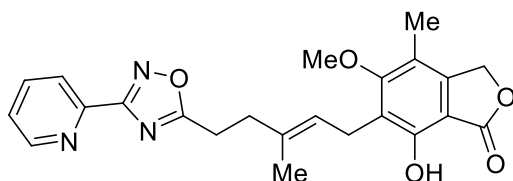
¹H NMR: δ_H (400 MHz, 0,04 M, DMSO-*d*₆): 9,29 (bs, 1H, Ar-OH), 7,85 (dd, J = 5,0, 1,2 Hz, 1H, C_{HetAr}(3)-H), 7,68 (dd, J = 3,7, 1,2 Hz, 1H, C_{HetAr}(5)-H), 7,23 (dd, J = 5,0, 3,7 Hz, 1H, C_{HetAr}(4)-H), 5,18 (d, J = 8,7 Hz, 3H, >C=CH- + Ar-CH₂O-), 3,61 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,27 (d, J = 6,9 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 3,06 (t, J = 7,5 Hz, 2H, HetAr-CH₂-), 2,44 (t, J = 7,4 Hz, 2H, -CH₂-), 2,00 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,79 (s, 3H, -CH₃)

¹³C NMR: δ_C (101 MHz, 0,10 M, DMSO-*d*₆): δ 180,12 (C(5)_{OKSADIAZOL}), 170,58 (-COO-), 162,91 (C_{Ar}-OMe), 160,79 (C(3)_{OKSADIAZOL}), 153,12 (C_{Ar}-OH), 146,68 (C(5)_{TIOFEN}), 146,18 (C_{Ar}-CH₂O-), 142,05 (C(2)_{TIOFEN}), 132,81 (>C=C(-CH₃)-), 124,58 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 122,50 (>C=C(-CH₃)-), 116,30 (C_{Ar}-CH₃), 114,42 (C(3 lub 4)_{TIOFEN}), 112,60 (C(3 lub 4)_{TIOFEN}), 107,34 (C_{Ar}-COO-), 69,03 (Ar-CH₂O-), 60,94 (Ar-OCH₃), 35,93 (HetAr-CH₂-CH₂-), 25,00 (HetAr-CH₂-CH₂-), 22,85 (Ar-CH₂-), 16,14 (=C(-CH₃)-), 11,44 (Ar-CH₃)

HRMS (m/z) obliczone dla C₂₂H₂₂N₂O₅S₁ [M + Na]⁺: 449,1142, zmierzone: 449,1141

Czystość: 97,60%; R_{T,HPLC} = 12,75 min

(E)-7-hydroksy-5-metoksy-4-metylo-6-(3-metylo-5-(3-(piryd-2-ylo)-1,2,4-oksadiazol-5-ylo)pent-2-en-1-ylo)izobenzofuran-1(3H)-on (**124OX_2-Py**)



Wydajność: 28%

Wygląd: pomarańczowy proszek

Eluent: eter naftowy:aceton, 3:1 (v/v)

R_F = 0,69 (toluen:aceton, 1:1, v/v)

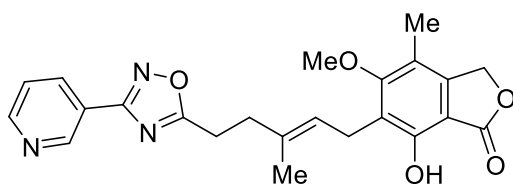
¹H NMR: δ_H (500 MHz, 0,03 M, DMSO-*d*₆): 9,33 (bs, 1H, Ar-OH), 8,72 (t, J = 8,1 Hz, 1H, C_{HetAr}(3)-H), 7,96 (ddd, J = 12,2, 9,2, 4,5 Hz, 2H, C_{HetAr}(3, 4)-H), 7,60 – 7,53 (m, 1H, C_{HetAr}(5)-H), 5,18 – 5,12 (m, 3H, >C=CH- + Ar-CH₂O-), 3,58 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,28 – 3,20 (m, 2H, Ar-CH₂-), 3,08 (t, J = 7,5 Hz, 2H, HetAr-CH₂-), 2,45 (t, J = 7,5 Hz, 2H, -CH₂-), 1,96 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,78 (s, 3H, -CH₃)

¹³C NMR: δ_C (101 MHz, 0,09 M, DMSO-*d*₆): 180,57 (C(5)_{OKSADIAZOL}), 170,65 (-COO-), 167,86 (C(3)_{OKSADIAZOL}), 162,90 (C_{Ar}-OMe), 153,55 (C_{Ar}-OH), 150,65 (C(6)_{PIRYDYNA}), 146,25 (C(2)_{PIRYDYNA}), 146,13 (C_{Ar}-CH₂O-), 138,00 (C(4)_{PIRYDYNA}), 132,76 (>C=C(-CH₃-), 126,37 (C(3)_{PIRYDYNA}), 124,68 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 123,53 (C(5)_{PIRYDYNA}), 122,53 (>C=C(-CH₃-), 115,95 (C_{Ar}-CH₃), 107,28 (C_{Ar}-COO-), 68,96 (Ar-CH₂O-), 60,92 (Ar-OCH₃), 35,98 (HetAr-CH₂-CH₂-), 25,15 (HetAr-CH₂-CH₂-), 22,87 (Ar-CH₂-), 16,16 (=C(-CH₃-), 11,41 (Ar-CH₃)

HRMS (m/z) obliczone dla C₂₃H₂₃N₃O₅ [M + H]⁺: 422,1710, zmierzone: 422,1708

Czystość: 99,40%; R_{T,HPLC} = 11,69 min

(E)-7-hydroksy-5-metoksy-4-metylo-6-(3-metylo-5-(3-(piryd-3-ylo)-1,2,4-oksadiazol-5-ylo)pent-2-en-1-ylo)izobenzofuran-1(3H)-on (**124OX_3-Py**)



Wydajność: 28%

Wygląd: żółte, niskotopliwe ciało stałe

Eluent: eter naftowy:aceton, 2:1 (v/v)

R_F = 0,62 (toluen:aceton, 1:1, v/v)

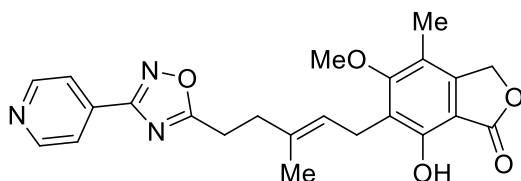
¹H NMR: δ_H (400 MHz, 0,12 M, DMSO-*d*₆): 9,29 (bs, 1H, Ar-OH), 9,01 (d, J = 1,5 Hz, 1H, C_{HetAr}(3)-H), 8,76 (dd, J = 4,8, 1,6 Hz, 1H, C_{HetAr}(6)-H), 8,28 – 8,18 (m, 1H, C_{HetAr}(4)-H), 7,63 – 7,51 (m, 1H, C_{HetAr}(5)-H), 5,21 – 5,11 (m, 3H, >C=CH- + Ar-CH₂O-), 3,60 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,26 (d, J = 6,8 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 3,17 – 3,04 (m, 2H, HetAr-CH₂-), 2,47 (t, J = 7,4 Hz, 2H, -CH₂-), 1,97 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,80 (s, 3H, -CH₃)

¹³C NMR: δ_C (101 MHz, 0,12 M, DMSO-*d*₆): 180,68 (C(5)_{OKSADIAZOL}), 170,53 (-COO-), 165,97 (C(3)_{OKSADIAZOL}), 162,85 (C_{Ar}-OMe), 153,08 (C_{Ar}-OH), 152,59 (C(2)_{PIRYDYNA}), 147,93 (C(6)_{PIRYDYNA}), 146,08 (C_{Ar}-CH₂O-), 134,78 (C(4)_{PIRYDYNA}), 132,65 (>C=C(-CH₃)-), 125,76 (C(3)_{PIRYDYNA}), 124,69 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 122,92 (C(5)_{PIRYDYNA}), 122,46 (>C=C(-CH₃)-), 116,25 (C_{Ar}-CH₃), 107,28 (C_{Ar}-COO-), 68,99 (Ar-CH₂O-), 60,90 (Ar-OCH₃), 35,97 (HetAr-CH₂-CH₂-), 25,08 (HetAr-CH₂-CH₂-), 22,86 (Ar-CH₂-), 16,11 (=C(-CH₃)-), 11,38 (Ar-CH₃)

HRMS (m/z) obliczone dla C₂₃H₂₃N₃O₅ [M + H]⁺: 422,1710, zmierzone: 422,1703

Czystość: 99,40%; R_{T,HPLC} = 11,93 min

(*E*)-7-hydroksy-5-metoksy-4-metylo-6-(3-metylo-5-(3-(piryd-4-ylo)-1,2,4-oksadiazol-5-ylo)pent-2-en-1-ylo)izobenzofuran-1(3*H*)-on (**124OX_4-Py**)



Wydajność: 22%

Wygląd: kremowy proszek

Eluent: eter naftowy:aceton, 3:1 (v/v)

R_F = 0,57 (toluen:aceton, 1:1, v/v)

¹H NMR: δ_H (500 MHz, 0,10 M, DMSO-*d*₆): 9,30 (bs, 1H, Ar-OH), 8,74 (d, J = 5,9 Hz, 2H, C_{HetAr}(2, 6)-H), 7,78 (dd, J = 4,5, 1,5 Hz, 2H, C_{HetAr}(3, 5)-H), 5,14 (t, J = 6,6 Hz, 1H, >C=CH-), 5,09 (s, 2H, Ar-CH₂O-), 3,57 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,22 (d, J = 6,9 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 3,10 (t, J = 7,4 Hz, 2H, HetAr-CH₂-), 2,44 (t, J = 7,3 Hz, 2H, -CH₂-), 1,94 (s, 3H, Ar-CH₃), 1,77 (s, 3H, -CH₃)

¹³C NMR: δ_C (126 MHz, 0,10 M, DMSO-*d*₆): 181,07 (C(5)_{OKSADIAZOL}), 170,48 (-COO-), 166,36 (C(3)_{OKSADIAZOL}), 162,80 (C_{Ar}-OMe), 153,04 (C_{Ar}-OH), 151,19 (2C, C(2, 6)_{PIRYDYNA}), 146,02 (C_{Ar}-CH₂O-), 133,87 (C(4)_{PIRYDYNA}), 132,61 (>C=C(-CH₃)-), 124,69 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 122,43 (>C=C(-CH₃)-), 121,14 (2C, C(3, 5)_{PIRYDYNA}), 116,21 (C_{Ar}-CH₃), 107,25 (C_{Ar}-COO-), 68,94 (Ar-CH₂O-), 60,88 (Ar-OCH₃), 35,91 (HetAr-CH₂-CH₂-), 25,09 (HetAr-CH₂-CH₂-), 22,82 (Ar-CH₂-), 16,09 (=C(-CH₃)-), 11,36 (Ar-CH₃)

HRMS (m/z) obliczone dla C₂₃H₂₃N₃O₅ [M + H]⁺: 422,1710, zmierzone: 422,1704

Czystość: 99,30%; R_{T,HPLC} = 11,87 min

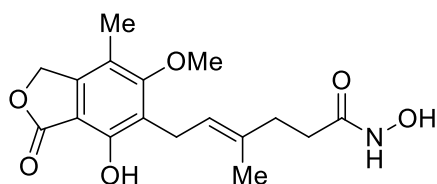
Metoda syntezy kwasu hydroksamowego MPA (MPA-CO-NH-OH)

Do kolby okrągłodennej wysuszonej w płomieniu palnika i przedmuchanej strumieniem argonu, wprowadzono 100 mg **MPA** (0,312 mmol, 1,0 eq) i zawieszono go w 5 mL suchego acetonitrylu. Następnie, w jednej porcji, dodano 57 mg HOBt·H₂O (0,375 mmol, 1,2 eq) i 120 mg TBTU (0,375 mmol, 1,2 eq). Po 10 min silnego mieszania, wkroplono 110 μ L DIPEA (d = 0,742 g·mL⁻¹, 0,624 mmol, 2,0 eq). Mieszano przez noc (około 15 godzin), w temperaturze pokojowej, w atmosferze gazu obojętnego, w celu uzyskania produktu aktywacji grupy karboksylowej. Po tym czasie, w osobnym naczyniu, zawieszono 44 mg chlorowodoru hydroksyloaminy (0,624

mmol, 2,0 eq) w 1 mL suchego acetonitrylu, a następnie, wkroplono do niej 110 μ L DIPEA ($d = 0,742 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 0,624 mmol, 2,0 eq). Zawiesinę z drugiego naczynia wkroplono przy pomocy pipety Pasteura do układu zawierającego aktywną formę **MPA**, po uprzednim schłodzeniu go do 0°C przy pomocy łaźni lodowej. Gęsta zawiesina była silnie mieszana w temperaturze pokojowej przez kolejną noc (około 15 godzin) i następnie rozcieńczona 10 mL octanu etylu i 10 mL wody destylowanej. Warstwę organiczną zachowano i ekstrahowano trzema porcjami po 5 mL octanu etylu i trzema porcjami po 5 mL dichlorometanu. Połączone warstwy organiczne przemyto 1 M roztworem kwasu solnego i nasyconą solanką. Fazę organiczną wysuszono nad bezwodnego siarczanu sodu, odsączono środek suszący i następnie zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszczano na kolumnie chromatograficznej w układach: toluen:aceton, 2:1 (v/v), i eter naftowy:aceton, 2:1 (v/v). Kwas hydroksamowy **MPA** uzyskano jako żółtawe, niskotopliwe ciało stałe o konsystencji smaru, z 33% wydajności. Jego czystość/strukturę potwierdzono stosując techniki NMR, MS i HPLC.

Zestawienie właściwości kwasu hydroksamowego MPA (MPA-CO-NH-OH)

(E)-N-hydroksy-6-(4-hydroksy-6-metoksy-7-metylo-3-okso-1,3-dihydroizobenzofuran-5-ylo)-4-metyloheks-4-enamid (**MPA-CO-NH-OH**)



Wydajność: 33%

Wygląd: żółtawe ciało stałe o konsystencji smaru

Eluent: toluene:aceton, 2:1 (v/v)

$R_F = 0,34$ (eter naftowy:aceton, 1:1, v/v)

^1H NMR: δ_H (500 MHz, 0,03 M, DMSO- d_6): 10,29 (s, 1H, -CO-NH-), 9,37 (s, 1H, Ar-OH), 8,65 (s, 1H, >N-OH), 5,22 (s, 2H, Ar-CH₂O-), 5,09 (t, $J = 6,3 \text{ Hz}$, 1H, -CH=C<), 3,67 (s, 3H, -OCH₃), 3,27 (d, $J = 6,5 \text{ Hz}$, 2H, Ar-CH₂-), 2,15 – 2,08 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CO-), 2,06 (s, 3H, Ar-CH₃), 2,01 – 1,94 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CO-), 1,71 (s, 3H, =(C-CH₃)-)

^{13}C NMR: δ_C (126 MHz, 0,12 M, DMSO- d_6): 170,56 (-COOCH₂-), 169,07 (-CH₂-CO-NH-), 162,99 (C_{Ar}-OMe), 153,12 (C_{Ar}-OH), 146,24 (C_{Ar}-CH₂O-), 134,30 (>C=C(-CH₃)-), 123,09 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 122,84 (>C=C(-CH₃)-), 116,40 (C_{Ar}-CH₃), 107,39 (C_{Ar}-COO-), 69,04 (Ar-CH₂O-), 61,08 (Ar-OCH₃), 35,39 (-CH₂-CH₂-CO-NH-), 31,60 (-CH₂-CH₂-CO-NH-), 22,86 (Ar-CH₂-), 16,39 (=C(-CH₃)-), 11,49 (Ar-CH₃)

HRMS (m/z) obliczone dla C₁₇H₂₁N₁O₆ [M + Na]⁺: 358,1261, zmierzone: 358,1247

Czystość: 98,00%; $R_{T,HPLC} = 8,54 \text{ min}$

Bezpośrednia metoda syntezy hydrazynu MPA (MPA-CO-NH-NH₂)

W kolbie okrągłodennej, zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne, zawieszono 100 mg **MPA** (0,312 mmol, 1,0 eq) w 4 mL suchego acetonitrylu (kilka kropel suchego DMF może

wspomóc rozpuszczanie). Następnie, wkroplono 13 μL hydratu hydrazyny ($c = 80\%$, $d = 1,02 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 0,312 mmol, 1,0 eq), a w dalszej kolejności — 109 μL DIPEA ($d = 0,742 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 0,624 mmol, 2,0 eq). Układ schłodzono do 0°C przy pomocy łaźni lodowej, a później dodano 48 mg $\text{HOBt}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (0,312 mmol, 1,0 eq) i 102 mg TBTU (0,312 mmol, 1,0 eq) w jednej porcji. Zawiesina była silnie mieszana przez noc (około 15 godzin) w temperaturze pokojowej i w atmosferze gazu obojętnego. Następnie, rozcieńczono ją 10 mL octanu etylu i ekstrahowano 1 M roztworem węglanu sodu i nasyconą solanką. Warstwę organiczną wysuszono bezwodnym siarczanem sodu, środek suszący odsączono, i rozpuszczalnik odgoniono pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt otrzymano jako biały proszek z 71% wydajnością. Jego struktura oraz czystość zostały określone w dalszej części opracowania.

Niebezpośrednia metoda syntezy hydrazynu MPA (MPA-CO-NH-NH_2)

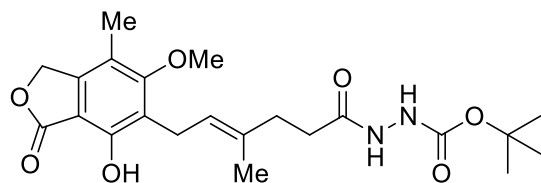
Synteza chronionego hydrazynu MPA (MPA-CO-NH-NHBoc)

Do wysuszonej w płomieniu palnika i przedmuchanej strumieniem argonu kolby okrągłodennej wprowadzono 200 mg **MPA** (0,624 mmol, 1,00 eq) i 86 mg karbazanu *t*-butylu* ($P = 98\%$, 0,637 mmol, 1,02 eq). Substraty rozpuszczono w 6 mL suchego dichlorometanu. Następnie, dodano 124 mg $\text{EDC}\cdot\text{HCl}$ (0,643 mmol, 1,03 eq), w jednej porcji. Układ mieszano w temperaturze pokojowej przez noc (około 15 godzin), w atmosferze gazu obojętnego. Po tym czasie, roztwór rozcieńczono 10 mL chlorku metylenu, warstwę organiczną odmyto nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu i nasyconą solanką. Fazę organiczną wysuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu, środek suszący odsączono, i zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Mieszaninę oczyszczano na kolumnie chromatograficznej z wykorzystaniem eluentu składającego się z eteru naftowego:acetonu, jak 3:1 (v/v). Produkt otrzymano w postaci szklistych kryształów z 75% wydajnością. Jego czystość i strukturę potwierdzono na podstawie technik NMR i MS.

* — jest to nazwa handlowa produktu; bardziej właściwa nazwa to: *N*-(*t*-butyloksykarbonylo)hydrazyna

Zestawienie właściwości chronionego hydrazynu MPA (MPA-CO-NH-NHBoc)

(*E*)-2-(6-(4-hydroksy-6-metoksy-7-metylo-3-okso-1,3-dihydroizobenzofuran-5-yl)-4-metyloheks-4-enoilo)hydrazynokarboksylan *t*-butylu (**MPA-CO-NH-NH-Boc**)



Wydajność: 75%

Wygląd: szkliste kryształy

Eluent: eter naftowy:aceton, 3:1 (v/v)

R_F = 0,69 (eter naftowy:aceton, 1:1, v/v)

¹H NMR: δ_H (500 MHz, 0,12 M, DMSO-*d*₆): 9,41 (s, 1H, -CO-NH-), 9,36 (bs, 1H, Ar-OH), 8,63 (s, 1H, -CO-NH-), 5,22 (s, 2H, Ar-CH₂O-), 5,11 (t, J = 6,7 Hz, 1H, -CH=C<), 3,67 (d, J = 6,1 Hz, 3H, -OCH₃), 3,28 (d, J = 6,8 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 2,16 – 2,04 (m, 7H, -CH₂-CH₂- + Ar-CH₃), 1,71 (d, J = 7,8 Hz, 3H, =C(CH₃)-), 1,34 (d, J = 16,3 Hz, 9H, -C(CH₃)₃)

¹³C NMR: δ_C (126 MHz, 0,12 M, DMSO-*d*₆): 171,82 (-CH₂-CO-NH-), 170,56 (-COOCH₂-), 163,00 (C_{Ar}-OMe), 155,66 (-NH-COO-*t*-Bu), 153,14 (C_{Ar}-OH), 146,24 (C_{Ar}-CH₂O-), 134,31 (>C=C(-CH₃)-), 123,07 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 122,83 (>C=C(-CH₃)-), 116,39 (C_{Ar}-CH₃), 107,40 (C_{Ar}-COO-), 79,39 (-C(CH₃)₃), 69,04 (Ar-CH₂O-), 61,09 (Ar-OCH₃), 35,08 (-CH₂-CH₂-CO-NH-), 32,53 (-CH₂-CH₂-CO-NH-), 28,40 (d, J = 19,8 Hz, 3C, -C(CH₃)₃), 22,86 (Ar-CH₂-), 16,44 (=C(-CH₃)-), 11,50 (Ar-CH₃)

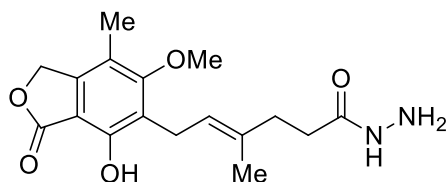
HRMS (m/z) obliczone dla C₂₂H₃₀N₂O₇ [M + H]⁺: 435,2126, zmierzone: 435,2136

Usuwanie grupy ochronnej Boc z chronionego hydrazynu MPA

W kolbie okrągłodennej rozpuszczono 559 mg chronionego hydrazynu **MPA** (1,269 mmol, 1,0 eq) w 10 mL suchego dichlorometanu. Roztwór schłodzono do 0°C, a następnie wkraplano 0,972 mL kwasu trifluorooctowego (TFA) (d = 1,489 g·mL⁻¹, 12,692 mmol, 10,0 eq) przez 15 minut. Gdy układ osiągnął ponownie temperaturę otoczenia, kolbę mieszano przy pomocy mieszadła magnetycznego przez dodatkowe 3 godziny i 45 min, kontrolując postęp reakcji przy pomocy TLC. Po tym czasie, nadmiar rozpuszczalnika odгонiono, a oleistą pozostałość przedmuchano strumieniem gazu obojętnego (w celu dokładniejszego odгонienia TFA możliwe jest współodparowywanie go z wysokowrzącym rozpuszczalnikiem, np. toluenem). Mieszaninę ponownie rozpuszczono w chlorku metylenu, roztwór schłodzono w łaźni lodowej, a następnie wkraplano nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu. Fazę organiczną odmywano nasyconą solanką, oddzielono od warstwy wodnej, wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu, środek suszący odsączono, a rozpuszczalnik odгонiono na wyparce próżniowej. Surowy produkt oczyszczano na kolumnie chromatograficznej w układach: toluen:octan etylu, 1:1 (v/v), oraz dichlorometan:metanol, 50:1 (v/v). Produkt otrzymano jako biały proszek z 28% wydajnością. Jego czystość oraz strukturę potwierdzono przy użyciu technik NMR, MS i HPLC.

Zestawienie właściwości hydrazynu MPA (MPA-CO-NH-NH₂)

(*E*)-6-(4-hydroksy-6-metoksy-7-metylo-3-okso-1,3-dihydroizobenzofuran-5-ylo)-4-metyloheks-4-enohydrazyn (**MPA-CO-NH-NH₂**)



Wydajność: 28%

Wygląd: biały proszek

Eluent: toluen:octan etylu, 1:1 (v/v), oraz dichlorometan:metanol, 50:1 (v/v)

R_F = 0,56 (toluen:aceton, 1:1, v/v)

¹H NMR: δ_H (500 MHz, 0,12 M, DMSO-*d*₆): 8,88 (s, 1H, -CO-NH-), 5,22 (s, 2H, Ar-CH₂O-), 5,08 (t, J = 6,3 Hz, 1H, -CH=C<), 4,29 (bs, 2H, -CO-NH-NH₂), 3,67 (s, 3H, -OCH₃), 3,26 (d, J = 6,6 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 2,20 – 1,95 (m, 7H, -CH₂-CH₂- + Ar-CH₃), 1,70 (s, 3H, =(C-CH₃)-)

¹³C NMR: δ_C (126 MHz, 0,12 M, DMSO-*d*₆): 171,60 (-CH₂-C(=O)-NH-), 170,56 (-COOCH₂-), 162,97 (C_{Ar}-OMe), 153,14 (C_{Ar}-OH), 146,23 (C_{Ar}-CH₂O-), 134,40 (>C=C(-CH₃)-), 123,00 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 122,87 (>C=C(-CH₃)-), 116,38 (C_{Ar}-CH₃), 107,39 (C_{Ar}-COO-), 69,03 (Ar-CH₂O-), 61,06 (Ar-OCH₃), 35,47 (-CH₂-CH₂-CO-NH-), 32,72 (-CH₂-CH₂-CO-NH-), 22,84 (Ar-CH₂-), 16,42 (=C(-CH₃)-), 11,49 (Ar-CH₃)

HRMS (m/z) obliczone dla C₁₇H₂₂N₂O₅ [M + H]⁺: 335,1601, zmierzone: 335,1599

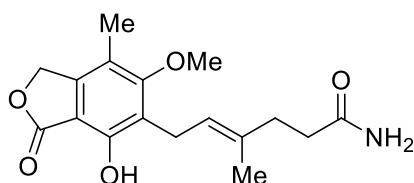
Czystość: 99,30%; R_{T,HPLC} = 8,12 min

Metoda syntezy pierwszorzędowego amidu MPA (MPA-CO-NH₂)

Do kolby okrągłodennej wysuszonej w płomieniu palnika i przedmuchanej strumieniem gazu obojętnego, wprowadzono 100 mg **MPA** (0,312 mmol, 1,0 eq) i 5 mL suchego acetonitrylu. Następnie, do uzyskanej zawiesiny dodano 57 mg HOBt·H₂O (0,375 mmol, 1,2 eq) i 120 mg TBTU (0,375 mmol, 1,2 eq), w jednej porcji. Po 10 minutach silnego mieszania, dodano 110 μ L DIPEA (d = 0,742 g·mL⁻¹, 0,624 mmol, 2,0 eq). Układ mieszano przez noc (około 15 godzin) w celu uzyskania aktywnej formy **MPA**. Po tym czasie, w osobnym naczyniu zmieszano 34 mg chlorku amonu (0,624 mmol, 2,0 eq), 218 μ L DIPEA (d = 0,742 g·mL⁻¹, 1,248 mmol, 4,0 eq) i 0.5 mL suchego DMF. Zawiesinę wkroplono przy pomocy pipety Pasteura do aktywowanego **MPA**, a następnie mieszano przez kolejną noc, w atmosferze gazu obojętnego. Uzyskaną zawiesinę rozcieńczono 10 mL octanu etylu i 10 mL wody destylowanej. Fazę organiczną zachowano. Warstwę wodną ekstrahowano trzema porcjami 5 mL octanu etylu, a także trzema porcjami chlorku metylenu, też po 5 mL każda. Zebrane warstwy organiczne odmywano 1 M roztworem węgla sodu, 1 M roztworem kwasu solnego i nasyconą solanką. Fazę organiczną osuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu, przesączono i zateżono pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszczono (w razie potrzeby) za pomocą chromatografii kolumnowej w układach: toluen:aceton, 2:1 (v/v), i eter naftowy:aceton, 2:1 (v/v). Produkt otrzymano w postaci białego proszku z wydajnością 72%. Jego czystość i strukturę scharakteryzowano za pomocą technik NMR, MS i HPLC.

Zestawienie właściwości pierwszorzędowego amidu MPA (MPA-CO-NH₂)

(*E*)-6-(4-hydroksy-6-metoksy-7-metylo-3-okso-1,3-dihydroizobenzofuran-5-yl)-4-metyloheks-4-enoamid (**MPA-CO-NH₂**)



Wydajność: 72%

Wygląd: biały proszek

Eluent: toluen:aceton, 2:1 (v/v), oraz eter naftowy:aceton, 2:1 (v/v)

R_F = 0,26 (eter naftowy:aceton, 1:1, v/v)

¹H NMR: δ_H (500 MHz, 0,14 M, DMSO-*d*₆): 9,38 (s, 1H, Ar-OH), 7,20 (s, 1H, NH=C-OH), 6,67 (s, 1H, NH=C-OH), 5,22 (s, 2H, Ar-CH₂O-), 5,09 (t, J = 6,8 Hz, 1H, -CH=C<), 3,67 (d, J = 1,8 Hz, 3H, -OCH₃), 3,27 (d, J = 6,8 Hz, 2H, Ar-CH₂-), 2,13 – 2,03 (m, 7H, -CH₂-CH₂- + Ar-CH₃), 1,71 (s, 3H, =(C-CH₃)-)

¹³C NMR: δ_C (126 MHz, 0,14 M, DMSO-*d*₆): 174,27 (-CH₂-C(=O)-NH₂), 170,57 (-C(=O)OCH₂-), 162,99 (C_{Ar}-OMe), 153,14 (C_{Ar}-OH), 146,22 (C_{Ar}-CH₂O-), 134,56 (>C=C(-CH₃)-), 122,91 (C_{Ar}-CH₂-CH=), 122,78 (>C=C(-CH₃)-), 116,37 (C_{Ar}-CH₃), 107,38 (C_{Ar}-COO-), 69,04 (Ar-CH₂O-), 61,07 (Ar-OCH₃), 35,26 (-CH₂-CH₂-CO-NH₂), 34,32 (-CH₂-CH₂-CO-NH₂), 22,85 (Ar-CH₂-), 16,51 (=C(-CH₃)-), 11,49 (Ar-CH₃)

HRMS (m/z) obliczone dla C₁₇H₂₁N₁O₅ [M + H]⁺: 320,1492, zmierzone: 320,1493

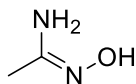
Czystość: 98,70%; R_{T,HPLC} = 8,69 min

Inne syntezy

Inne amidoksymy

Inne amidoksymy zostały otrzymane tą samą metodą co wcześniej. Ich charakterystyka jest bardziej zawężona, gdyż nie posłużyły do uzyskania docelowych bioizosterów w toku prac prowadzonych w czasie stażu w KU Leuven.

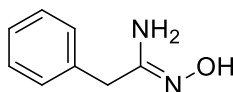
N'-hydroksymetylokarboksylimidoamid



Wydajność: 14%

¹H NMR: δ_H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 8,66 (bs, 1H, =N-OH), 5,62 – 5,14 (bs, 2H, -NH₂), 1,62 (s, 3H, CH₃-)

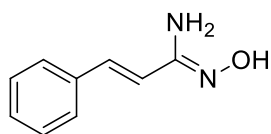
N'-hydroksy(1-fenylomet-1-ylo)karboksylimidoamid



Wydajność: 86%

¹H NMR: δ_H (400 MHz, CDCl₃): 8,75 (bs, 1H, =N-OH), 7,50 – 7,15 (m, 5H, C_{Ar}-H), 4,54 (bs, 2H, -NH₂), 3,49 (s, 2H, Ar-CH₂-)

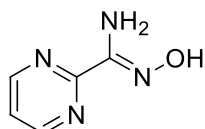
N'-hydroksy(2-fenyloteten-1-ylo)karboksylimidoamid



Wydajność: 61%

¹H NMR: δ_H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 9,74 (s, 1H, =N-OH), 7,53 – 7,46 (m, 2H, C_{Ar}(2, 6)-H), 7,37 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H, C_{Ar}(3, 5)-H), 7,31 – 7,25 (m, 1H, C_{Ar}(4)-H), 7,08 (d, *J* = 16,8 Hz, 1H, Ar-CH=CH-), 6,41 (d, *J* = 16,8 Hz, 1H, Ar-CH=CH-), 5,60 (bs, 2H, -NH₂)

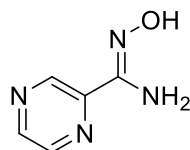
N'-hydroksypirymid-2-ylokarboksylimidoamid



Wydajność: 20%

¹H NMR: δ_H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10,22 (s, 1H, =N-OH), 8,90 (dd, *J* = 44,1, 4,9 Hz, 2H, C_{HetAr}(4, 6)-H), 7,52 (t, *J* = 4,9 Hz, 1H, C_{HetAr}(5)-H), 5,85 (bs, 2H, -NH₂)

N'-hydroksypirazyn-2-ylokarboksylimidoamid



Wydajność: 47%

¹H NMR: δ_H (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10,24 (s, 1H, =N-OH), 9,07 (d, *J* = 1,4 Hz, 1H, C_{HetAr}(3)-H), 8,76 – 8,52 (m, 2H, C_{HetAr}(5, 6)-H), 5,96 (bs, 2H, -NH₂)

Otrzymywanie bioizosterycznej pochodnej RS-ibuprofenu (134OX_Ibu)

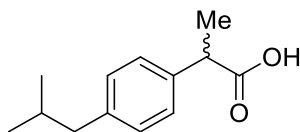
Izolacja RS-ibuprofenu z produktu farmaceutycznego

W kolbie okrągłodennej umieszczono 9,783 g zmielonych tabletek leku Ibuprom® (USP Zdrowie, Warszawa, Polska), pochodzących ze zmielenia w młynku 20 tabletek powlekanych tego preparatu (20 x 200 mg). W celu uniknięcia przedostania się substancji barwnych (Opacode Black S-1-17823) z nazwy leku umieszczonej na tabletkach do roztworu, zmasowano ją uprzednio z wykorzystaniem acetonu i ręcznika papierowego. Uzyskany proszek zadano 30 mL chloroformu i mieszano w temperaturze pokojowej, przy użyciu mieszadła magnetycznego, przez co najmniej 1 godzinę. Po tym czasie, zawiesinę przesączono na lejku spiekowym, a przesącz zatężono na próżniowym, rotacyjnym aparacie wyparnym. Uzyskany produkt używano w dalszym etapie bez dodatkowego oczyszczania. *rac*-Ibuprofen otrzymano jako biały proszek z wydajnością odzysku 99% (3,94 g). Jego czystość i strukturę określono przy użyciu techniki ¹H NMR.



Zestawienie właściwości *RS*-ibuprofenu

kwask *rac*-2-(4-izobutylofenylo)propanowy (**Ibu**)



Wydajność ekstrakcji ciało stałe-ciecz: 99%

R_F = 0,78 (eter naftowy:aceton, 1:1, v/v); 0,15 (dichlorometan)

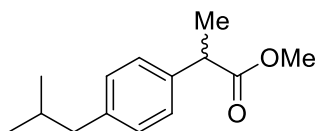
^1H NMR: δ_H (500 MHz, 0,20 M, CDCl_3): 11,45 (bs, 1H, $-\text{COOH}$), 7,23 (d, J = 8,0 Hz, 2H, C_{Ar} (2, 6)-H), 7,11 (d, J = 8,0 Hz, 2H, C_{Ar} (3, 5)-H), 3,71 (q, J = 7,2 Hz, 1H, $>\text{CH}-\text{CH}_3$), 2,45 (d, J = 7,2 Hz, 2H, $\text{Ar}-\text{CH}_2-$), 1,85 (dp, J = 13,5, 6,8 Hz, 1H, $-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 1,50 (d, J = 7,2 Hz, 3H, $>\text{CH}-\text{CH}_3$), 0,90 (d, J = 6,6 Hz, 6H, $-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$)

Metoda syntezy estru metylowego *RS*-ibuprofenu

W kolbie okrągłodennej, zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną z rurką zabezpieczającą przed dostępem wilgoci, umieszczono 2,02 g *rac*-ibuprofenu (9,793 mmol, 1,0 eq) i zawieszono w 50 mL bezwodnego metanolu. Następnie, wdroplono 0,6 mL stężonego kwasu siarkowego (VI) (c = 96%), stale mieszając. Układ ogrzewano w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez co najmniej noc (około 15 godzin). Po tym czasie, kolbę schłodzono do temperatury pokojowej, a rozpuszczalnik odgoniono na wyparce próżniowej. Do oleistej mieszaniny dodawano porcjami nasycony roztwór wodorowęglanu sodu, aż do odczynu obojętnego, co sprawdzono przy pomocy papierka wskaźnikowego, a następnie mieszaninę ekstrahowano kilkukrotnie octanem etylu. Warstwę organiczną odmyto nasyconą solanką. Fazę organiczną wysuszono następnie nad bezwodnym siarczanem magnezu, środek suszący odsączono, a przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt otrzymano w postaci żółtego oleju o zapachu cytrusów, z wydajnością 97% (2,1 g), i użyto w takiej formie w kolejnym etapie. Jego czystość i strukturę potwierdzono przy pomocy techniki ^1H NMR.

Zestawienie właściwości estru metylowego *RS*-ibuprofenu

rac-2-(4-izobutylofenylo)propanian metylu (**Ibu-CO₂Me**)



Wydajność: 97%

R_F = 0,73 (dichlorometan)

^1H NMR: δ_H (500 MHz, 0,19 M, CDCl_3): 7,20 (d, J = 8,0 Hz, 2H, C_{Ar} (2, 6)-H), 7,10 (d, J = 8,0 Hz, 2H, C_{Ar} (3, 5)-H), 3,73 – 3,67 (m, 1H, $>\text{CH}-\text{CH}_3$), 3,66 (s, 3H, $-\text{COOCH}_3$), 2,45 (d, J = 7,2 Hz, 2H, $\text{Ar}-\text{CH}_2-$), 1,85 (dp, J = 13,5, 6,7 Hz, 1H, $-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 1,49 (d, J = 7,2 Hz, 3H, $>\text{CH}-\text{CH}_3$), 0,90 (d, J = 6,6 Hz, 6H, $-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$)

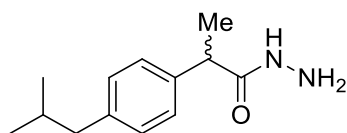


Metoda syntezy hydrazynu *RS*-ibuprofenu

Związek ten otrzymano tą samą metodą co inne hydrazydy. Ilości użytych reagentów: 2,04 g *rac*-2-(4-izobutylofenylo)propanianu metylu (9,264 mmol, 1,0 eq), 1,46 mL hydratu hydrazyny ($c = 80\%$, $d = 1,02 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 37,057 mmol, 4,0 eq), 5 mL 96% etanolu. Układ ogrzewano w temperaturze wrzenia przez około 40 godzin. W związku z potencjalną hydrolizą estru przez wydłużony czas ogrzewania wraz z hydrazyną, wykonano ekstrakcję w środowisku zasadowym (nasycony roztwór wodorowęglanu sodu wobec octanu etylu). Produkt otrzymano jako biały proszek z wydajnością 80% (1,63 g). Czystość i strukturę substratu określono przy pomocy techniki ^1H NMR.

Zestawienie właściwości hydrazynu *RS*-ibuprofenu

hydrazyn kwasu *rac*-2-(4-izobutylofenylo)propanowego (**Ibu-CO-NH-NH₂**)



Wydajność: 80%

R_F = 0,34 (eter naftowy:octan etylu, 1:1, v/v)

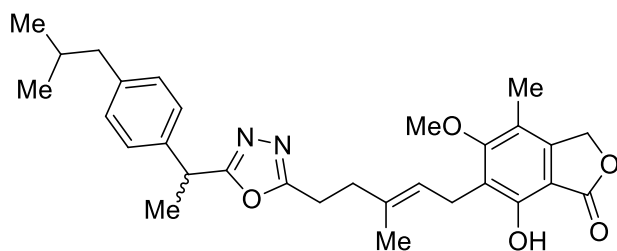
^1H NMR: δ_{H} (500 MHz, 0,12 M, DMSO- d_6): 9,15 (s, 1H, -CO-NH-NH₂), 7,20 (t, $J = 6,8 \text{ Hz}$, 2H, C_{Ar}(2, 6)-H), 7,04 (d, $J = 7,9 \text{ Hz}$, 2H, C_{Ar}(3, 5)-H), 4,16 (s, 2H, -CO-NH-NH₂), 3,47 (q, $J = 7,0 \text{ Hz}$, 1H, >CH-CH₃), 2,41 – 2,34 (m, 2H, Ar-CH₂-), 1,82 – 1,71 (m, 1H, -CH-(CH₃)₂), 1,29 (d, $J = 7,0 \text{ Hz}$, 3H, >CH-CH₃), 0,82 (d, $J = 6,6 \text{ Hz}$, 6H, -CH-(CH₃)₂)

Synteza bioizosteru

134OX_Ibu uzyskano w podobny sposób co pozostałe bioizostery. Różnica polega na użyciu roztworu T3P w DMF, a nie w octanie etylu, jak w pozostałych przypadkach. Ilości użytych reagentów: 200 mg **MPA** (0,624 mmol, 1,0 eq), 137,5 mg hydrazynu kwasu *rac*-2-(4-izobutylofenylo)propanowego (0,624, 1,0 eq), 350 μL trietyloaminy ($d = 0,726 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 252,7 mg, 2,497 mmol, 4,0 eq), 912 μL 50% roztworu T3P w DMF ($c = 50\%$, $d = 1,09 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 496,6 mg, 2,5 eq), 5 mL suchego toluenu, 1 mL suchego 1,4-dioksanu. Surowy związek oczyszczano na kolumnie chromatograficznej z użyciem eluentu: eter naftowy:octan etylu, 2:1 (v/v). Produkt otrzymano jako żółty olej z wydajnością 26% (84 mg). Jego czystość i strukturę określono przy pomocy techniki ^1H NMR.

Zestawienie właściwości pochodnej bioizosterycznej (**134OX_Ibu**)

rac-(*E*)-7-hydroksy-6-(5-(5-(1-(4-izobutylofenylo)etylo)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)-3-metylopent-2-en-1-yl)-5-metoksy-4-metyloizobenzofuran-1(3*H*)-on (**134OX_Ibu**)



Wydajność: 26%

Wygląd: żółty olej

Eluent: eter naftowy:octan etylu, 2:1 (v/v)

R_F = 0,24 (eter naftowy:octan etylu, 2:1, v/v)

¹H NMR: δ_H (500 MHz, 0,04 M, DMSO-*d*₆): 9,37 (s, 1H, **MPA**: Ar-OH), 7,07 (q, J = 8,2 Hz, 4H, Ibu: C_{Ar}-H), 5,22 (s, 2H, **MPA**: Ar-CH₂O-), 5,07 (t, J = 6,3 Hz, 1H, **MPA**: >C=CH-), 4,27 (q, J = 7,1 Hz, 1H, Ibu: >CH-CH₃), 3,60 (s, 3H, **MPA**: Ar-OCH₃), 3,22 (d, J = 6,8 Hz, 2H, **MPA**: Ar-CH₂-), 2,84 (t, J = 7,4 Hz, 2H, HetAr-CH₂-CH₂-), 2,36 (d, J = 7,2 Hz, 2H, Ibu: Ar-CH₂-), 2,26 (t, J = 7,3 Hz, 2H, HetAr-CH₂-CH₂-), 2,05 (s, 3H, **MPA**: Ar-CH₃), 1,80 – 1,71 (m, 1H, Ibu: -CH-(CH₃)₂), 1,69 (s, 3H, **MPA**: =(C-CH₃)-), 1,50 (d, J = 7,2 Hz, 3H, Ibu: >CH-CH₃), 0,81 (d, J = 6,6 Hz, 6H, Ibu: -CH-(CH₃)₂)

7.3.5. Badania biologiczne

Badania przesiewowe na serii linii komórek nowotworowych

Hodowla komórkowa i związki referencyjne

Linie komórek nowotworowych Capan-1, HCT-116, NCI-H460, LN-229, HL-60, K562 oraz Z-138 były pozyskane od American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA), a linia DND-41 została zakupiona od Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ Leibniz-Institut, Niemcy). Wszystkie linie komórkowe były hodowane zgodnie z zaleceniami producenta. Pożywka została pozyskana od Gibco Life Technologies i wzbogacona o 10% płodową surowicę bydlęcą (HyClone, GE Healthcare Life Sciences).

Test proliferacyjny

Komórki adherentne (Capan-1, HCT-116, NCI-H450, LN-229) zostały wysiane w stężeniu mieszczącym się pomiędzy 500 a 1500 komórek/dołek w teście 384-dołkowym (Greiner). Po całonocnym inkubowaniu, komórki zostały potraktowane różnymi stężeniami badanych substancji.

Komórki zawiesinowe (DND-41, HL-60, K562, Z-138) były zasiane w stężeniach 2,5-5,5·10³ komórek/dołek, także w hodowli 384-dołkowej. Komórki te zostały potraktowane tymi samymi stężeniami bioizosterycznych pochodnych **MPA**.

Po 72 godzinach inkubowania wraz ze związkami, określono przeżywalność komórek z wykorzystaniem testu CellTiter 96® AQueous One Solution Cell zgodnie z zaleceniami producenta. Absorbancja roztworów została zmierzona przy długości fali równej 490 nm wykorzystując spektrofotometr SpectraMax Plus 384, a wartości gęstości optycznej posłużyły do

określenia 50% stężenia cytotoksycznego (CC_{50}). Każdy związek był poddany testom dwukrotnie, w niezależnych eksperymentach.

Literatura

- [1] Beyar R. Challenges in Organ Transplantation. *RMMJ* 2011;2. <https://doi.org/10.5041/rmmj.10049>.
- [2] Ingulli E. Mechanism of cellular rejection in transplantation. *Pediatr Nephrol* 2010;25:61–74. <https://doi.org/10.1007/s00467-008-1020-x>.
- [3] Aguirre LE, Guzman ME, Lopes G, Hurley J. Immune Checkpoint Inhibitors and the Risk of Allograft Rejection: A Comprehensive Analysis on an Emerging Issue. *The Oncologist* 2018;24:394–401. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2018-0195>.
- [4] Bamoulid J, Staeck O, Halleck F, Khadzhynov D, Brakemeier S, Dürr M, et al. The need for minimization strategies: current problems of immunosuppression. *Transpl Int* 2015;28:891–900. <https://doi.org/10.1111/tri.12553>.
- [5] Patro J, Priyadarsini P. Mycophenolic acid: a drug with a potential beyond renal transplantation. *Int J Res Med Sci* 2016;3666–9. <https://doi.org/10.18203/2320-6012.ijrms20162898>.
- [6] Seifirad S, Ghaffari A, Amoli MM. The antioxidants dilemma: are they potentially immunosuppressants and carcinogens? *Front Physiol* 2014;5. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00245>.
- [7] Bentley R. Mycophenolic Acid: A One Hundred Year Odyssey from Antibiotic to Immunosuppressant. *Chem Rev* 2000;100:3801–26. <https://doi.org/10.1021/cr990097b>.
- [8] Covarrubias-Zúñiga A, Ríos-Barrios E. A Convenient One-Pot Method for the Construction of Tetrasubstituted Phenols through a Michael Addition–Aldol Cyclization Sequence. *J Org Chem* 1997;62:5688–9. <https://doi.org/10.1021/jo9704669>.
- [9] Covarrubias-Zúñiga A, González-Lucas A. A total synthesis of mycophenolic acid. *Tetrahedron Letters* 1998;39:2881–2. [https://doi.org/10.1016/s0040-4039\(98\)00423-7](https://doi.org/10.1016/s0040-4039(98)00423-7).
- [10] Halle MB, Lee W, Yudhistira T, Kim M, Churchill DG. Mycophenolic Acid: Biogenesis, Compound Isolation, Biological Activity, and Historical Advances in Total Synthesis. *Eur J Org Chem* 2019;2019:2315–34. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201900245>.
- [11] Brookes PA, Cordes J, White AJP, Barrett AGM. Total Synthesis of Mycophenolic Acid by a Palladium-Catalyzed Decarboxylative Allylation and Biomimetic Aromatization Sequence. *Eur J Org Chem* 2013;2013:7313–9. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201300974>.
- [12] Halle MB, Yudhistira T, Lee W-H, Mulay SV, Churchill DG. Diels–Alder and Stille Coupling Approach for the Short Protecting-Group-Free Synthesis of Mycophenolic Acid, Its Phenylsulfenyl and Phenylselenenyl Analogues, and Reactive Oxygen Species (ROS) Probing Capacity in Water. *Org Lett* 2018;20:3557–61. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b01327>.
- [13] Regueira TB, Kildegaard KR, Hansen BG, Mortensen UH, Hertweck C, Nielsen J. Molecular Basis for Mycophenolic Acid Biosynthesis in *Penicillium brevicompactum*. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:3035–43. <https://doi.org/10.1128/aem.03015-10>.
- [14] Kida T, Ishikawa T, Shibai H. Method for production of mycophenolic acid by fermentation. US patent 4452891A, 1984. <https://patents.google.com/patent/US4452891A/en> (dost. dn. 10.12.24 r.).
- [15] Alani F, Grove JA, Anderson WA, Moo-Young M. Mycophenolic acid production in solid-state fermentation using a packed-bed bioreactor. *Biochemical Engineering Journal* 2009;44:106–10. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.11.005>.
- [16] Digits JA, Hedstrom L. Species-Specific Inhibition of Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase by Mycophenolic Acid. *Biochemistry* 1999;38:15388–97. <https://doi.org/10.1021/bi991558q>.
- [17] Anderson WK, Boehm TL, Makara GM, Swann RT. Synthesis and Modeling Studies with Monocyclic Analogues of Mycophenolic Acid. *J Med Chem* 1996;39:46–55. <https://doi.org/10.1021/jm9501339>.
- [18] Maciolek CM, Ma B, Menzel K, Laliberte S, Bateman K, Krolkowski P, et al. Novel Cytochrome P450-Mediated Ring Opening of the 1,3,4-Oxadiazole in Setileuton, a 5-Lipoxygenase Inhibitor. *Drug Metab Dispos* 2011;39:763–70. <https://doi.org/10.1124/dmd.110.037366>.
- [19] Hedstrom L. IMP Dehydrogenase: Structure, Mechanism, and Inhibition. *Chem Rev* 2009;109:2903–28. <https://doi.org/10.1021/cr900021w>.
- [20] NOTO T, SAWADA M, ANDO K, KOYAMA K. SOME BIOLOGICAL PROPERTIES OF MYCOPHENOLIC ACID. *J Antibiot* 1969;22:165–9. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.22.165>.
- [21] Kato F, Matsuyama S, Kawase M, Hishiki T, Katoh H, Takeda M. Antiviral activities of mycophenolic acid and IMD-0354 against SARS-CoV-2. *Microbiology and Immunology* 2020;64:635–9. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12828>.
- [22] CARTER SB, FRANKLIN TJ, JONES DF, LEONARD BJ, MILLS SD, TURNER RW, et al. Mycophenolic Acid: an Anti-cancer Compound with Unusual Properties. *Nature* 1969;223:848–50. <https://doi.org/10.1038/223848a0>.
- [23] Klangjorhor J, Chaiyawat P, Teeyakasem P, Sirikaew N, Phanphaisarn A, Settakorn J, et al. Mycophenolic acid is a drug with the potential to be repurposed for suppressing tumor growth and metastasis in osteosarcoma treatment. *Intl Journal of Cancer* 2019;146:3397–409. <https://doi.org/10.1002/ijc.32735>.
- [24] Ferjani H, Achour A, Bacha H, Abid S. Tacrolimus and mycophenolate mofetil associations. *Hum Exp Toxicol* 2015;34:1119–32. <https://doi.org/10.1177/0960327115569812>.

- [25] Ingle GR, Shah T. Enteric-coated mycophenolate sodium for transplant immunosuppression. *American Journal of Health-System Pharmacy* 2005;62:2252–9. <https://doi.org/10.2146/ajhp040380>.
- [26] Elbarbry FA, Shoker A. Simple high performance liquid chromatographic assay for mycophenolic acid in renal transplant patients. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2007;43:788–92. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.08.012>.
- [27] Vogt B, Golshayan, Pascual. Mycophenolic acid formulations in adult renal transplantation - update on efficacy and tolerability. *TCRM* 2009;341. <https://doi.org/10.2147/tcrm.s3496>.
- [28] Elbarbry FA, Shoker AS. Therapeutic drug measurement of mycophenolic acid derivatives in transplant patients. *Clinical Biochemistry* 2007;40:752–64. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2007.03.006>.
- [29] Betonico G, Abbud-Filho M, Goloni-Bertollo E, Pavarino É. Pharmacogenetics of mycophenolate mofetil: A promising different approach to tailoring immunosuppression?. *Journal of Nephrology* 2008;21:503-9.
- [30] Ohyama K, Kinoshita N, Kishikawa N, Kuroda N. A simple and rapid CZE method for the analysis of mycophenolic acid and its phenol glucuronide metabolite in human serum. *Electrophoresis* 2008;29:3658–64. <https://doi.org/10.1002/elps.200700952>.
- [31] Royal Devon University Healthcare NHS Foundation Trust. Mycophenolate and mycophenolic acid: Patient information leaflet [Internet]. Exeter: Royal Devon University Healthcare NHS Foundation Trust. https://www.royaldevon.nhs.uk/media/2fndycw3/patient-information-leaflet-mycophenolate_-and_mycophenolic_acid-rde-23-028-001.pdf (dost. dn. 10.12.24 r.).
- [32] National Library of Medicine. Mycophenolate (Oral Route) [Internet]. MedlinePlus. <https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a601081.html> (dost. dn. 10.12.24 r.).
- [33] Hirunsatitpon P, Hanprasertpong N, Noppakun K, Pruksakorn D, Teekachunhatean S, Koonrungsesomboon N. Mycophenolic acid and cancer risk in solid organ transplant recipients: Systematic review and meta-analysis. *Brit J Clinical Pharma* 2021;88:476–89. <https://doi.org/10.1111/bcp.14979>.
- [34] Sahman M, Mugosa S, Rancic N. Utilization of Mycophenolic Acid, Azathioprine, Tacrolimus, Cyclosporin, Sirolimus, and Everolimus: Multinational Study. *Front Public Health* 2021;9. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.671316>.
- [35] Nousari HC, Sragovich A, Kimyai-Asadi A, Orlinsky D, Anhalt GJ. Mycophenolate mofetil in autoimmune and inflammatory skin disorders. *Journal of the American Academy of Dermatology* 1999;40:265–8. [https://doi.org/10.1016/s0190-9622\(99\)70203-3](https://doi.org/10.1016/s0190-9622(99)70203-3).
- [36] Shigesaka M, Ito T, Inaba M, Imai K, Yamanaka H, Azuma Y, et al. Mycophenolic acid, the active form of mycophenolate mofetil, interferes with IRF7 nuclear translocation and type I IFN production by plasmacytoid dendritic cells. *Arthritis Res Ther* 2020;22. <https://doi.org/10.1186/s13075-020-02356-z>.
- [37] Schiff M, Beaulieu A, Scott DL, Rashford M. Mycophenolate Mofetil in the Treatment of Adults with Advanced Rheumatoid Arthritis. *Clinical Drug Investigation* 2010;30:613–24. <https://doi.org/10.2165/11537460-000000000-00000>.
- [38] Prejs M, Cholewinski G, Siebert A, Trzonkowski P, Dzierzbicka K. New conjugates of mycophenolic acid and their antiproliferative activity. *Journal of Asian Natural Products Research* 2016;18:1057–62. <https://doi.org/10.1080/10286020.2016.1184653>.
- [39] Lee S, Ku AF, Vippila MR, Wang Y, Zhang M, Wang X, et al. Mycophenolic anilides as broad specificity inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) inhibitors. *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters* 2020;30:127543. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127543>.
- [40] Siebert A, Deptuła M, Cichorek M, Ronowska A, Cholewiński G, Rachon J. Anticancer Properties of Amino Acid and Peptide Derivatives of Mycophenolic Acid. *ACAMC* 2021;21:462–7. <https://doi.org/10.2174/187152062066200516151456>.
- [41] BATOVSKA DI, KIM DH, MITSUHASHI S, CHO YS, KWON HJ, UBUKATA M. Hydroxamic Acid Derivatives of Mycophenolic Acid Inhibit Histone Deacetylase at the Cellular Level. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2008;72:2623–31. <https://doi.org/10.1271/bbb.80303>.
- [42] Peng Y, Dong Y, Mahato RI. Synthesis and Characterization of a Novel Mycophenolic Acid–Quinic Acid Conjugate Serving as Immunosuppressant with Decreased Toxicity. *Mol Pharmaceutics* 2015;12:4445–53. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00639>.
- [43] Wu H, Pagadala J, Yates CR, Miller DuaneD, Mahato RI. Synthesis and Characterization of an Anti-Apoptotic Immunosuppressive Compound for Improving the Outcome of Islet Transplantation. *Bioconjugate Chem* 2013;24:2036–44. <https://doi.org/10.1021/bc400369t>.
- [44] Pilevneli AD, Ebada SS, Kaşkatepe B, Konuklugil B. Penicacids H–J, three new mycophenolic acid derivatives from the marine-derived fungus *Rhizopus oryzae*. *RSC Adv* 2021;11:34938–44. <https://doi.org/10.1039/d1ra07196c>.
- [45] Silalai P, Teeyakasem P, Pruksakorn D, Saeeng R. Design and Synthesis of Mycophenolic Acid Analogues for Osteosarcoma Cancer Treatment. *ACS Bio Med Chem Au* 2024. <https://doi.org/10.1021/acsbiochemau.4c00079>.
- [46] Zehiroglu C, Ozturk Sarikaya SB. The importance of antioxidants and place in today's scientific and technological studies. *J Food Sci Technol* 2019;56:4757–74. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03952-x>.

- [47] Charlton NC, Mastuygin M, Török B, Török M. Structural Features of Small Molecule Antioxidants and Strategic Modifications to Improve Potential Bioactivity. *Molecules* 2023;28:1057. <https://doi.org/10.3390/molecules28031057>.
- [48] Flora SJS. Structural, Chemical and Biological Aspects of Antioxidants for Strategies Against Metal and Metalloid Exposure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2009;2:191–206. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.4.9112>.
- [49] Munteanu IG, Apetrei C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *IJMS* 2021;22:3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>.
- [50] Deeth HC. Heat-induced inactivation of enzymes in milk and dairy products. A review. *International Dairy Journal* 2021;121:105104. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105104>.
- [51] Cell Biolabs, Inc. Superoxide Dismutase (SOD) Assay [Internet]. <https://www.cellbiolabs.com/superoxide-dismutase-sod-assay> (dost. dn. 10.12.24 r.).
- [52] Sigma-Aldrich. Superoxide Dismutase Assay Kit (CS0009) [Internet]. <https://www.sigmaaldrich.com/PL/pl/product/sigma/cs0009> (dost. dn. 10.12.24 r.).
- [53] Hayyan M, Hashim MA, AlNashef IM. Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chem Rev* 2016;116:3029–85. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00407>.
- [54] Ihsan AU, Khan FU, Khongorzul P, Ahmad KA, Naveed M, Yasmeen S, et al. Role of oxidative stress in pathology of chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome and male infertility and antioxidants function in ameliorating oxidative stress. *Biomedicine&Pharmacotherapy* 2018;106:714–23. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.139>.
- [55] Sigma-Aldrich. CGP1 [Internet]. <https://www.sigmaaldrich.com/PL/pl/product/sigma/cgp1> (dost. dn. 10.12.24 r.).
- [56] Iwase T, Tajima A, Sugimoto S, Okuda K, Hironaka I, Kamata Y, et al. A Simple Assay for Measuring Catalase Activity: A Visual Approach. *Sci Rep* 2013;3. <https://doi.org/10.1038/srep03081>.
- [57] Thermo Fisher Scientific. EIACATC [Internet]. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EIACATC?SID=srch-srp-EIACATC> (dost. dn. 10.12.24 r.).
- [58] Wimalasena K, Dharmasena S. Continuous Spectrophotometric Assay for Ascorbate Oxidase Based on a Novel Chromophoric Substrate, 2-Aminoascorbic Acid. *Analytical Biochemistry* 1993;210:58–62. <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1150>.
- [59] BioAssay Systems. Ascorbic Acid Assay Kit [Internet]. <https://bioassaysys.com/ascorbic-acid-assay-kit/> (dost. dn. 10.12.24 r.).
- [60] Haida Z, Hakiman M. A comprehensive review on the determination of enzymatic assay and nonenzymatic antioxidant activities. *Food Science&Nutrition* 2019;7:1555–63. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1012>.
- [61] Kerber RC. "As Simple as Possible, but Not Simpler"—The Case of Dehydroascorbic Acid. *J Chem Educ* 2008;85:1237. <https://doi.org/10.1021/ed085p1237>.
- [62] MIMURA T, YAZAKI K, SAWAKI K, OZAWA T, KAWAGUCHI M. Hydroxyl radical scavenging effects of guaiacol used in traditional dental pulp sedation: Reaction kinetic study. *Biomed Res* 2005;26:139–45. <https://doi.org/10.2220/biomedres.26.139>.
- [63] Schranz M, Lorber K, Klos K, Kerschbaumer J, Buettner A. Influence of the chemical structure on the odor qualities and odor thresholds of guaiacol-derived odorants, Part 1: Alkylated, alkenylated and methoxylated derivatives. *Food Chemistry* 2017;232:808–19. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.070>.
- [64] Duffey SS, Aldrich JR, Blum MS. Biosynthesis of phenol and guaiacol by the hemipteran *Leptoglossus phyllopus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 1977;56:101–2. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(77\)90029-3](https://doi.org/10.1016/0305-0491(77)90029-3).
- [65] Michałowicz J. The Natural and Anthropogenic Processes Responsible for the Presence of Methoxyphenols in Ecosystems and Human Surrounding. *Rocznik Ochrony Środowiska. Wydawnictwo Polskiej Akademii Nauk* [Internet]. https://ros.edu.pl/images/roczniki/archive/pp_2008_010.pdf (dost. dn. 10.12.24 r.).
- [66] Virk MS, Issenberg P. Effects of phenol and 2, 6-dimethoxyphenol (syringol) on in vivo formation of N-nitrosomorpholine in rats. *Carcinogenesis* 1986;7:867–70. <https://doi.org/10.1093/carcin/7.6.867>.
- [67] 任春和 et al. Method for synthesizing 2,6-dimethoxyphenol. CN patent CN106631714A, 2017. <https://patents.google.com/patent/CN106631714A/en>.
- [68] Wu J, Fu Y-S, Lin K, Huang X, Chen Y, Lai D, et al. A narrative review: The pharmaceutical evolution of phenolic syringaldehyde. *Biomedicine&Pharmacotherapy* 2022;153:113339. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113339>.
- [69] González-Sarriás A, Li L, Seeram NP. Anticancer effects of maple syrup phenolics and extracts on proliferation, apoptosis, and cell cycle arrest of human colon cells. *Journal of Functional Foods* 2012;4:185–96. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.10.004>.
- [70] Malçok ÜA, Aras AB, Şehitoğlu MH, Akman T, Yüksel Y. Therapeutic effects of syringaldehyde on spinal cord ischemia in rabbits. *SMJ* 2020;41:341–50. <https://doi.org/10.15537/smj.2020.4.24993>.

- [71] Creighton RHJ, McCarthy JL, Hibbert H. Aromatic Aldehydes from Spruce and Maple Woods. *J Am Chem Soc* 1941;63:312–312. <https://doi.org/10.1021/ja01846a501>.
- [72] Pearl IA. Method of synthesizing syringaldehyde. US patent US2516412A, 1950. <https://patents.google.com/patent/US2516412A/en>.
- [73] Arya SS, Rookes JE, Cahill DM, Lenka SK. Vanillin: a review on the therapeutic prospects of a popular flavouring molecule. *ADV TRADIT MED (ADTM)* 2021;21:1–17. <https://doi.org/10.1007/s13596-020-00531-w>.
- [74] Kumar C, Mubarak MM, Singh CP, Chauhan N, Satti NK, Yadav G, et al. Synthetic modification of dehydrozingerone and their biological evaluation for anti-tubercular and anti-inflammatory potency. *Results in Chemistry* 2023;5:100934. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2023.100934>.
- [75] Yogosawa S, Yamada Y, Yasuda S, Sun Q, Takizawa K, Sakai T. Dehydrozingerone, a Structural Analogue of Curcumin, Induces Cell-Cycle Arrest at the G2/M Phase and Accumulates Intracellular ROS in HT-29 Human Colon Cancer Cells. *J Nat Prod* 2012;75:2088–93. <https://doi.org/10.1021/np300465f>.
- [76] Lin S, Li Y, Zamyatin AA Jr, Werner J, Bazhin AV. Reactive oxygen species and colorectal cancer. *Journal Cellular Physiology* 2018;233:5119–32. <https://doi.org/10.1002/jcp.26356>.
- [77] Kuo P-C, Chheng C-Y, Jeng J-F, Damu AG, Teng C-M, Lee E-J, et al. Isolation of a Natural Antioxidant, Dehydrozingerone from Zingiber officinale and Synthesis of Its Analogues for Recognition of Effective Antioxidant and Antityrosinase Agents. *Arch Pharm Res* 2005;28:518–28. <https://doi.org/10.1007/bf02977752>.
- [78] Murdiah, Pranowo D, Raharjo TJ. Synthesis of Zingerone Using NiCl₂•6H₂O-NaBH₄ as a Selective Hydrogenation Reaction Agent. *MSF* 2019;948:127–32. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/msf.948.127>.
- [79] Ahmad B, Rehman MU, Amin I, Arif A, Rasool S, Bhat SA, et al. A Review on Pharmacological Properties of Zingerone (4-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-butanone). *The Scientific World Journal* 2015;2015. <https://doi.org/10.1155/2015/816364>.
- [80] Heo KT, Park KW, Won J, Lee B, Jang J-H, Ahn J-O, et al. Construction of an Artificial Biosynthetic Pathway for Zingerone Production in *Escherichia coli* Using Benzalacetone Synthase from *Piper methysticum*. *J Agric Food Chem* 2021;69:14620–9. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c05534>.
- [81] Pyrzynska K. Ferulic Acid—A Brief Review of Its Extraction, Bioavailability and Biological Activity. *Separations* 2024;11:204. <https://doi.org/10.3390/separations11070204>.
- [82] Ulanowska M, Olas B. Biological Properties and Prospects for the Application of Eugenol—A Review. *IJMS* 2021;22:3671. <https://doi.org/10.3390/ijms22073671>.
- [83] Topal F. Anticholinergic and antidiabetic effects of isoeugenol from clove (*Eugenia caryophyllata*) oil. *International Journal of Food Properties* 2019;22:583–92. <https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1597882>.
- [84] Jan K, Ho C, Hwang LS. Elimination and metabolism of sesamol, a bioactive compound in sesame oil, in rats. *Molecular Nutrition Food Res* 2009;53. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800214>.
- [85] Ma X, Wang Z, Zheng C, Liu C. A comprehensive review of bioactive compounds and processing technology of sesame seed. *Oil Crop Science* 2022;7:88–94. <https://doi.org/10.1016/j.ocsci.2022.05.003>.
- [86] Markus RL. Process for producing sesamol. US patent US3058995A, 1962. <https://patents.google.com/patent/US3058995A/en>.
- [87] Nagoor Meeran MF, Javed H, Al Taei H, Azimullah S, Ojha SK. Pharmacological Properties and Molecular Mechanisms of Thymol: Prospects for Its Therapeutic Potential and Pharmaceutical Development. *Front Pharmacol* 2017;8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00380>.
- [88] Jafarnik K, Halina E, Ercisli S, Szopa A. Characteristics of bakuchiol - the compound with high biological activity and the main source of its acquisition - *Cullen corylifolium* (L.) Medik. *Natural Product Research* 2020;35:5828–42. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1837813>.
- [89] Khuranna D, Sharma S, Mir SR, Aqil M, Ahmad A, Rehman MU, et al. Extraction, Quantification, and Cytokine Inhibitory Response of Bakuchiol in *Psoralea coryfolia* Linn. *Separations* 2020;7:48. <https://doi.org/10.3390/separations7030048>.
- [90] Adarsh Krishna TP, Edachery B, Athalathil S. Bakuchiol – a natural meroterpenoid: structure, isolation, synthesis and functionalization approaches. *RSC Adv* 2022;12:8815–32. <https://doi.org/10.1039/d1ra08771a>.
- [91] Taofiq O, González-Paramás A, Barreiro M, Ferreira I. Hydroxycinnamic Acids and Their Derivatives: Cosmeceutical Significance, Challenges and Future Perspectives, a Review. *Molecules* 2017;22:281. <https://doi.org/10.3390/molecules22020281>.
- [92] Cui P, Zhong W, Qin Y, Tao F, Wang W, Zhan J. Characterization of two new aromatic amino acid lyases from actinomycetes for highly efficient production of p-coumaric acid. *Bioprocess Biosyst Eng* 2020;43:1287–98. <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02325-5>.
- [93] Levy CC, Weinstein GD. The Metabolism of Coumarin by a Microorganism. II. The Reduction of o-Coumaric Acid to Melilotic Acid. *Biochemistry* 1964;3:1944–7. <https://doi.org/10.1021/bi00900a027>.
- [94] Ganji LR, Gandhi L, Musturi V, Kanyalkar MA. Design, synthesis, and evaluation of different scaffold derivatives against NS2B-NS3 protease of dengue virus. *Med Chem Res* 2020;30:285–301. <https://doi.org/10.1007/s00044-020-02660-y>.

- [95] CAO Y, CHU Q, YE J. Chromatographic and electrophoretic methods for pharmaceutically active compounds in *Rhododendron dauricum*. *Journal of Chromatography B* 2004;812:231–40. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.06.048>.
- [96] Mattila P, Kumpulainen J. Determination of Free and Total Phenolic Acids in Plant-Derived Foods by HPLC with Diode-Array Detection. *J Agric Food Chem* 2002;50:3660–7. <https://doi.org/10.1021/jf020028p>.
- [97] Rechner AR, Wagner E, van Buren L, van de Put F, Wiseman S, Rice-Evans CA. Black Tea Represents a Major Source of Dietary Phenolics Among Regular Tea Drinkers. *Free Radical Research* 2002;36:1127–35. <https://doi.org/10.1080/1071576021000006707>.
- [98] Kang CW, Han YE, Kim J, Oh JH, Cho YH, Lee EJ. 4-Hydroxybenzaldehyde accelerates acute wound healing through activation of focal adhesion signalling in keratinocytes. *Sci Rep* 2017;7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14368-y>.
- [99] Ha J-H, Lee D-U, Lee J-T, Kim J-S, Yong C-S, Kim J-A, et al. 4-Hydroxybenzaldehyde from *Gastrodia elata* B1. is active in the antioxidation and GABAergic neuromodulation of the rat brain. *Journal of Ethnopharmacology* 2000;73:329–33. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(00\)00313-5](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(00)00313-5).
- [100] Eddouks M, Bidi A, Bouhali BEL, Zeggwagh NA. Insulin Resistance as a Target of Some Plant-Derived Phytocompounds. *Studies in Natural Products Chemistry* 2014;351–73. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63430-6.00011-4>.
- [101] Metivier P. Method for preparing a 4-hydroxybenzaldehyde and derivatives. US patent US6184421B1, 2001. <https://patents.google.com/patent/US6184421B1/en>.
- [102] Bauer K, Steuer W. Process for preparing aromatic hydroxyaldehydes. US patent US4163759A, 1979. <https://patents.google.com/patent/US4163759A/en>.
- [103] Ducki S, Hadfield JA, Hepworth LA, Lawrence NJ, Liu C-Y, McGown AT. Synthesis and cell growth inhibitory properties of substituted (E)-1-phenylbut-1-en-3-ones. *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters* 1997;7:3091–4. [https://doi.org/10.1016/s0960-894x\(97\)10147-0](https://doi.org/10.1016/s0960-894x(97)10147-0).
- [104] Guantai EM, Ncokazi K, Egan TJ, Gut J, Rosenthal PJ, Bhampidipati R, et al. Enone– and Chalcone–Chloroquinoline Hybrid Analogues: In Silico Guided Design, Synthesis, Antiplasmodial Activity, in Vitro Metabolism, and Mechanistic Studies. *J Med Chem* 2011;54:3637–49. <https://doi.org/10.1021/jm200149e>.
- [105] Motohashi N, Takahashi A, Yamagami C, Saito Y. Antioxidant Effects of Hydroxybenzalacetones on Peroxynitrite-Induced Lipid Peroxidation in Red Blood Cell Membrane Ghost and SOS Response in *Salmonella typhimurium* TA4107/pSK1002. *Chem Pharm Bull* 2005;53:1003–5. <https://doi.org/10.1248/cpb.53.1003>.
- [106] Fouad D, Badr A, Attia HA. Hepatoprotective activity of raspberry ketone is mediated via inhibition of the NF- κ B/TNF- α /caspase axis and mitochondrial apoptosis in chemically induced acute liver injury. *Toxicology Research* 2019;8:663–76. <https://doi.org/10.1039/c9tx00068b>.
- [107] Rao S, Kurakula M, Mamidipalli N, Tiyyagura P, Patel B, Manne R. Pharmacological Exploration of Phenolic Compound: Raspberry Ketone—Update 2020. *Plants* 2021;10:1323. <https://doi.org/10.3390/plants10071323>.
- [108] Martins P, Jesus J, Santos S, Raposo L, Roma-Rodrigues C, Baptista P, et al. Heterocyclic Anticancer Compounds: Recent Advances and the Paradigm Shift towards the Use of Nanomedicine's Tool Box. *Molecules* 2015;20:16852–91. <https://doi.org/10.3390/molecules200916852>.
- [109] Vitaku E, Smith DT, Njardarson JT. Analysis of the Structural Diversity, Substitution Patterns, and Frequency of Nitrogen Heterocycles among U.S. FDA Approved Pharmaceuticals. *J Med Chem* 2014;57:10257–74. <https://doi.org/10.1021/jm501100b>.
- [110] Organic Chemistry Portal. Thiazoles [Internet]. <https://www.organic-chemistry.org/synthesis/heterocycles/thiazoles.shtm> (dost. dn. 10.12.24 r.).
- [111] Wang X, Qiu X, Wei J, Liu J, Song S, Wang W, et al. Cu-Catalyzed Aerobic Oxidative Sulfuration/Annulation Approach to Thiazoles via Multiple Csp³–H Bond Cleavage. *Org Lett* 2018;20:2632–6. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b00840>.
- [112] Ishiwata Y, Togo H. Facile Preparation of Thiazoles from 1H-1-(1'-Alkynyl)-5-methyl-1,2,3-benziodoxathiole 3,3-Dioxide with Thioamides. *Synlett* 2008;2008:2637–41. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1083439>.
- [113] Botta M, Castagnolo D, Pagano M, Bernardini M. Domino Alkylation-Cyclization Reaction of Propargyl Bromides with Thioureas/Thiopyrimidinones: A New Facile Synthesis of 2-Aminothiazoles and 5H-Thiazolo[3,2-a]pyrimidin-5-ones. *Synlett* 2009;2009:2093–6. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1217700>.
- [114] de Souza M, Facchinetti V, Avellar M, Nery A, Gomes C, Vasconcelos T. An Eco-friendly, Hantzsch-Based, Solvent-Free Approach to 2-Aminothiazoles and 2-Aminoselenazoles. *Synthesis* 2015;48:437–40. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1560534>.
- [115] Organic Chemistry Portal. Benzothiazoles [Internet]. <https://www.organic-chemistry.org/synthesis/heterocycles/benzo-fused/benzothiazoles.shtm> (dost. dn. 10.12.24 r.).
- [116] Zhang J, Zhao X, Liu P, Sun P. TBHP/KI-Promoted Annulation of Anilines, Ethers, and Elemental Sulfur: Access to 2-Aryl-, 2-Heteroaryl-, or 2-Alkyl-Substituted Benzothiazoles. *J Org Chem* 2019;84:12596–605. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b02145>.

- [117] Dadwal S, Kumar M, Bhalla V. "Metal-Free" Nanoassemblies of AIEE-ICT-Active Pyrazine Derivative: Efficient Photoredox System for the Synthesis of Benzimidazoles. *J Org Chem* 2020;85:13906–19. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.0c01965>.
- [118] Dey A, Hajra A. Metal-Free Synthesis of 2-Arylbenzothiazoles from Aldehydes, Amines, and Thiocyanate. *Org Lett* 2019;21:1686–9. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.9b00245>.
- [119] Telvekar V, Bachhav H, Bairwa V. A Novel System for the Synthesis of 2-Aminobenzthiazoles using Sodium Dichloroiodate. *Synlett* 2012;23:2219–22. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1317080>.
- [120] Organic Chemistry Portal. Benzoxazoles [Internet]. <https://www.organic-chemistry.org/synthesis/heterocycles/benzo-fused/benzoxazoles.shtm> (dost. dn. 10.12.24 r.).
- [121] Patra A, James A, Das TK, Biju AT. Oxidative NHC Catalysis for the Generation of Imidoyl Azoliums: Synthesis of Benzoxazoles. *J Org Chem* 2018;83:14820–6. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b02598>.
- [122] Tran PH, Dang M-HD, Nguyen LHT. Sulfur/DABCO Promoted Reductive Coupling/Annulation Cascade Reaction between o-Hydroxy/Amino Nitrobenzenes and Benzaldehydes. *Synthesis* 2020;52:1687–94. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1690823>.
- [123] Srivastava V, Yadav L. Visible-Light-Triggered Oxidative C–H Aryloxylation of Phenolic Amidines; Photocatalytic Preparation of 2-Aminobenzoxazoles. *Synlett* 2013;24:2758–62. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1340150>.
- [124] Kasthuri M, Babu H, Kumar K, Sudhakar Ch, Kumar P. A Facile Synthesis of 2-Aminobenzoxazoles and 2-Aminobenzimidazoles Using N-Cyano-N-phenyl-p-toluenesulfonamide (NCTS) as an Efficient Electrophilic Cyanating Agent. *Synlett* 2015;26:897–900. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1380166>.
- [125] Organic Chemistry Portal. Benzimidazoles [Internet]. <https://www.organic-chemistry.org/synthesis/heterocycles/benzo-fused/benzimidazoles.shtm> (dost. dn. 10.12.24 r.).
- [126] Zhu X, Zhang F, Kuang D, Deng G, Yang Y, Yu J, et al. K₂S as Sulfur Source and DMSO as Carbon Source for the Synthesis of 2-Unsubstituted Benzothiazoles. *Org Lett* 2020;22:3789–93. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.0c00994>.
- [127] Wang Y, She J, Jiang Z. One-Pot Synthesis of Functionalized Benzimidazoles and 1H-Pyrimidines via Cascade Reactions of o-Aminoanilines or Naphthalene-1,8-diamine with Alkynes and p-Tolylsulfonyl Azide. *Synlett* 2009;2009:2023–7. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1217515>.
- [128] Xue D, Long Y-Q. Metal-Free TEMPO-Promoted C(sp³)–H Amination To Afford Multisubstituted Benzimidazoles. *J Org Chem* 2014;79:4727–34. <https://doi.org/10.1021/jo5005179>.
- [129] Pattarawarapan M, Duangkamol C, Phakhodee W. Potassium Periodate Mediated Oxidative Cyclodesulfurization toward Benzofused Nitrogen Heterocycles. *Synthesis* 2020;52:1981–90. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1690855>.
- [130] Organic Chemistry Portal. Pyrimidines [Internet]. <https://www.organic-chemistry.org/synthesis/heterocycles/pyrimidines.shtm> (dost. dn. 10.12.24 r.).
- [131] Jadhav SD, Singh A. Oxidative Annulations Involving DMSO and Formamide: K₂S₂O₈ Mediated Syntheses of Quinolines and Pyrimidines. *Org Lett* 2017;19:5673–6. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.7b02838>.
- [132] Chu X-Q, Cao W-B, Xu X-P, Ji S-J. Iron Catalysis for Modular Pyrimidine Synthesis through β -Ammoniation/Cyclization of Saturated Carbonyl Compounds with Amidines. *J Org Chem* 2017;82:1145–54. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.6b02767>.
- [133] Zhan J-L, Wu M-W, Chen F, Han B. Cu-Catalyzed [3 + 3] Annulation for the Synthesis of Pyrimidines via β -C(sp³)–H Functionalization of Saturated Ketones. *J Org Chem* 2016;81:11994–2000. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.6b02181>.
- [134] Su L, Sun K, Pan N, Liu L, Sun M, Dong J, et al. Cyclization of Ketones with Nitriles under Base: A General and Economical Synthesis of Pyrimidines. *Org Lett* 2018;20:3399–402. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b01324>.
- [135] Organic Chemistry Portal. 1,2,4-Oxadiazoles [Internet]. <https://www.organic-chemistry.org/synthesis/heterocycles/1,2,4-oxadiazoles.shtm> (dost. dn. 10.12.24 r.).
- [136] Augustine JK, Akabote V, Hegde SG, Alagarsamy P. PTSA–ZnCl₂: An Efficient Catalyst for the Synthesis of 1,2,4-Oxadiazoles from Amidoximes and Organic Nitriles. *J Org Chem* 2009;74:5640–3. <https://doi.org/10.1021/jo900818h>.
- [137] Adib M, Mahdavi M, Mahmoodi N, Pirelahi H, Bijanzadeh H. A Novel, One-Pot, Three-Component Synthesis of 1,2,4-Oxadiazoles under Microwave Irradiation and Solvent-Free Conditions. *Synlett* 2006;2006:1765–7. <https://doi.org/10.1055/s-2006-944200>.
- [138] Bian Q, Wu C, Yuan J, Shi Z, Ding T, Huang Y, et al. Iron Nitrate-Mediated Selective Synthesis of 3-Acyl-1,2,4-oxadiazoles from Alkynes and Nitriles: The Dual Roles of Iron Nitrate. *J Org Chem* 2020;85:4058–66. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b03070>.
- [139] Li Y, Gao M, Liu B, Xu B. Copper nitrate-mediated chemo- and regioselective annulation from two different alkynes: a direct route to isoxazoles. *Org Chem Front* 2017;4:445–9. <https://doi.org/10.1039/c6qo00704j>.

- [140] Wehrli PA, Schaer B. Direct transformation of primary nitro compounds into nitriles. New syntheses of .alpha.,.beta.-unsaturated nitriles and cyanohydrin acetates. *J Org Chem* 1977;42:3956–8. <https://doi.org/10.1021/jo00444a037>.
- [141] Mercalli V, Massarotti A, Varese M, Giustiniano M, Meneghetti F, Novellino E, et al. Multicomponent Reaction of Z-Chlorooximes, Isocyanides, and Hydroxylamines as Hypernucleophilic Traps. A One-Pot Route to Aminodioximes and Their Transformation into 5-Amino-1,2,4-oxadiazoles by Mitsunobu–Beckmann Rearrangement. *J Org Chem* 2015;80:9652–61. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b01676>.
- [142] Organic Chemistry Portal. 1,3,4-Oxadiazoles [Internet]. <https://www.organic-chemistry.org/synthesis/heterocycles/1,3,4-oxadiazoles.shtm> (dost. dn. 10.12.24 r.).
- [143] Gao Q, Liu S, Wu X, Zhang J, Wu A. Direct Annulation of Hydrazides to 1,3,4-Oxadiazoles via Oxidative C(CO)–C(Methyl) Bond Cleavage of Methyl Ketones. *Org Lett* 2015;17:2960–3. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b01241>.
- [144] Ding C, Zhang G, Yu Y, Zhao Y, Xie X. Iron(III)/TEMPO-Catalyzed Synthesis of 2,5-Disubstituted 1,3,4-Oxadiazoles by Oxidative Cyclization under Mild Conditions. *Synlett* 2017;28:1373–7. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1588747>.
- [145] Niu P, Kang J, Tian X, Song L, Liu H, Wu J, et al. Synthesis of 2-Amino-1,3,4-oxadiazoles and 2-Amino-1,3,4-thiadiazoles via Sequential Condensation and I2-Mediated Oxidative C–O/C–S Bond Formation. *J Org Chem* 2014;80:1018–24. <https://doi.org/10.1021/jo502518c>.
- [146] Yadav L, Kapoor R, Singh S, Tripathi S. Photocatalytic Oxidative Heterocyclization of Semicarbazones: An Efficient Approach for the Synthesis of 1,3,4-Oxadiazoles. *Synlett* 2015;26:1201–6. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1380493>.
- [147] Sprangers B, Pirenne J, Mathieu C, Waer M. Other Forms of Immunosuppression. *Kidney Transplantation - Principles and Practice* 2019:313–32. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-53186-3.00020-6>.
- [148] Li S, Luan G, Ren X, Song W, Xu L, Xu M, et al. Rational Design of Benzyldenehydrazinyl-Substituted Thiazole Derivatives as Potent Inhibitors of Human Dihydroorotate Dehydrogenase with in Vivo Anti-arthritis Activity. *Sci Rep* 2015;5. <https://doi.org/10.1038/srep14836>.
- [149] Zhao Y, Qian Y, Sun Z, Shen X, Cai Y, Li L, et al. Role of PI3K in the Progression and Regression of Atherosclerosis. *Front Pharmacol* 2021;12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.632378>.
- [150] GeneCards. PIK3CA Gene [Internet]. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PIK3CA> (dost. dn. 10.12.24 r.).
- [151] D'Angelo ND, Kim T-S, Andrews K, Booker SK, Caenepeel S, Chen K, et al. Discovery and Optimization of a Series of Benzothiazole Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K)/Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Dual Inhibitors. *J Med Chem* 2011;54:1789–811. <https://doi.org/10.1021/jm1014605>.
- [152] Lang F, Shumilina E. Regulation of ion channels by the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *FASEB j* 2012;27:3–12. <https://doi.org/10.1096/fj.12-218230>.
- [153] Lai Y, Luo X, Guo H, Wang S, Xiong J, Yang S, et al. PO-322 exerts potent immunosuppressive effects in vitro and in vivo by selectively inhibiting SGK1 activity. *British J Pharmacology* 2020;177:1666–76. <https://doi.org/10.1111/bph.14926>.
- [154] Gartlan KH, Jaiswal JK, Bull MR, Akhlaghi H, Sutton VR, Alexander KA, et al. Preclinical Activity and Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Relationship for a Series of Novel Benzenesulfonamide Perforin Inhibitors. *ACS Pharmacol Transl Sci* 2022;5:429–39. <https://doi.org/10.1021/acsptsci.2c00009>.
- [155] Lyons DM, Huttunen KM, Browne KA, Ciccone A, Trapani JA, Denny WA, et al. Inhibition of the cellular function of perforin by 1-amino-2,4-dicyanopyrido[1,2-a]benzimidazoles. *Bioorganic&Medicinal Chemistry* 2011;19:4091–100. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.05.013>.
- [156] Hauser SL, Cree BAC. Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *The American Journal of Medicine* 2020;133:1380–1390.e2. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2020.05.049>.
- [157] Montalban X, Wallace D, Genovese MC, Tomic D, Parsons-Rich D, Le Bolay C, et al. Characterisation of the safety profile of evobrutinib in over 1000 patients from phase II clinical trials in multiple sclerosis, rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: an integrated safety analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2022;94:1–9. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2022-328799>.
- [158] Strasser DS, Froidevaux S, Sippel V, Gerossier E, Grieder U, Pierlot GM, et al. Preclinical to clinical translation of cenerimod, a novel S1P1receptor modulator, in systemic lupus erythematosus. *RMD Open* 2020;6:e001261. <https://doi.org/10.1136/rmdopen-2020-001261>.
- [159] Idorsia. Idorsia announces positive results from the Phase 3 clinical trial of daridorexant in patients with insomnia [Internet]. <https://www.idorsia.com/media/news-details?newsId=2895813> (dost. dn. 10.12.24 r.).
- [160] Pohlmeier CW, Shang C, Han P, Cui Z-H, Jones RM, Clarke AS, et al. Characterization of the mechanism of action of lanraplenib, a novel spleen tyrosine kinase inhibitor, in models of lupus nephritis. *BMC Rheumatol* 2021;5. <https://doi.org/10.1186/s41927-021-00178-3>.
- [161] Grimster NP, Gingipalli L, Barlaam B, Su Q, Zheng X, Watson D, et al. Optimization of a series of potent, selective and orally bioavailable SYK inhibitors. *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters* 2020;30:127433. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127433>.

- [162] Daško M, de Pascual-Teresa B, Ortín I, Ramos A. HDAC Inhibitors: Innovative Strategies for Their Design and Applications. *Molecules* 2022;27:715. <https://doi.org/10.3390/molecules27030715>.
- [163] Park S-Y, Kim J-S. A short guide to histone deacetylases including recent progress on class II enzymes. *Exp Mol Med* 2020;52:204–12. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0382-4>.
- [164] Seto E, Yoshida M. Erasers of Histone Acetylation: The Histone Deacetylase Enzymes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2014;6:a018713–a018713. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018713>.
- [165] Park J, Terranova-Barberio M, Zhong AY, Thomas S, Munster PN. Clinical Applications of Histone Deacetylase Inhibitors. *Handbook of Epigenetics* 2017:605–21. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-805388-1.00040-7>.
- [166] Li T, Zhang C, Hassan S, Liu X, Song F, Chen K, et al. Histone deacetylase 6 in cancer. *J Hematol Oncol* 2018;11. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0654-9>.
- [167] Sidera K, Patsavoudi E. HSP90 Inhibitors: Current Development and Potential in Cancer Therapy. *PRA* 2013;9:1–20. <https://doi.org/10.2174/15748928113089990031>.
- [168] Sidera K, Patsavoudi E. HSP90 Inhibitors: Current Development and Potential in Cancer Therapy. *PRA* 2013;9:1–20. <https://doi.org/10.2174/15748928113089990031>. Pinzi L, Benedetti R, Altucci L, Rastelli G. Design of Dual Inhibitors of Histone Deacetylase 6 and Heat Shock Protein 90. *ACS Omega* 2020;5:11473–80. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00559>.
- [169] Vanhaecke T, Papeleu P, Elaut G, Rogiers V. Trichostatin A - like Hydroxamate Histone Deacetylase Inhibitors as Therapeutic Agents: Toxicological Point of View. *CMC* 2004;11:1629–43. <https://doi.org/10.2174/0929867043365099>.
- [170] Bubna A. Vorinostat-An overview. *Indian J Dermatol* 2015;60:419. <https://doi.org/10.4103/0019-5154.160511>.
- [171] El-Faham A, Albericio F. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chem Rev* 2011;111:6557–602. <https://doi.org/10.1021/cr100048w>.
- [172] Larina LI. Tautomerism and Structure of Azoles. *Advances in Heterocyclic Chemistry* 2018:233–321. <https://doi.org/10.1016/bs.aihch.2017.06.003>.
- [173] Siebert A, Wysocka M, Krawczyk B, Cholewiński G, Rachoń J. Synthesis and antimicrobial activity of amino acid and peptide derivatives of mycophenolic acid. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2018;143:646–55. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.094>.
- [174] Cholewinski G, Iwaszkiewicz-Grzes D, Trzonkowski P, Dzierzbicka K. Synthesis and biological activity of ester derivatives of mycophenolic acid and acridines/acridones as potential immunosuppressive agents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 2015;31:974–82. <https://doi.org/10.3109/14756366.2015.1077821>.
- [175] Sunohara K, Mitsuhashi S, Shigetomi K, Ubukata M. Discovery of N-(2,3,5-triazoyl)mycophenolic amide and mycophenolic epoxyketone as novel inhibitors of human IMPDH. *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters* 2013;23:5140–4. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.07.016>.
- [176] Siebert A, Cholewiński G, Garwolińska D, Olejnik A, Rachoń J, Chojnacki J. The synthesis and structure of a potential immunosuppressant: N-mycophenoyl malonic acid dimethyl ester. *Journal of Molecular Structure* 2018;1151:218–22. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.09.041>.
- [177] Tsolaki E, Eleftheriou P, Kartsev V, Geronikaki A, Saxena AK. Application of Docking Analysis in the Prediction and Biological Evaluation of the Lipoxygenase Inhibitory Action of Thiazolyl Derivatives of Mycophenolic Acid. *Molecules* 2018;23:1621. <https://doi.org/10.3390/molecules23071621>.
- [178] Patel RV, Patel PK, Kumari P, Rajani DP, Chikhaliya KH. Synthesis of benzimidazolyl-1,3,4-oxadiazol-2ylthio-N-phenyl (benzothiazolyl) acetamides as antibacterial, antifungal and antituberculosis agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2012;53:41–51. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.03.033>.
- [179] Potopnyk MA, Lytvyn R, Danyliv Y, Ceborska M, Bezvikonnyi O, Volyniuk D, et al. N,O π-Conjugated 4-Substituted 1,3-Thiazole BF₂ Complexes: Synthesis and Photophysical Properties. *J Org Chem* 2018;83:1095–105. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b02239>.
- [180] Xue W, Zheng K, Li H, Gao F, Wu A. Iodine-promoted selective synthesis of substituted aminothiazole via a self-sorting reaction network. *Tetrahedron Letters* 2014;55:4212–5. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2014.05.101>.
- [181] Ten Brinke A, Marek-Trzonkowska N, Mansilla MJ, Turksma AW, Piekarska K, Iwaszkiewicz-Grzes D, et al. Monitoring T-Cell Responses in Translational Studies: Optimization of Dye-Based Proliferation Assay for Evaluation of Antigen-Specific Responses. *Front Immunol* 2017;8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01870>.
- [182] Sigma-Aldrich. ApoA1 [Internet]. <https://www.sigmaaldrich.com/PL/pl/product/sigma/apoaf> (dost. dn. 10.12.24 r.).
- [183] Mitsuhashi S, Takenaka J, Iwamori K, Nakajima N, Ubukata M. Structure–activity relationships for inhibition of inosine monophosphate dehydrogenase and differentiation induction of K562 cells among the mycophenolic acid derivatives. *Bioorganic&Medicinal Chemistry* 2010;18:8106–11. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.09.004>.
- [184] Neises B, Steglich W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angew Chem Int Ed Engl* 1978;17:522–4. <https://doi.org/10.1002/anie.197805221>.

- [185] Jordan A, Whymark KD, Sydenham J, Sneddon HF. A solvent-reagent selection guide for Steglich-type esterification of carboxylic acids. *Green Chem* 2021;23:6405–13. <https://doi.org/10.1039/d1gc02251b>.
- [186] Narasaka K, Maruyama K, Mukaiyama T. A USEFUL METHOD FOR THE SYNTHESIS OF MACROCYCLIC LACTONE. *Chemistry Letters* 1978;7:885–8. <https://doi.org/10.1246/cl.1978.885>.
- [187] Dhimitruka I, SantaLucia J. Investigation of the Yamaguchi Esterification Mechanism. Synthesis of a Lux-S Enzyme Inhibitor Using an Improved Esterification Method. *Org Lett* 2005;8:47–50. <https://doi.org/10.1021/ol0524048>.
- [188] Yuyun Y, Ratnatilaka Na Bhuket P, Supasena W, Suwattananuruk P, Praengam K, Vajragupta O, et al. A Novel Curcumin-Mycophenolic Acid Conjugate Inhibited Hyperproliferation of Tumor Necrosis Factor-Alpha-Induced Human Keratinocyte Cells. *Pharmaceutics* 2021;13:956. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13070956>.
- [189] Witt D, Dzierzbicka K, Rachoń J. Syntezy i transformacje związków organicznych. Gdańsk: Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej; 2007.
- [190] Chen P-Y, Wu Y-H, Hsu M-H, Wang T-P, Wang E-C. Cerium ammonium nitrate-mediated the oxidative dimerization of p-alkenylphenols: a new synthesis of substituted ($\pm$)-trans-dihydrobenzofurans. *Tetrahedron* 2013;69:653–7. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2012.11.006>.
- [191] Fu Y, Mu Y, Lei H, Wang P, Li X, Leng Q, et al. Design, Synthesis and Evaluation of Novel Tacrine-Ferulic Acid Hybrids as Multifunctional Drug Candidates against Alzheimer's Disease. *Molecules* 2016;21:1338. <https://doi.org/10.3390/molecules21101338>.
- [192] Chen J, Lu W, Chen H, Bian X, Yang G. A New Series of Salicylic Acid Derivatives as Non-saccharide α -Glucosidase Inhibitors and Antioxidants. *Biological&Pharmaceutical Bulletin* 2019;42:231–46. <https://doi.org/10.1248/bpb.b18-00661>.
- [193] Lima TC, Ferreira AR, Silva DF, Lima EO, de Sousa DP. Antifungal activity of cinnamic acid and benzoic acid esters against *Candida albicans* strains. *Natural Product Research* 2017;32:572–5. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1317776>.
- [194] Erhardt PW, Matier WL. Esters of thiadiazole oxypropanolaine derivatives and pharmaceutical uses. US patent US4623652A, 1986. <https://patents.google.com/patent/US4623652A>.
- [195] Chemat. Bakuchiol [Internet]. <https://chemat.com.pl/Szukaj?field=bakuchiol> (dost. dn. 10.12.24 r.).
- [196] Sigma-Aldrich. SMB00604 [Internet]. <https://www.sigmaaldrich.com/PL/pl/product/sigma/smb00604> (dost. dn. 10.12.24 r.).
- [197] Zrób Sobie Krem. Bakuchiol – roślinny retinoid [Internet]. <https://www.zrobsobiecream.pl/pl/p/Bakuchiol-roslinny-retinoid/1018> (dost. dn. 10.12.24 r.).
- [198] Magiczny Ogród. Bakuchi (Babchi, Bu Gu Zhi) [Internet]. https://www.magicznyogrod.pl/bakuchi_babchi_bu_gu_zhi.html (dost. dn. 10.12.24 r.).
- [199] Srivastava P, Vyas VK, Variya B, Patel P, Qureshi G, Ghatge M. Synthesis, anti-inflammatory, analgesic, 5-lipoxygenase (5-LOX) inhibition activities, and molecular docking study of 7-substituted coumarin derivatives. *Bioorganic Chemistry* 2016;67:130–8. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2016.06.004>.
- [200] Hasan AH, Murugesan S, Amran SI, Chander S, Alanazi MM, Hadda TB, et al. Novel thiophene Chalcones-Coumarin as acetylcholinesterase inhibitors: Design, synthesis, biological evaluation, molecular docking, ADMET prediction and molecular dynamics simulation. *Bioorganic Chemistry* 2022;119:105572. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105572>.
- [201] Si W-J, Chen M, Wang X-L, Wang M-Q, Jiao J, Fu X-C, et al. Synthesis and insecticidal activity of novel benzothiazole derivatives containing the coumarin moiety. *Arkivoc* 2018;2018:86–99. <https://doi.org/10.24820/ark.5550190.p010.664>.
- [202] Yu X, Jia Y, Ren F. Multidimensional biological activities of resveratrol and its prospects and challenges in the health field. *Front Nutr* 2024;11. <https://doi.org/10.3389/fnut.2024.1408651>.
- [203] Lu M, Chen C, Lan Y, Xiao J, Li R, Huang J, et al. Capsaicin—the major bioactive ingredient of chili peppers: bio-efficacy and delivery systems. *Food Funct* 2020;11:2848–60. <https://doi.org/10.1039/d0fo00351d>.
- [204] Liu Y, You Y, Lu J, Chen X, Yang Z. Recent Advances in Synthesis, Bioactivity, and Pharmacokinetics of Pterostilbene, an Important Analog of Resveratrol. *Molecules* 2020;25:5166. <https://doi.org/10.3390/molecules25215166>.
- [205] Gülçin İ. Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. *Innovative Food Science&Emerging Technologies* 2010;11:210–8. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.07.002>.
- [206] Gęgotek A, Skrzydlewska E. Antioxidative and Anti-Inflammatory Activity of Ascorbic Acid. *Antioxidants* 2022;11:1993. <https://doi.org/10.3390/antiox11101993>.
- [207] Di Majo D, La Neve L, La Guardia M, Casuccio A, Giammanco M. The influence of two different pH levels on the antioxidant properties of flavonols, flavan-3-ols, phenolic acids and aldehyde compounds analysed in synthetic wine and in a phosphate buffer. *Journal of Food Composition and Analysis* 2011;24:265–9. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.09.013>.
- [208] Ratajczak K, Borska S. Cytotoxic and Proapoptotic Effects of Resveratrol in In Vitro Studies on Selected Types of Gastrointestinal Cancers. *Molecules* 2021;26:4350. <https://doi.org/10.3390/molecules26144350>.

- [209] Cykowiak M, Krajka-Kuźniak V. Role of Nrf2 in Pancreatic Cancer. *Antioxidants* 2021;11:98. <https://doi.org/10.3390/antiox11010098>.
- [210] Lim SH, Choi C-I. Potentials of Raspberry Ketone as a Natural Antioxidant. *Antioxidants* 2021;10:482. <https://doi.org/10.3390/antiox10030482>.
- [211] Mohamed MT, Zaitone SA, Ahmed A, Mehanna ET, El-Sayed NM. Raspberry Ketones Attenuate Cyclophosphamide-Induced Pulmonary Toxicity in Mice through Inhibition of Oxidative Stress and NF-KB Pathway. *Antioxidants* 2020;9:1168. <https://doi.org/10.3390/antiox9111168>.
- [212] GeneCards. TP53 Gene [Internet]. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TP53> (dost. dn. 10.12.24 r.).
- [213] GeneCards. H3C12 Gene [Internet]. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=H3C12> (dost. dn. 10.12.24 r.).
- [214] GeneCards. B2M Gene [Internet]. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=B2M> (dost. dn. 10.12.24 r.).
- [215] GeneCards. EXOSC9 Gene [Internet]. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=EXOSC9> (dost. dn. 10.12.24 r.).
- [216] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep* 2017;7. <https://doi.org/10.1038/srep42717>.
- [217] Isyaku Y, Uzairu A, Uba S. Computational studies of a series of 2-substituted phenyl-2-oxo-, 2-hydroxyl- and 2-acyloxyethylsulfonamides as potent anti-fungal agents. *Heliyon* 2020;6:e03724. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03724>.
- [218] WebMO. WebMO: Web-Based Molecular Modeling [Internet]. <https://www.webmo.net/index.html> (dost. dn. 10.12.24 r.).
- [219] Daina A, Zoete V. A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. *ChemMedChem* 2016;11:1117–21. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600182>.
- [220] Tang B, Zhang L, Zhang J, Chen Z-Z, Wang Y. Synthesis of a novel host molecule of cross-linking-polymeric- β -cyclodextrin-o-vanillin furfuralhydrazone and spectrofluorimetric analysis of its identifying cadmium. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2004;60:2425–31. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2003.12.018>.
- [221] Ölmez NA, Waseer F. New Potential Biologically Active Compounds: Synthesis and Characterization of Urea and Thiourea Derivatives Bearing 1,2,4-oxadiazole Ring. *COS* 2020;17:525–34. <https://doi.org/10.2174/1570179417666200417112106>.
- [222] Augustine JK, Vairaperumal V, Narasimhan S, Alagarsamy P, Radhakrishnan A. Propylphosphonic anhydride (T3P®): an efficient reagent for the one-pot synthesis of 1,2,4-oxadiazoles, 1,3,4-oxadiazoles, and 1,3,4-thiadiazoles. *Tetrahedron* 2009;65:9989–96. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2009.09.114>.
- [223] Kamath PR, Joseph MM, Abdul Salam AA, T. Therakathinal S, Sunil D, Biswas S, et al. Retracted: Bisindole-oxadiazole hybrids, T3P®-mediated synthesis, and appraisal of their apoptotic, antimetastatic, and computational Bcl-2 binding potential. *J Biochem&Molecular Tox* 2017;31. <https://doi.org/10.1002/jbt.21962>.
- [224] ILANGO VAN A, SARAVANAKUMAR S, UMESH S. T3P as an efficient cyclodehydration reagent for the one-pot synthesis of 2-amino-1,3,4-oxadiazoles. *J Chem Sci* 2015;127:797–801. <https://doi.org/10.1007/s12039-015-0834-x>.
- [225] Yang S-J, Lee S-H, Kwak H-J, Gong Y-D. Regioselective Synthesis of 2-Amino-Substituted 1,3,4-Oxadiazole and 1,3,4-Thiadiazole Derivatives via Reagent-Based Cyclization of Thiosemicarbazide Intermediate. *J Org Chem* 2012;78:438–44. <https://doi.org/10.1021/jo302324r>.
- [226] Zabiulla, Nagesh Khadri MJ, Bushra Begum A, Sunil MK, Khanum SA. Synthesis, docking and biological evaluation of thiadiazole and oxadiazole derivatives as antimicrobial and antioxidant agents. *Results in Chemistry* 2020;2:100045. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2020.100045>.
- [227] Borsoi AF, Coldeira ME, Pissinate K, Macchi FS, Basso LA, Santos DS, et al. Ultrasound-assisted synthesis of 2-amino-1,3,4-oxadiazoles through NBS-mediated oxidative cyclization of semicarbazones. *Synthetic Communications* 2017;47:1319–25. <https://doi.org/10.1080/00397911.2017.1324626>.
- [228] Rapolu S, Alla M, Bommena VR, Murthy R, Jain N, Bommareddy VR, et al. Synthesis and biological screening of 5-(alkyl(1H-indol-3-yl))-2-(substituted)-1,3,4-oxadiazoles as antiproliferative and anti-inflammatory agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2013;66:91–100. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.05.024>.
- [229] Chaudhari PS, Pathare SP, Akamanchi KG. o-Iodoxybenzoic Acid Mediated Oxidative Desulfurization Initiated Domino Reactions for Synthesis of Azoles. *J Org Chem* 2012;77:3716–23. <https://doi.org/10.1021/jo2025509>.
- [230] Chattaway FD, Cumming CL, Wilsdon BH. CCXX.—Decomposition of hydrazides and hydrazones by heat. *J Chem Soc, Trans* 1911;99:1950–3. <https://doi.org/10.1039/ct9119901950>.
- [231] Beletskii EV, Ignatenko OA, Kuznetsov MA, Selivanov SI. Oxidative addition of N-aminophthalimide to styryl-1,2,4-oxadiazoles. *Russ J Org Chem* 2010;46:678–84. <https://doi.org/10.1134/s1070428010050143>.
- [232] Codd R. Traversing the coordination chemistry and chemical biology of hydroxamic acids. *Coordination Chemistry Reviews* 2008;252:1387–408. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.08.001>.

- [233] Wang W, McMurray JS. A selective method for the preparation of primary amides: Synthesis of Fmoc-L-4-carboxamidophenylalanine and other compounds. *Tetrahedron Letters* 1999;40:2501–4. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(99\)00245-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(99)00245-2).
- [234] Fang H, Chang J, Zhang T, Chen Z, Wang G, Cui Y, et al. Discovery of Fungicidal Hydrazide Lead Compounds Derived from Sinapic Acid and Mycophenolic Acid. *J Agric Food Chem* 2023;71:17988–98. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c04641>.
- [235] Rai Deka JK, Sahariah B, Sarma BK. Understanding the Cis–Trans Amide Bond Isomerization of N,N'-Diacylhydrazines to Develop Guidelines for A Priori Prediction of Their Most Stable Solution Conformers. *J Org Chem* 2023;89:10419–33. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.2c01891>.
- [236] Charton J, Gauriot M, Totobenazara J, Hennuyer N, Dumont J, Bosc D, et al. Structure–activity relationships of imidazole-derived 2-[N-carbamoylmethyl-alkylamino]acetic acids, dual binders of human insulin-degrading enzyme. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2015;90:547–67. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.12.005>.
- [237] Camp JE, Shabalin DA, Dunsford JJ, Ngwerume S, Saunders AR, Gill DM. Synthesis of 2,4-Disubstituted Imidazoles via Nucleophilic Catalysis. *Synlett* 2020;31:797–800. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1690832>.
- [238] Xu L-L, Wu Y-F, Wang L, Li C-C, Li L, Di B, et al. Structure-activity and structure-property relationships of novel Nrf2 activators with a 1,2,4-oxadiazole core and their therapeutic effects on acetaminophen (APAP)-induced acute liver injury. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2018;157:1376–94. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.08.071>.
- [239] Cornago M, Garcia-Alberich C, Blasco-Angulo N, Vall-Illaura N, Nager M, Herreros J, et al. Histone deacetylase inhibitors promote glioma cell death by G2 checkpoint abrogation leading to mitotic catastrophe. *Cell Death Dis* 2014;5:e1435–e1435. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.412>.
- [240] Huang H-L, Lee H-Y, Tsai A-C, Peng C-Y, Lai M-J, Wang J-C, et al. Anticancer Activity of MPT0E028, a Novel Potent Histone Deacetylase Inhibitor, in Human Colorectal Cancer HCT116 Cells In Vitro and In Vivo. *PLoS ONE* 2012;7:e43645. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043645>.
- [241] Spieß P, Brześkiewicz J, Maulide N. Deprotective Lossen rearrangement: a direct and general transformation of Nms-amides to unsymmetrical ureas. *Chem Sci* 2024;15:15799–803. <https://doi.org/10.1039/d4sc04974h>.
- [242] Hypercube, Inc. HyperChem™ Professional 7.51 [Internet]. Gainesville (FL): Hypercube, Inc.; <https://hyperchem.software.informer.com/> (dost. dn. 10.12.24 r.).
- [243] Hocquet A, Langg rd M. An Evaluation of the MM+ Force Field. *Journal of Molecular Modeling* 1998;4:94–112. <https://doi.org/10.1007/s008940050128>.
- [244] Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 2009;31:455–61. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
- [245] Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics* 1996;14:33–8. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).
- [246] Iwaszkiewicz-Grzes D, Cholewinski G, Kot-Wasik A, Trzonkowski P, Dzierzbicka K. Investigations on the immunosuppressive activity of derivatives of mycophenolic acid in immature dendritic cells. *International Immunopharmacology* 2017;44:137–42. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.01.011>.
- [247] Siebert A, Cholewiński G, Trzonkowski P, Rachon J. Immunosuppressive properties of amino acid and peptide derivatives of mycophenolic acid. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2020;189:112091. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112091>.
- [248] Pedretti A, Mazzolari A, Gervasoni S, Fumagalli L, Vistoli G. The VEGA suite of programs: an versatile platform for cheminformatics and drug design projects. *Bioinformatics* 2020;37:1174–5. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa774>.
- [249] Wang X, Shen Y, Wang S, Li S, Zhang W, Liu X, et al. PharmMapper 2017 update: a web server for potential drug target identification with a comprehensive target pharmacophore database. *Nucleic Acids Research* 2017;45:W356–60. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx374>.
- [250] Wang X, Pan C, Gong J, Liu X, Li H. Enhancing the Enrichment of Pharmacophore-Based Target Prediction for the Polypharmacological Profiles of Drugs. *J Chem Inf Model* 2016;56:1175–83. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00690>.
- [251] Liu X, Ouyang S, Yu B, Liu Y, Huang K, Gong J, et al. PharmMapper server: a web server for potential drug target identification using pharmacophore mapping approach. *Nucleic Acids Research* 2010;38:W609–14. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq300>.
- [252] UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research* 2018;47:D506–15. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1049>.
- [253] Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research* 2018;47:D607–13. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>.

- [254] Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res* 2003;13:2498–504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>.
- [255] Sherman BT, Hao M, Qiu J, Jiao X, Baseler MW, Lane HC, et al. DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Research* 2022;50:W216–21. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac194>.
- [256] Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2008;4:44–57. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>.
- [257] Bardou P, Mariette J, Escudié F, Djemiel C, Klopp C. jvenn: an interactive Venn diagram viewer. *BMC Bioinformatics* 2014;15. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-293>.
- [258] Safran M, Rosen N, Twik M, BarShir R, Stein TI, Dahary D, et al. The GeneCards Suite. *Practical Guide to Life Science Databases* 2021:27–56. https://doi.org/10.1007/978-981-16-5812-9_2.
- [259] Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research* 2018;46:W296–303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>.
- [260] Anandakrishnan R, Aguilar B, Onufriev AV. H++ 3.0: automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. *Nucleic Acids Research* 2012;40:W537–41. <https://doi.org/10.1093/nar/gks375>.
- [261] Myers J, Grothaus G, Narayanan S, Onufriev A. A simple clustering algorithm can be accurate enough for use in calculations of pKs in macromolecules. *Proteins* 2006;63:928–38. <https://doi.org/10.1002/prot.20922>.
- [262] Gordon JC, Myers JB, Folta T, Shoja V, Heath LS, Onufriev A. H++: a server for estimating pKas and adding missing hydrogens to macromolecules. *Nucleic Acids Research* 2005;33:W368–71. <https://doi.org/10.1093/nar/gki464>.
- [263] Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJC. GROMACS: Fast, flexible, and free. *J Comput Chem* 2005;26:1701–18. <https://doi.org/10.1002/jcc.20291>.
- [264] Vanommeslaeghe K, Hatcher E, Acharya C, Kundu S, Zhong S, Shim J, et al. CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *J Comput Chem* 2009;31:671–90. <https://doi.org/10.1002/jcc.21367>.
- [265] Darden T, York D, Pedersen L. Particle mesh Ewald: An N-log(N) method for Ewald sums in large systems. *The Journal of Chemical Physics* 1993;98:10089–92. <https://doi.org/10.1063/1.464397>.
- [266] Korb O, Stütze T, Exner TE. Empirical Scoring Functions for Advanced Protein–Ligand Docking with PLANTS. *J Chem Inf Model* 2009;49:84–96. <https://doi.org/10.1021/ci800298z>.
- [267] MyBioSoftware. AMMP 2.0 – Molecular Mechanics, Dynamics, and Modeling Program [Internet]. <https://mybiosoftware.com/ammp-2-0-molecular-mechanics-dynamics-modeling-program.html> (dost. dn. 10.12.24 r.).
- [268] Bienert S, Waterhouse A, de Beer TAP, Tauriello G, Studer G, Bordoli L, et al. The SWISS-MODEL Repository—new features and functionality. *Nucleic Acids Res* 2016;45:D313–9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1132>.
- [269] Guex N, Peitsch MC, Schwede T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis* 2009;30. <https://doi.org/10.1002/elps.200900140>.
- [270] Studer G, Rempfer C, Waterhouse AM, Gumienny R, Haas J, Schwede T. QMEANDisCo—distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics* 2019;36:1765–71. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz828>.
- [271] Bertoni M, Kiefer F, Biasini M, Bordoli L, Schwede T. Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Sci Rep* 2017;7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09654-8>.
- [272] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 3.0, Schrödinger, LLC.

Wykaz rysunków

Rysunek 1. Wzór strukturalny kwasu mykofenolowego (MPA)	28
Rysunek 2. Oddziaływania niekowalencyjne w miejscu aktywnym enzymu IMPDH, w którym umieszczona została cząsteczka MPA	39
Rysunek 3. Zależność struktura-aktywność dla cząsteczki MPA	40
Rysunek 4. Wzór strukturalny mykofenolanu sodu (MPS)	46
Rysunek 5. Wzór strukturalny mykofenolanu mofetylu (MMF)	46
Rysunek 6. Wzory strukturalne wybranych antybiotyków makrolidowych stosowanych w terapiach immunosupresyjnych.....	50
Rysunek 7. Wzór strukturalny pochodnych adenozynowych MPA.....	52
Rysunek 8. Wzór strukturalny pochodnej anilidowej MPA	53
Rysunek 9. Wzory strukturalne pochodnych aminokwasowych MPA	54
Rysunek 10. Wzór strukturalny pochodnych hydroksamowych MPA.....	55
Rysunek 11. Wzór strukturalny koniugatu MPA-kwas chinowy	56
Rysunek 12. Wzór strukturalny penicykwasu I	57
Rysunek 13. Wzór strukturalny pochodnych sililowo-estrowych MPA.....	58
Rysunek 14. Podstawowe mechanizmy zmiatania wolnych rodników.....	60
Rysunek 15. Przykłady przeciwtleniaczy z uwzględnieniem podziału na grupy	62
Rysunek 16. Wzór strukturalny gwajakolu.....	75
Rysunek 17. Wzór strukturalny syringolu	75
Rysunek 18. Wzór strukturalny aldehydu syryngowego	76
Rysunek 19. Wzór strukturalny waniliny	77
Rysunek 20. Wzór strukturalny dehydrozingeronu	77
Rysunek 21. Wzór strukturalny zingeronu	78
Rysunek 22. Wzór strukturalny kwasu ferulowego	79
Rysunek 23. Wzory strukturalne eugenol i izoeugenolu	80
Rysunek 24. Wzór strukturalny sezamolu	81
Rysunek 25. Wzór strukturalny tymolu	81
Rysunek 26. Wzór strukturalny bakuchiolu	82
Rysunek 27. Wzory strukturalne kwasów kumarowych	83
Rysunek 28. Wzór strukturalny 4-hydroksybenzaldehydu.....	84
Rysunek 29. Wzór strukturalny dehydroframbinonu.....	84
Rysunek 30. Wzór strukturalny ketonu malinowego.....	85
Rysunek 31. Wzór strukturalny trichostatyny A (TSA).....	141
Rysunek 32. Wzór strukturalny worynostatu (SAHA)	142
Rysunek 33. Wzór strukturalny panobinostatu	143
Rysunek 34. Sposób ułożenia oraz oddziaływania międzycząsteczkowe w kompleksie A2-IMPDH2 w miejscu aktywnym enzymu.....	150
Rysunek 35. Wzór strukturalny 2-(2-amino-4-tiocyanobenzo[d]tiazol-6-yl)octan metylu	159
Rysunek 36. Krzywa zależności odpowiedź-dawka determinująca wartość współczynnika IC ₅₀ dla MPA i A2. (A) Odpowiedź ludzkich PBMCs po 96 godzinach inkubowania i (B) odpowiedź linii komórek T-Jurkat po 48 godzinach inkubowania w pożywce, z następczym zadaniem ich odczynnikiem XTT na 24 godziny; oba rodzaje komórek były hodowane w obecności różnych stężeń badanych związków (100; 75; 50; 25; 10; 1; 0,1 i 0,01 µM; MPA (czerwone); A2 (czarne)). Każdy punkt pomiarowy odpowiada trzem niezależnym eksperymentom, a ilościowo — średniej arytmetycznej ± odchylenie standardowe. Wykaz znaczeń: T-Jurkat cells — komórki T-Jurkat; viability — przeżywalność; concentration — stężenie molowe.....	163
Rysunek 37. Krzywa zależności odpowiedź-dawka determinująca wartość współczynnika EC ₅₀ dla MPA i A2. (A) Ludzkie PMBCs, znakowane barwnikiem VPD 450, były hodowane w obecności różnych stężeń badanych związków (100; 75; 50; 25; 10; 1; 0,1 i 0,01 µM; MPA (czerwone) i A2 (czarne)), a następnie stymulowane przeciwciałami przeciwko CD3 i CD28, osadzonymi na drobinach magnetycznych, przez 72 godziny. (B) Komórki T-Jurkat, znakowane barwnikiem VPD 450, były inkubowane w obecności różnych stężeń badanych związków (100; 10; 1; 0,1 i 0,01 µM; MPA (czerwony); A2 (czarny)) przez 48 godzin. Proliferacja komórek była analizowana z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Wyniki wyrażono w postaci średniej arytmetycznej ± odchylenie standardowe. Wykaz znaczeń: T-Jurkat cells — komórki T-Jurkat; proliferation — proliferacja; concentration — stężenie molowe.	164

Rysunek 38. Analiza apoptozy komórkowej PBMCs w układzie barwiącym aneksyna V/jodek propidyny z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. (A) Diagram korelacyjny przedstawiający komórki potraktowane różnymi stężeniami badanych związków (100; 10; 1 i 0,1 i 0,01 μ M; MPA i A2) przez 72 godziny, i wybarwione układem aneksyna V/FITC i jodkiem propidyny (PI). (B) Diagram słupkowy przedstawiający udział procentowy danego rodzaju komórek w określonym stężeniu substancji; trzy grupy komórek wyróżnialne po analizie kolorymetrycznej (fluorymetrycznej): komórki żywe (aneksyna-PI-); komórki w fazie wczesnej apoptozy (aneksyna+PI-) i komórki będące w fazie późnej apoptozy (aneksyna+PI+). Wykaz znaczeń: <i>propidium iodide</i> — jodek propidyny; <i>annexin V-FITC</i> — układ barwiący oparty na aneksynie V i barwniku fluorescencyjnym FITC; <i>percentage of cells</i> — udział procentowy komórek; <i>concentration</i> — stężenie molowe; <i>live</i> — komórki żywe, <i>early apoptotic cells</i> — komórki we wczesnej fazie apoptozy; <i>late apoptotic cells</i> — komórki w późnej fazie apoptozy.	166
Rysunek 39. Aktywność proliferacyjna PBMCs znakowanych barwnikiem VPD 450 w obecności różnych stężeń badanych związków (100; 10; 1 i 0,1 mM; MPA (czerwone) i A2 (czarne)), stymulowanych przeciwciałami przeciwko CD3 i CD28, i w końcowej fazie badań — inkubowanych z dodatkiem lub brakiem dodatku 50 μ M GMP, przez 72 godziny. Proliferacja komórek była analizowana przy użyciu cytometrii przepływowej. Próba ta jest zwana testem GMP w niniejszym opracowaniu. Wykaz znaczeń: <i>without GMP</i> — bez dodatku GMP, <i>with GMP</i> — z dodatkiem GMP.	168
Rysunek 40. Aktywność proliferacyjna PBMCs znakowanych barwnikiem VPD 450 w obecności różnych stężeń badanych związków (100; 10; 1 i 0,1 mM; A7 i A18), stymulowanych przeciwciałami przeciwko CD3 i CD28, i w końcowej fazie badań — inkubowanych z dodatkiem lub brakiem dodatku 50 μ M GMP, przez 72 godziny. Proliferacja komórek była analizowana przy użyciu cytometrii przepływowej. Próba ta jest zwana testem GMP w niniejszym opracowaniu. Wykaz znaczeń: <i>without GMP</i> — bez dodatku GMP, <i>with GMP</i> — z dodatkiem GMP.	169
Rysunek 41. Abstrakt graficzny podsumowujący pracę nad nowymi pochodnymi amidowymi MPA	170
Rysunek 42. Graficzna reprezentacja hamowania proliferacji (IC_{50}) komórek AsPC-1, poprzedzona działaniem najbardziej obiecujących antyoksydantów i gemcytabiny (jako związek odniesienia) przez 72 godziny ($n = 3$).....	181
Rysunek 43. Krzywe zależności odpowiedź-dawka determinujące wartość współczynnika IC_{50} dla estrowych pochodnych MPA , w odniesieniu do MPA i MMF . (A) PBMCs inkubowano przez 96 godzin, zaś (B) komórki T-Jurkat w ciągu 48 godzin, w obecności różnych stężeń badanych związków (100; 50; 25; 10; 1; 0,1 i 0,01 μ M; MPA , MMF , pochodne estrowe MPA). Wykresy podzielono ze względu na typ pochodnej (MP lub P). Po wskazanym wcześniej okresie inkubacji, dołki zadano odczynnikami XTT nad 24 godziny. Każdy punkt pomiarowy odpowiada trzem niezależnym eksperymentom, a ilościowo — średniej arytmetycznej $\pm$ odchylenie standardowe. Wykaz znaczeń: <i>T-Jurkat cells</i> — komórki T-Jurkat; <i>viability</i> — przeżywalność; <i>concentration</i> — stężenie molowe.	183
Rysunek 44. Krzywa zależności odpowiedź-dawka determinująca wartość współczynnika EC_{50} dla estrowych pochodnych MPA . (A) Ludzkie PMBCs, znakowane barwnikiem VPD 450, były hodowane w obecności różnych stężeń badanych związków (100; 50; 25; 10; 1; 0,1 i 0,01 μ M; MPA , MMF i pochodne estrowe), a następnie stymulowane przeciwciałami przeciwko CD3 i CD28, osadzonymi na drobinach magnetycznych, przez 72 godziny. (B) Komórki T-Jurkat, znakowane barwnikiem VPD 450, były inkubowane w obecności różnych stężeń badanych związków (100; 10; 1; 0,1 i 0,01 μ M; MPA , MMF i pochodne estrowe) przez 48 godzin. Proliferacja komórek była analizowana z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Wyniki wyrażono w postaci średniej arytmetycznej $\pm$ odchylenie standardowe. Wykaz znaczeń: <i>T-Jurkat cells</i> — komórki T-Jurkat; <i>proliferation</i> — proliferacja; <i>concentration</i> — stężenie molowe.	185
Rysunek 45. Aktywność antyproliferacyjna MPA , MMF i szeregu estrowych pochodnych MPA . Wybarwione VPD 450 PBMCs, w obecności różnych stężeń związków (50; 25; 10; 1 i 0,1 μ M; MPA , MMF i pochodne estrowe), stymulowane przeciwciałami przeciwko CD3 i CD28, hodowano z dodatkiem lub z brakiem dodatku 50 μ M GMP przez 72 godziny. Proliferacja komórek była oceniana przy użyciu cytometrii przepływowej. Próba ta jest zwana testem GMP w niniejszym opracowaniu. Wykaz znaczeń: <i>proliferation</i> — proliferacja; <i>concentration</i> — stężenie molowe.	187
Rysunek 46. Abstrakt graficzny podsumowujący pracę nad nowymi pochodnymi estrowymi MPA	188
Rysunek 47. Algorytm przygotowania danych do analizy w ramach odwrotnego dokowania na podstawie MPA-CO-NH-OH	189
Rysunek 48. Wydzielenie list genów w ramach jednego motywu strukturalnego	190
Rysunek 49. Wydzielenie list genów powiązanych z procesami karcynogenezy dla poszczególnych związków referencyjnych.....	190
Rysunek 50. Podsumowanie sposobu analizy (zawężania) poszczególnych wyników w ramach odwrotnego dokowania	191
Rysunek 51. Diagramy Venna dla poszczególnych klas bioizosterów.....	193
Rysunek 52. Sposób wiązania MPA w miejscu aktywnym enzymu HDAC6	195
Rysunek 53. Sposób wiązania MPA-CO-NH-OH w miejscu aktywnym enzymu HDAC6	197
Rysunek 54. Sposób wiązania MMF w miejscu aktywnym enzymu IMPDH2.....	198

Rysunek 55. Sposób wiązania MPA-CO-NH-OH w miejscu aktywnym enzymu IMPDH2	199
Rysunek 56. Sposób oddziaływania MPA (lewa) i szeregu ligandów 1,2,4-oksadiazolowych (prawa) w centrum aktywnym enzymu IMPDH2	200
Rysunek 57. Mapa potencjału elektrostatycznego wykonana dla cząsteczek 1,3,4-oksadiazolu (A) i 1,2,4-oksadiazolu (B) [218].....	203
Rysunek 58. Diagram BOILED-EGG przygotowany dla wszystkich testowanych związków bioizosterycznych oraz związków odniesienia. Oznaczenia literowe: A — pochodne fenyłowe, B — pochodne 2-furyłowe, C — pochodne pirydylowe, D — pochodne 2-tienylowe, E — MPA-CO-NH-OH , F — MPA-CONH-NH₂ , G — MPA-CO-NH₂ , H — MPA , I — MMF , J — Panobinostat	205
Rysunek 59. Widmo ¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz) <i>N,N'</i> -diacylohydrazyny otrzymanej w wyniku kondensacji MPA i benzohydrazyny	210
Rysunek 60. Widmo ¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz) bioizosteru 134OX_Ph powstałego w wyniku kondensacji MPA i benzohydrazyny w wyższej temperaturze	211
Rysunek 61. Abstrakt graficzny podsumowujący część pracy wykonanej w ramach bioizosterycznych pochodnych MPA	224
Rysunek 62. Wzór strukturalny funkcjonalizowanych benzo[d]oksazolowych pochodnych MPA	227
Rysunek 63. Transformacja kwasu hydroksamowego MPA w odpowiednik mocznikowy na drodze przegrupowania Lossena oraz wskazanie istotności dokowania molekularnego dla nowej klasy cząsteczek	229

Wykaz schematów

Schemat 1. Synteza totalna MPA opracowana przez zespół A. Covarrubias-Zuniga (2003)	30
Schemat 2. Synteza totalna MPA opracowana przez zespół A. Barretta (2013)	32
Schemat 3. Synteza totalna MPA opracowana przez zespół D. Churchilla (2018)	34
Schemat 4. Biosynteza nukleotydów purynowych szlakiem <i>de novo</i>	37
Schemat 5. Mechanizm transformacji IMP w XMP katalizowanej IMPDH	38
Schemat 6. Zestawienie glukuronidów MPA oraz ich losy farmakologiczne	47
Schemat 7. Zestawienie glukozydów MPA	48
Schemat 8. Chemiczna podstawa działania testu DPPH	63
Schemat 9. Chemiczna podstawa działania testu ABTS	64
Schemat 10. Podstawy chemiczne testu FRAP	65
Schemat 11. Podstawa działania testu CUPRAC	66
Schemat 12. Podstawa działania testu ORAC	67
Schemat 13. Reakcje leżące u podstaw testu TRAP	69
Schemat 14. Podstawy funkcjonowania testu enzymatycznego opartego o aktywność SOD [53]	71
Schemat 15. Cykle reakcji leżące u podstaw testu GPx	72
Schemat 16. Podstawy funkcjonowania testu enzymatycznego opartego na aktywności CAT	73
Schemat 17. Podstawy funkcjonowania testu opartego o aktywność AO	74
Schemat 18. Wybrane metody syntezy 1,3-tiazoli	88
Schemat 19. Mechanizm syntezy 2,5-dipodstawionego 1,3-tiazolu z aminy typu benzylowego i aldehydu fenylooctowego, katalizowanej jonami miedzi(II) w warunkach aerobowych	89
Schemat 20. Mechanizm syntezy 2,4-dipodstawionego 1,3-tiazolu z tionoamidu i alkinyłowego związku jodu hiperwalencyjnego w warunkach zasadowych	90
Schemat 21. Mechanizm syntezy $N^2,4$ -dipodstawionego 2-amino-1,3-tiazolu z N -podstawionego tiomocznika i bromku propargilu, w warunkach zasadowych	91
Schemat 22. Mechanizm syntezy bromowodorku 2-amino-4-fenyl-1,3-tiazolu z bromku fenacylu i tiomocznika, w warunkach bezrozpuszczalnikowych	91
Schemat 23. Wybrane metody syntezy benzo[d]tiazoli	93
Schemat 24. Mechanizm syntezy 2-fenylbenzotiazolu z eteru fenylo-metylowego i aniliny, w obecności wodoronadtlenku <i>t</i> -butylu i jodu cząsteczkowego, w warunkach aerobowych	94
Schemat 25. Mechanizm syntezy 2-podstawionego benzotiazolu z <i>o</i> -aminofenolu i aldehydu, fotokatalizowanej TETPY w świetle widzialnym, w warunkach aerobowych	95
Schemat 26. Mechanizm syntezy 2-fenylbenzotiazolu z aniliny, benzaldehydu i rodanku amonu, w obecności jodu cząsteczkowego i dimetylosulfotlenku	96
Schemat 27. Mechanizm syntezy 2-aminobenzotiazolu z aniliny i rodanku amonu w obecności dichlorojodanu(I) sodu	97
Schemat 28. Wybrane metody syntezy benzo[d]oksazoli	98
Schemat 29. Cykliczny mechanizm syntezy 2-podstawionego benzoksazolu z N -benzylidowanego <i>o</i> -aminofenolu, katalizowanej NHC, w warunkach utleniających	99
Schemat 30. Mechanizm syntezy 2-fenylbenzoksazolu z benzaldehydu i <i>o</i> -nitrofenolu w obecności siarki elementarnej i DABCO	100
Schemat 31. Mechanizm syntezy N,N -dipodstawionego 2-aminobenzoksazolu z amidyny fenolowej, fotokatalizowanej związkami rutenu(II) w świetle niebieskim, w warunkach aerobowych	102
Schemat 32. Mechanizm syntezy 2-aminobenzoksazolu z <i>o</i> -aminofenolu pod wpływem NCTS i LiHMDS	103
Schemat 33. Wybrane metody syntezy benzo[d]imidazoli	104
Schemat 34. Mechanizm syntezy benz-1 <i>H</i> -imidazolu z <i>o</i> -fenylenodiaminy w obecności dimetylosulfotlenku i octanu amonu	105
Schemat 35. Mechanizm syntezy 2-metylopodstawionego benz-1 <i>H</i> -imidazolu z alkinu, azydru tosyłu i <i>o</i> -fenylenodiaminy, katalizowanej jodkiem miedzi(I) i trietyloaminą	106
Schemat 36. Mechanizm syntezy 2-fenyl-benz-1 <i>H</i> -imidazolu z N^1 -benzyl- <i>o</i> -fenylenodiaminy i TEMPO w warunkach aerobowych	107
Schemat 37. Mechanizm syntezy 1, N^2 -dipodstawionego 2-aminobenzimidazolu z N^2 -podstawionej <i>o</i> -fenylenodiaminy i izotiocyanianu w obecności anionu jodanowego(VII)	108
Schemat 38. Wybrane metody syntezy 1,3-diazyn	109

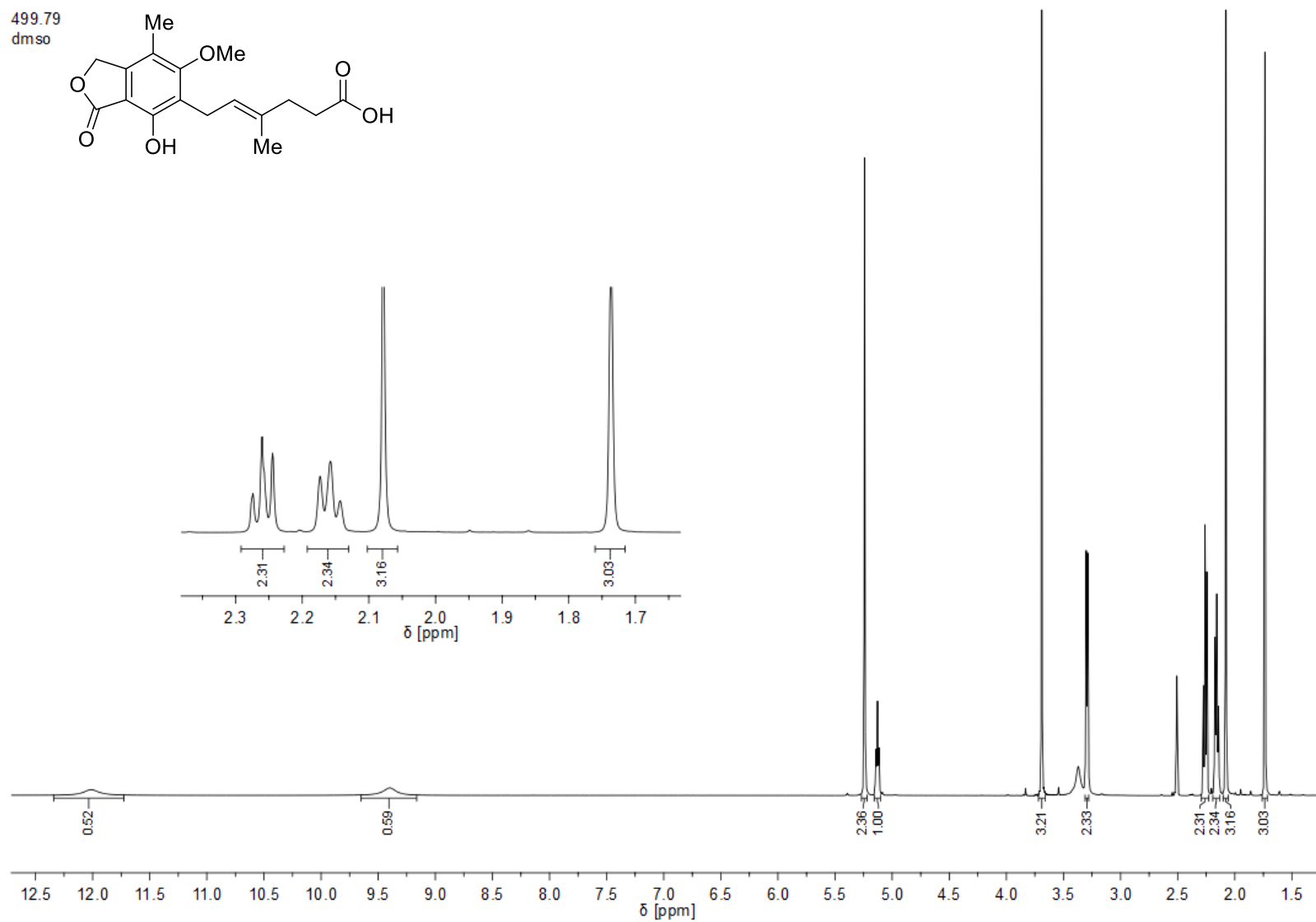
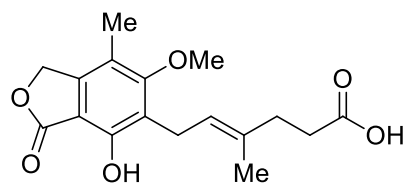
Schemat 39. Mechanizm syntezy 4-fenilo-1,3-diazyny z acetofenonu i formamidu w obecności nadsiarczanu potasu	110
Schemat 40. Cykliczny mechanizm syntezy 2,4-dipodstawionej 1,3-diazyny z pochodnej propiofenonu i amidyny, katalizowanej jonami żelaza(III) i TEMPO	111
Schemat 41. Mechanizm syntezy 2,4,6-tripodstawionej 1,3-diazyny z pochodnej propiofenonu i chlorowodoru amidyny, katalizowanej jonami miedzi(II) i 4-HO-TEMPO, w warunkach aerobowych	112
Schemat 42. Mechanizm syntezy 2,4,6-tripodstawionej 1,3-diazyny z pochodnej acetofenonu i nitylu, katalizowanej związkami miedzi(II), w warunkach zasadowych	113
Schemat 43. Wybrane metody syntezy 1,2,4-oksadiazoli	115
Schemat 44. Mechanizm syntezy 3,5-dipodstawionego 1,2,4-oksadiazolu z amidoksymu i nitylu, katalizowanej chlorkiem cynku	116
Schemat 45. Mechanizm syntezy 3,5-dipodstawionego 1,2,4-oksadiazolu z nitylu, hydroksyloaminy i pochodnej kwasu Meldruma w kwasie octowym	117
Schemat 46. Mechanizm syntezy 3-acylo-5-alkilo 1,2,4-oksadiazolu z alkinu i nitylu, warunkach katalizy azotanem(V) żelaza(III)	118
Schemat 47. Mechanizm syntezy <i>N</i> ⁵ ,3-dipodstawionego 1,2,4-oksadiazolu z chlorooksymu, izonitrylu i hydroksyloaminy, w obecności DEAD i trifenylofosfiny	119
Schemat 48. Wybrane metody syntezy 1,3,4-oksadiazoli	121
Schemat 49. Mechanizm syntezy 2-podstawionego 1,3,4-oksadiazolu z pochodnej acetofenonu i hydrazidu, w obecności jodu cząsteczkowego, dimetylosulfotlenku i węglanu potasu	122
Schemat 50. Mechanizm syntezy 2,5-dipodstawionego 1,3,4-oksadiazolu z <i>N</i> '-acylowanego hydrazonu w obecności TEMPO i jonów żelaza(III), w warunkach aerobowych	123
Schemat 51. Mechanizm syntezy 5-podstawionego 2-amino-1,3,4-oksadiazolu z chlorowodoru semikarbazidu i aldehydu, w obecności jodu cząsteczkowego i octanu sodu	124
Schemat 52. Mechanizm syntezy 5-podstawionego 2-amino-1,3,4-oksadiazolu z semikarbazonu, fotokatalizowanej eozyną Y (EY) w warunkach światła zielonego, w obecności czterobromku węgla	124
Schemat 53. Graficzna reprezentacja regulacji upakowania chromatyny	136
Schemat 54. Prawdopodobny mechanizm deacetylowania z wykorzystaniem HDAC klasy I, II i IV	137
Schemat 55. Prawdopodobny mechanizm deacetylowania z wykorzystaniem HDAC klasy III (sirtuiny)	138
Schemat 56. Zestawienie pochodnych MPA omawianych w tej pracy doktorskiej	145
Schemat 57. Metoda syntezy amidów MPA (A1-A3, A8-A18) pochodzących od amin heteroaromatycznych	151
Schemat 58. Metoda syntezy amidów MPA (A4-A7) pochodzących od amin aromatycznych i alifatycznych	154
Schemat 59. Wyniki reakcji otrzymywania amidowych pochodnych MPA zawierających motyw tiazolu	157
Schemat 60. Zestawienie wyników syntezy amin heteroaromatycznych	158
Schemat 61. Zestawienie wydajności procesów otrzymywania estrów MPA wg procedury estryfikacji Steglicha	173
Schemat 62. Zestawienie wyników otrzymywania związków fenolowych	174
Schemat 63. Zestawienie wydajności syntez hydrazydów	206
Schemat 64. Zestawienie wydajności syntez amidoksymów	207
Schemat 65. Zestawienie wydajności syntezy bioizosterycznych pochodnych 1,3,4-oksadiazolu	208
Schemat 66. Sposoby transformowania MPA w pochodne 1,3,4-oksadiazolu	209
Schemat 67. Zestawienie wydajności syntezy bioizosterycznych pochodnych 1,2,4-oksadiazolu	212
Schemat 68. Zestawienie wydajności syntezy bioizosterycznych pochodnych niecyklicznych	214
Schemat 69. Zestawienie wydajności syntez innych amidoksymów	216
Schemat 70. Zestawienie wydajności poszczególnych procesów składających się na otrzymanie bioizosterycznej pochodnej <i>rac</i> -ibuprofenu	218

Wykaz tabel

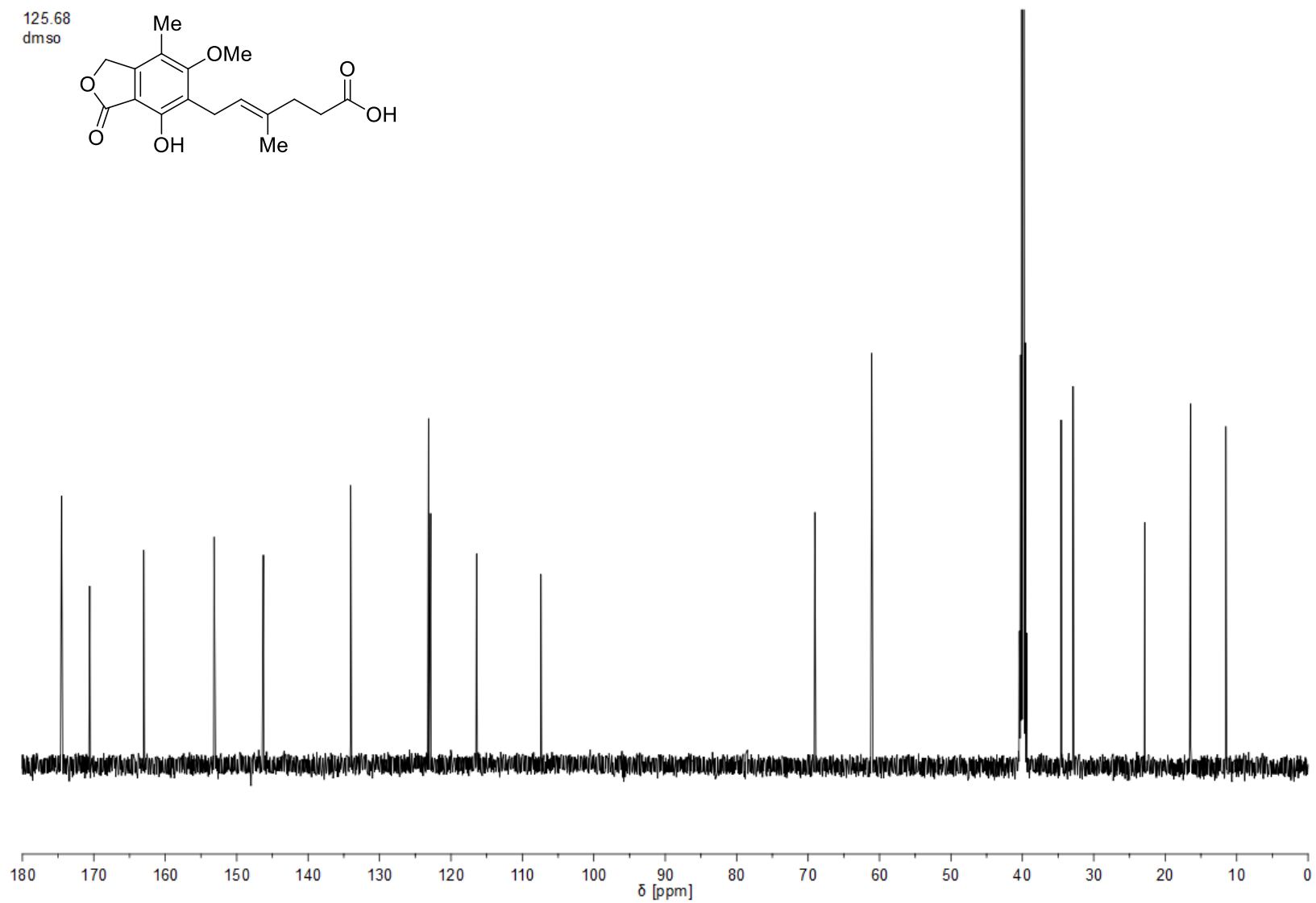
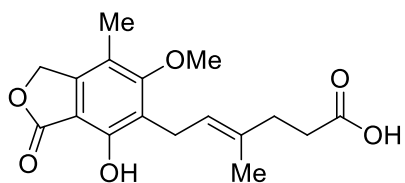
Tabela 1. Zbiór podstawowych informacji na temat HDACs [165]	139
Tabela 2. Energia swobodna wiązania ligand-enzym obliczona dla związków A1-A18 oraz MPA	148
Tabela 3. Zestawienie wyników reakcji otrzymywania A1 w różnych warunkach syntezy	155
Tabela 4. Cytotoksyczność amidowych pochodnych MPA wobec komórek PBMC i T-Jurkat, ustalone w oparciu o test XTT	161
Tabela 5. Aktywność antyproliferacyjna amidowych pochodnych MPA wobec komórek PBMC i T-Jurkat, ustalone w oparciu o test VPD450.....	163
Tabela 6. Wyniki testu DPPH otrzymane dla badanych estrów i związków odnośnikowych	178
Tabela 7. Cytotoksyczność najbardziej obiecujących antyoksydantów i gemcytabiny (jako związek odniesienia) wobec linii komórek AsPC-1, wyrażona w postaci współczynnika IC ₅₀ (n = 3).....	180
Tabela 8. Cytotoksyczność estrowych pochodnych MPA , ustalone w oparciu o test XTT wobec komórek PBMC i T-Jurkat	182
Tabela 9. Aktywność antyproliferacyjna estrowych pochodnych MPA , ustalona w oparciu o test VPD450 wobec komórek PBMC i T-Jurkat	184
Tabela 10. Wskaźnik selektywności (SI) określony dla wartości międzyseryjnej cytotoksyczności i aktywności antyproliferacyjnej	186
Tabela 11. Zestawienie wyników odwrotnego dokowania dla pochodnych bioizosterycznych MPA	192
Tabela 12. Zestawienie energii wiązania ligand-białko dla pochodnych bioizosterycznych MPA i związków odniesienia, wobec enzymów HDAC6 i IMPDH2.....	195
Tabela 13. Zestawienie parametrów określanych przy pomocy narzędzia Swiss-ADME	200
Tabela 14. Zestawienie parametrów określanych przy pomocy narzędzia Swiss-ADME dla pochodnych bioizosterycznych MPA i związków odniesienia	201
Tabela 15. Zestawienie wyników dotyczących szacowania parametrów rozpuszczalności, osiągniętych przy pomocy narzędzia Swiss-ADME.....	202
Tabela 16. Zestawienie wyników testów przesiewowych w warunkach linii komórek nowotworowych, w kulturach adherentnych	221
Tabela 17. Zestawienie wyników testów przesiewowych w warunkach linii komórek nowotworowych, w kulturach w zawiesinie	222

Załącznik A. Widma ^1H i ^{13}C NMR wybranych związków

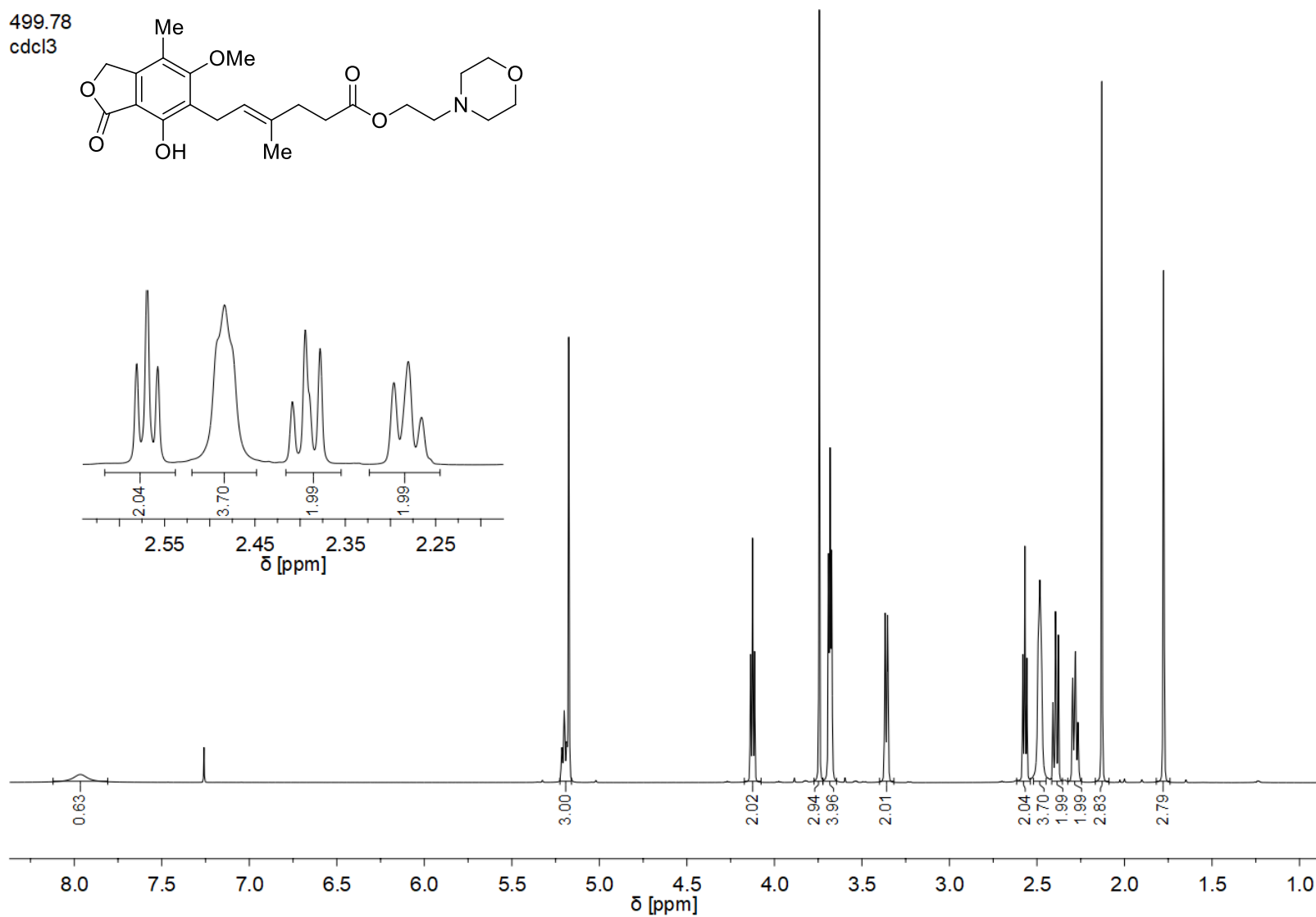
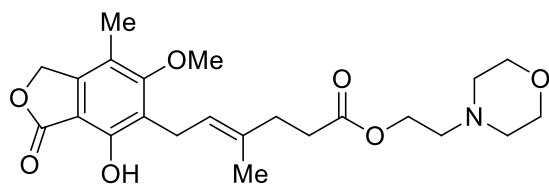
499.79
dmsd



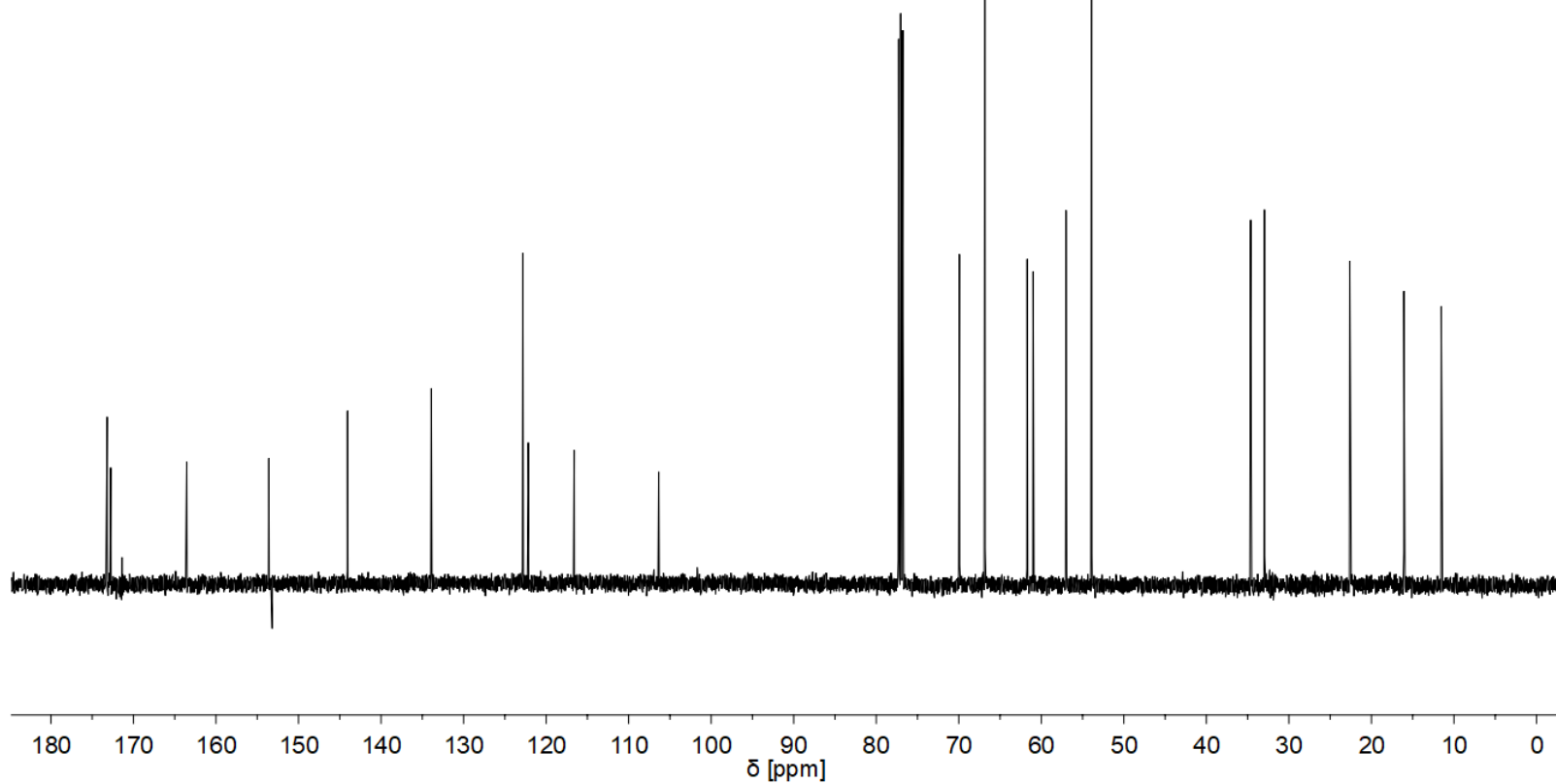
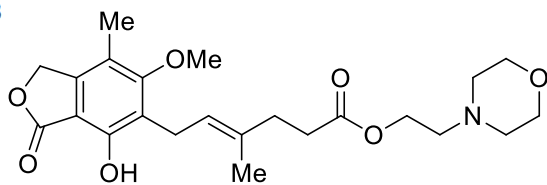
125.68
dmsO



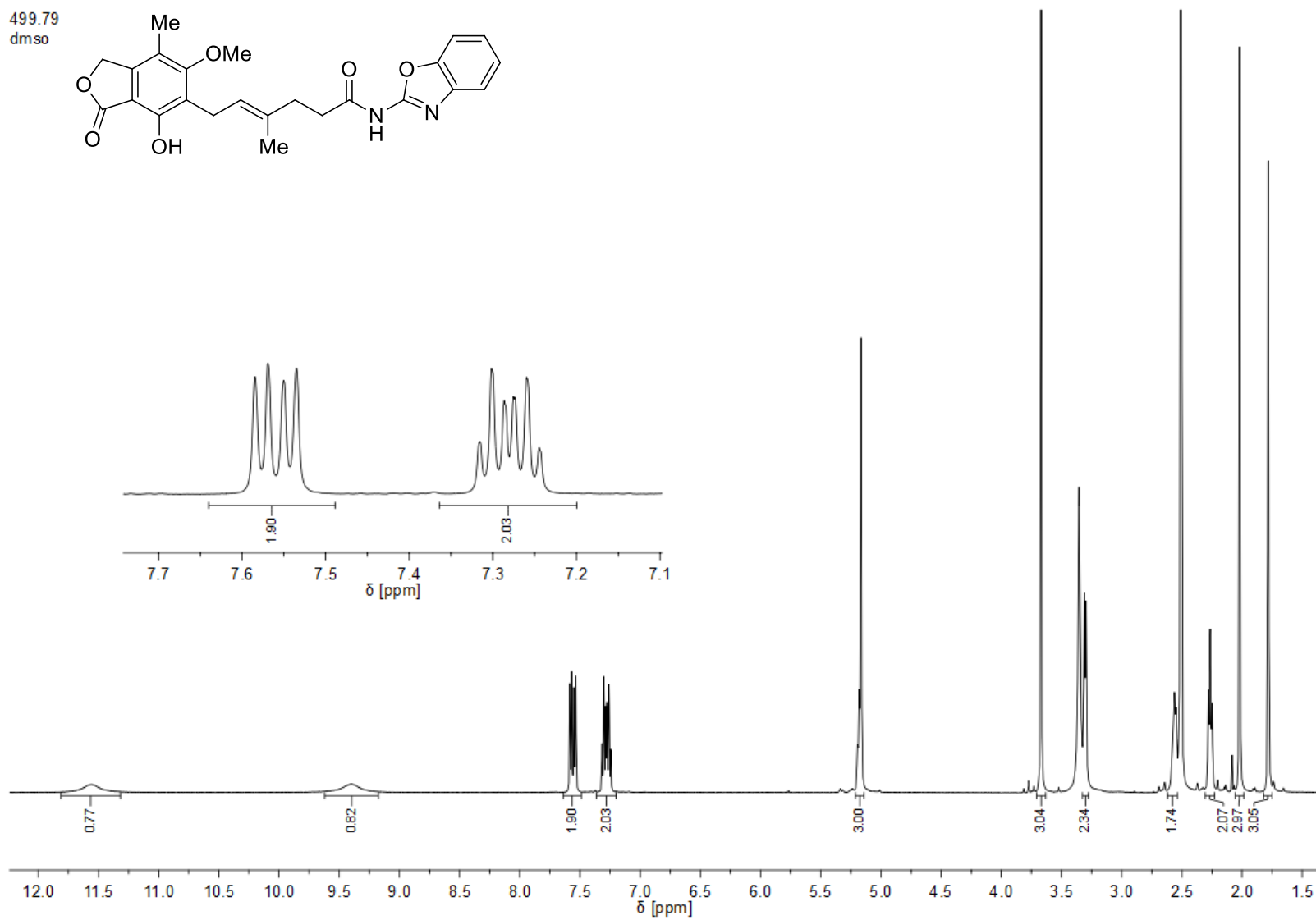
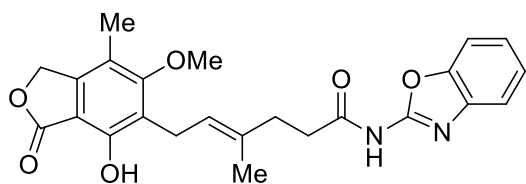
499.78
cdcl3



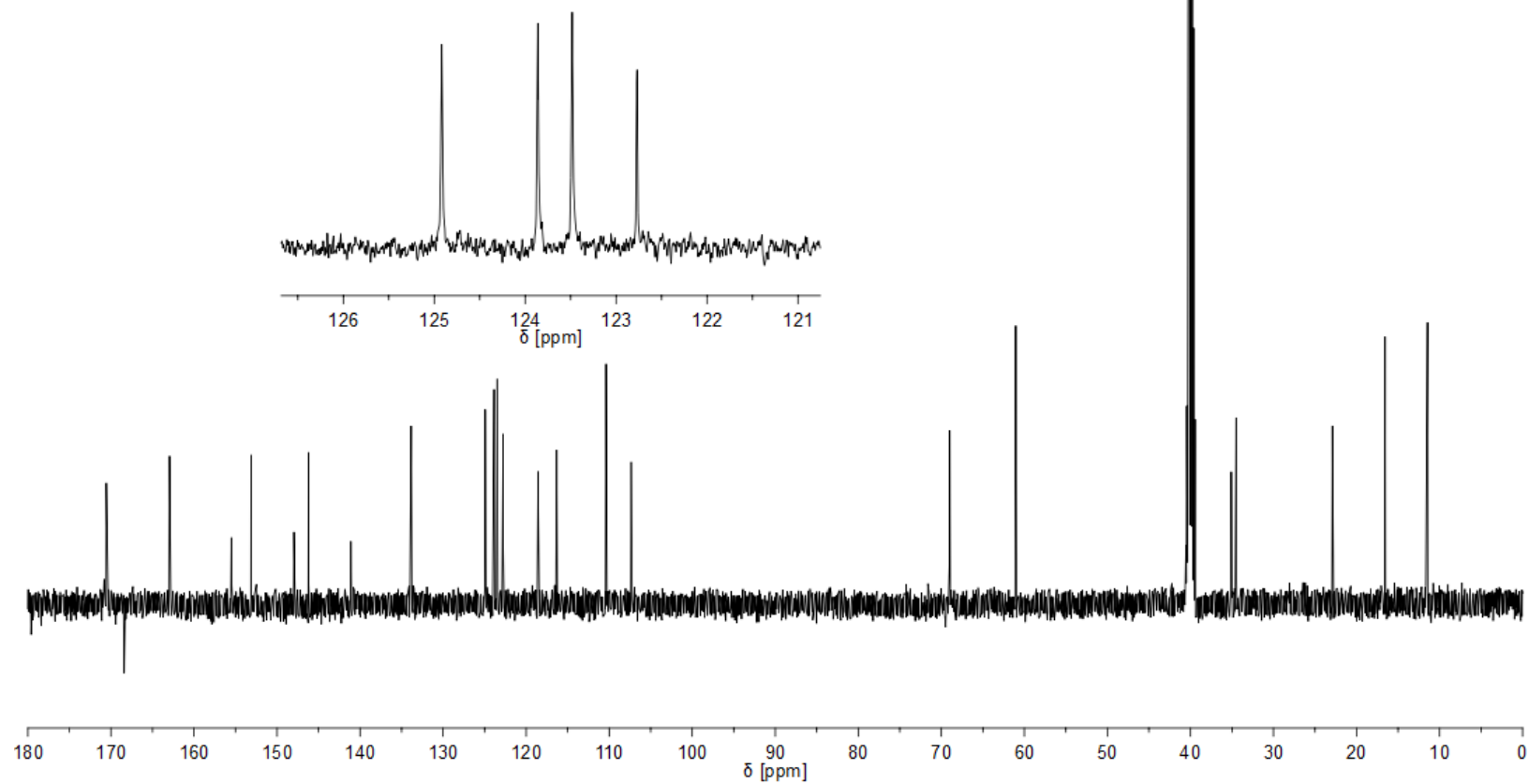
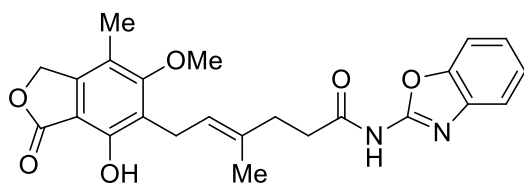
125.68
cdcl3



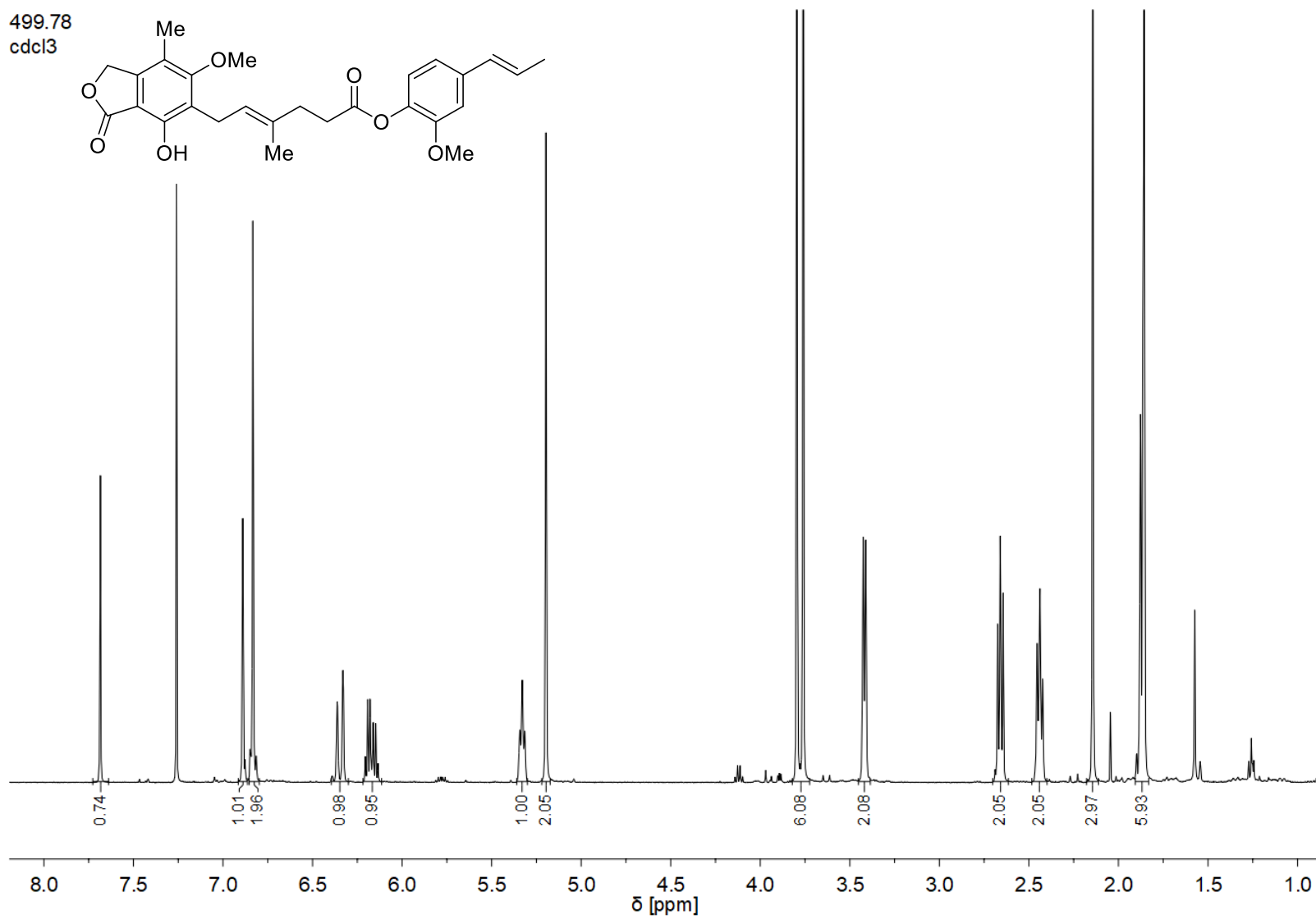
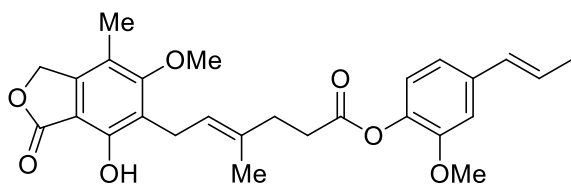
499.79
dmso



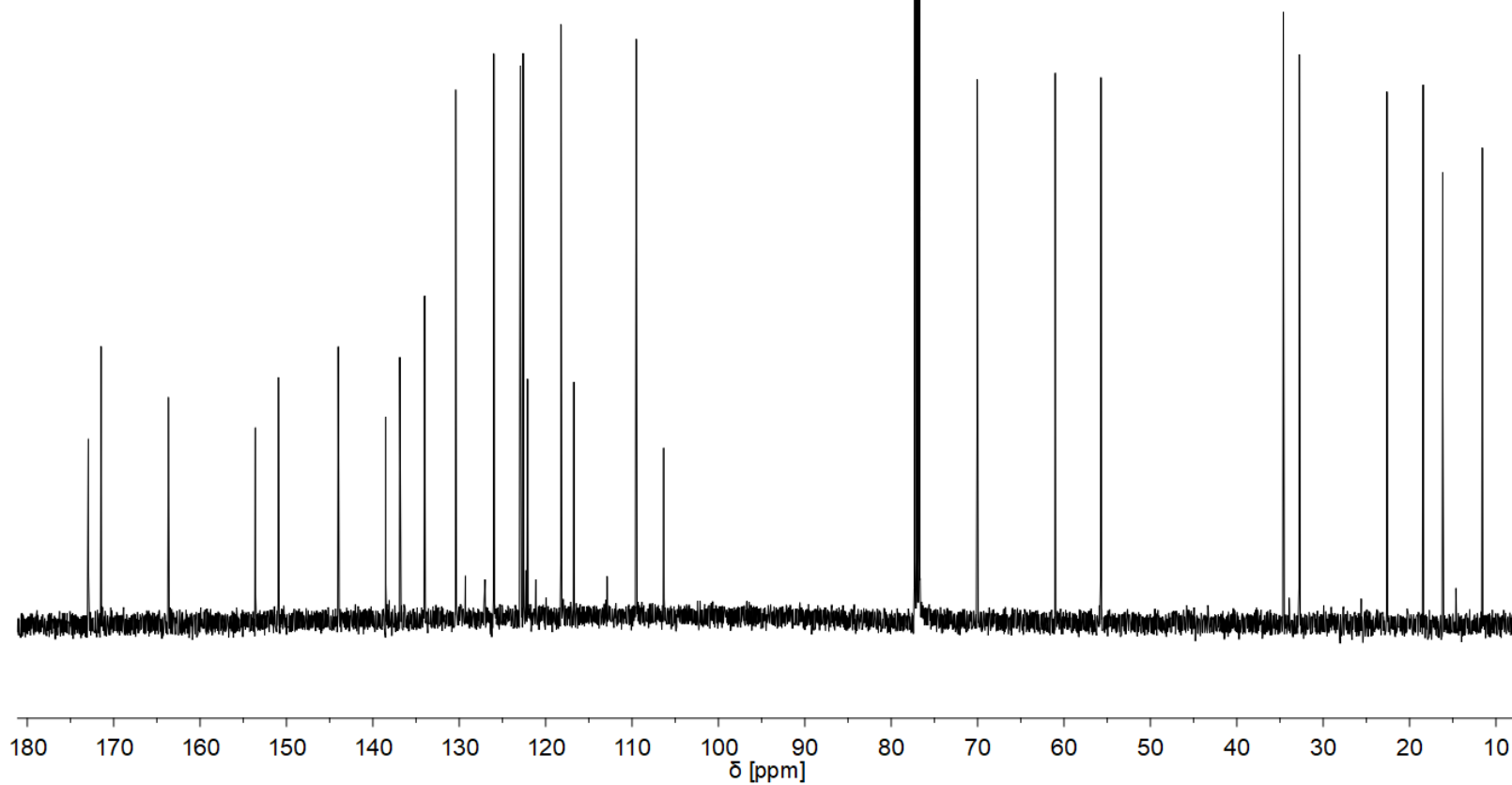
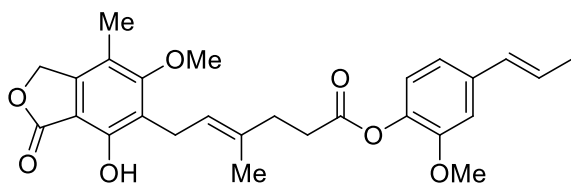
125.68
dmsO



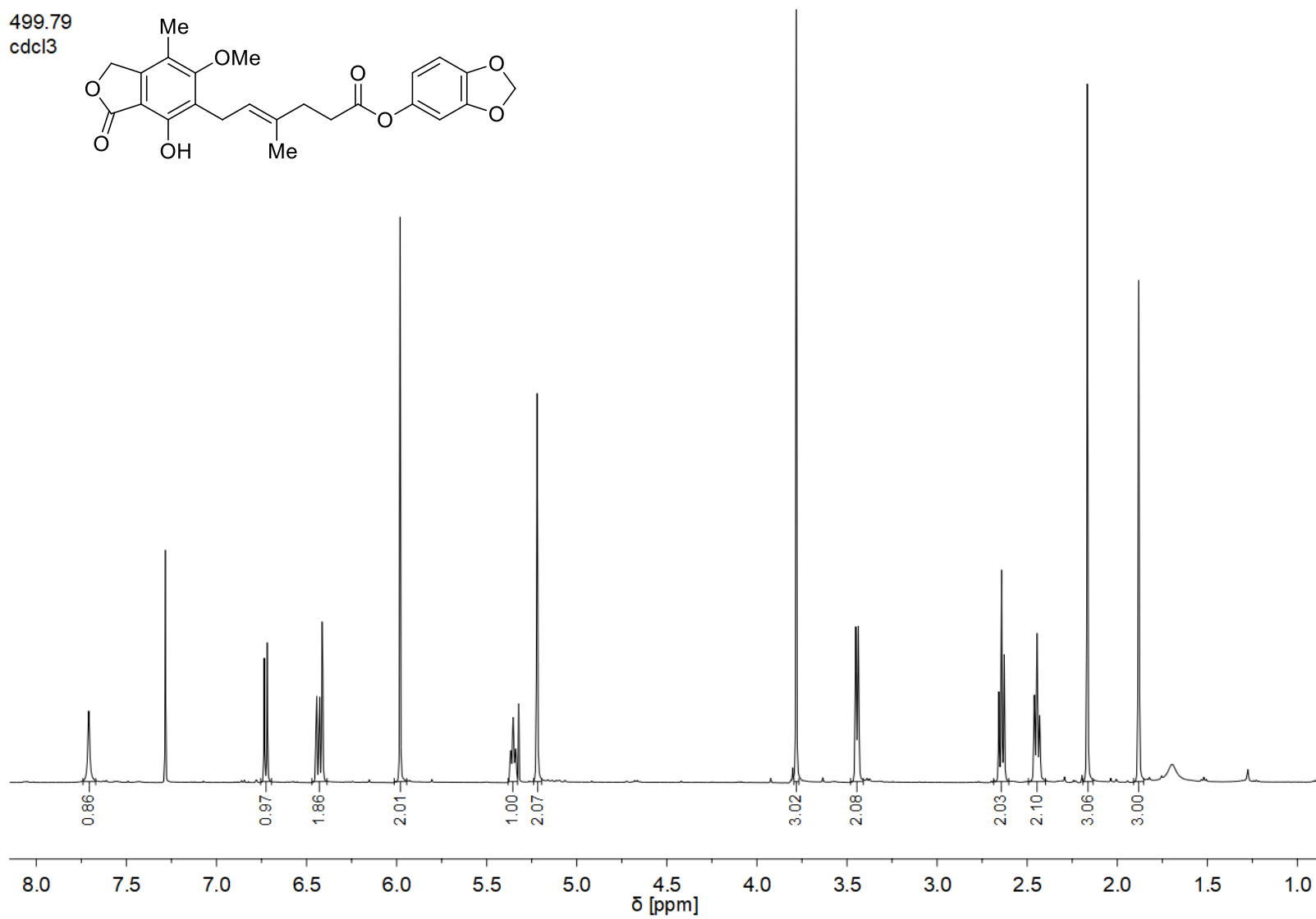
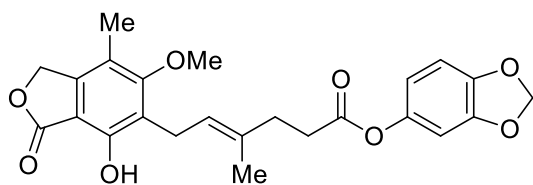
499.78
cdcl3



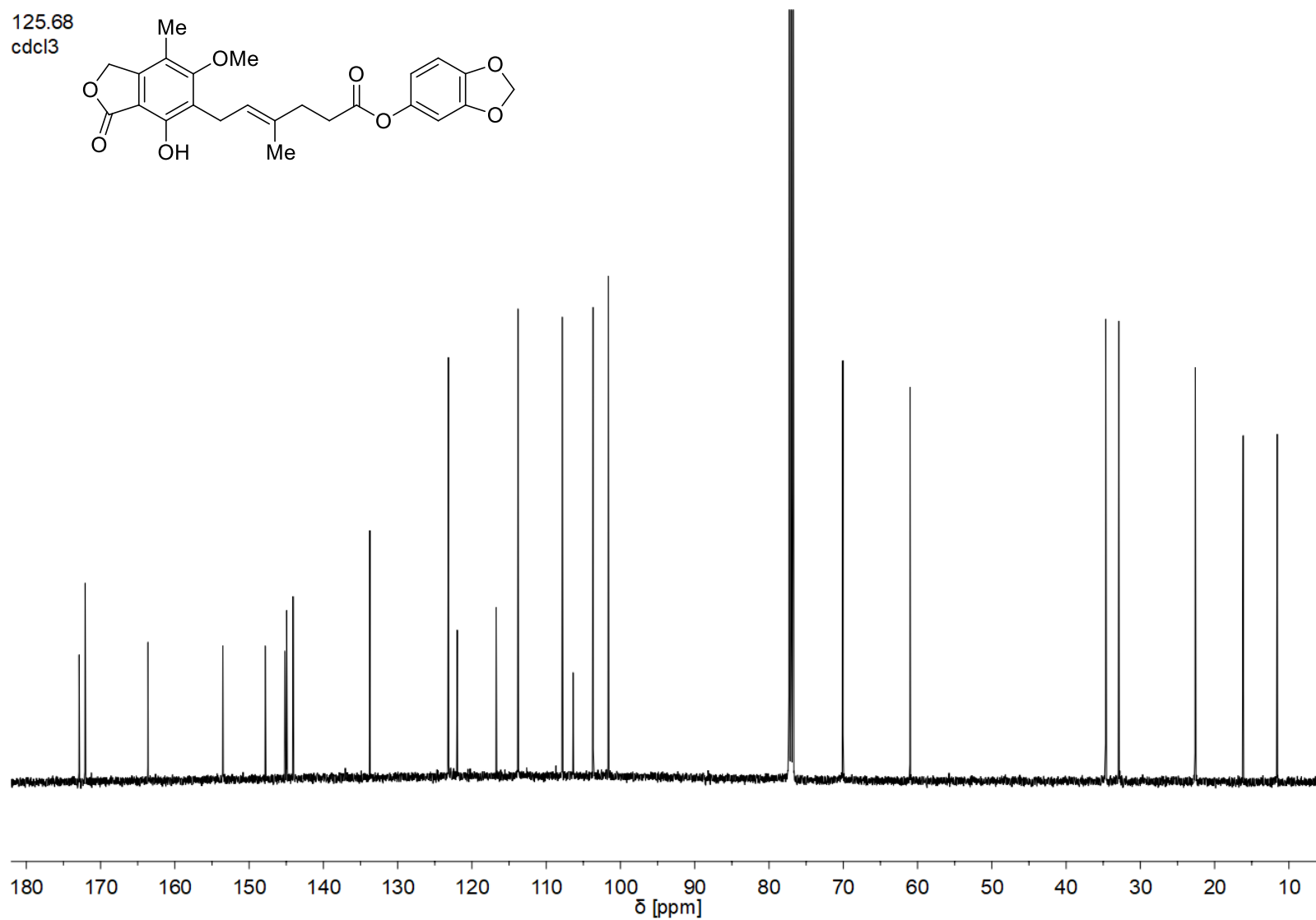
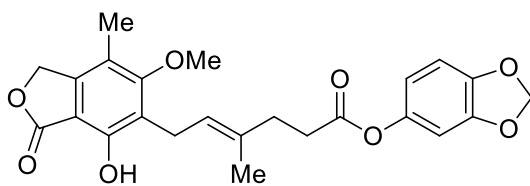
125.68
cdcl3



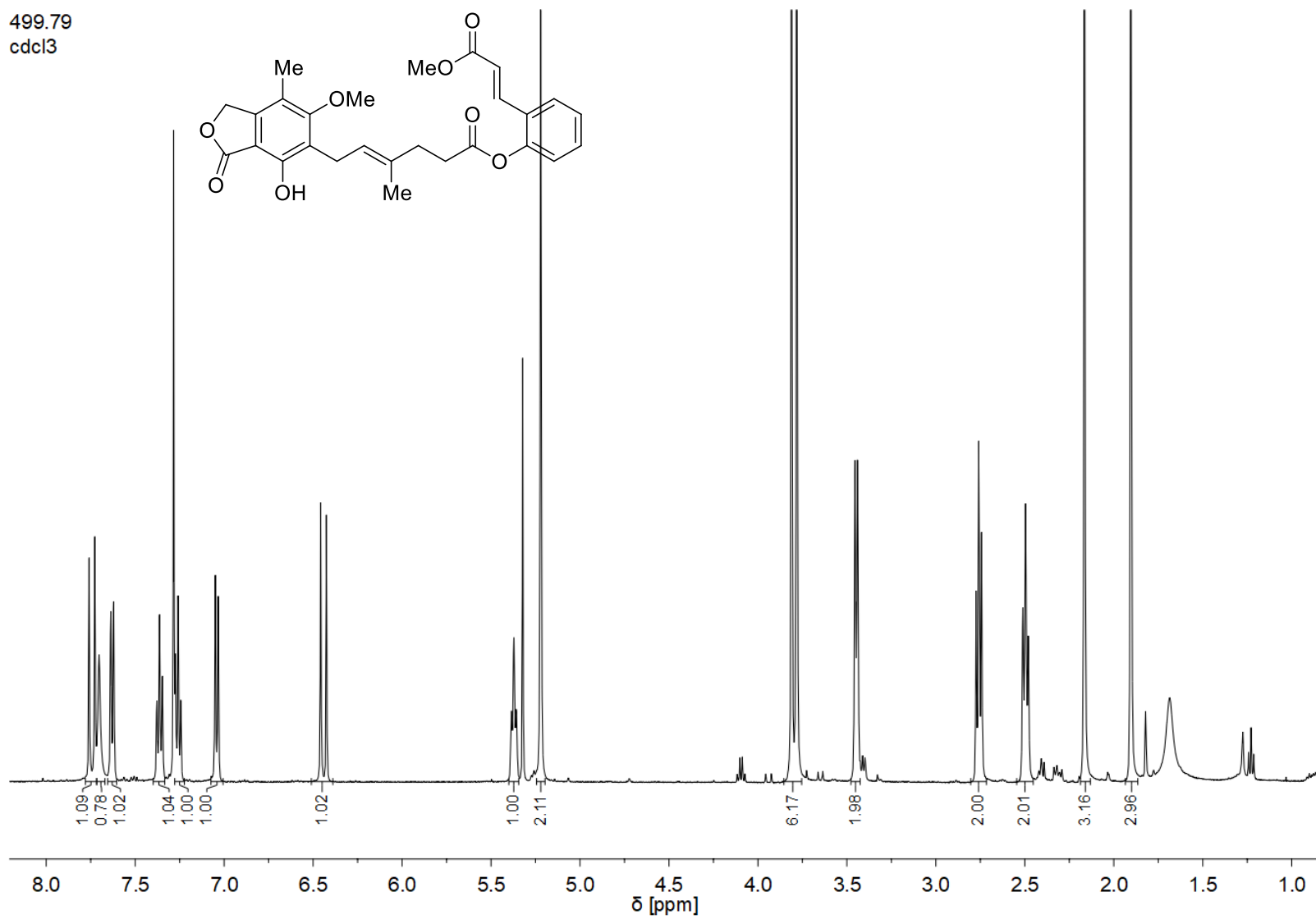
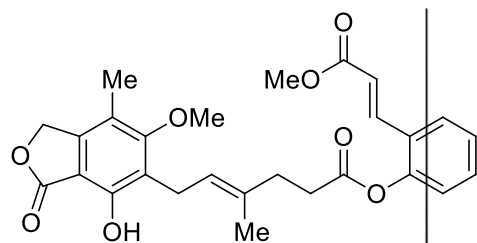
499.79
cdcl3



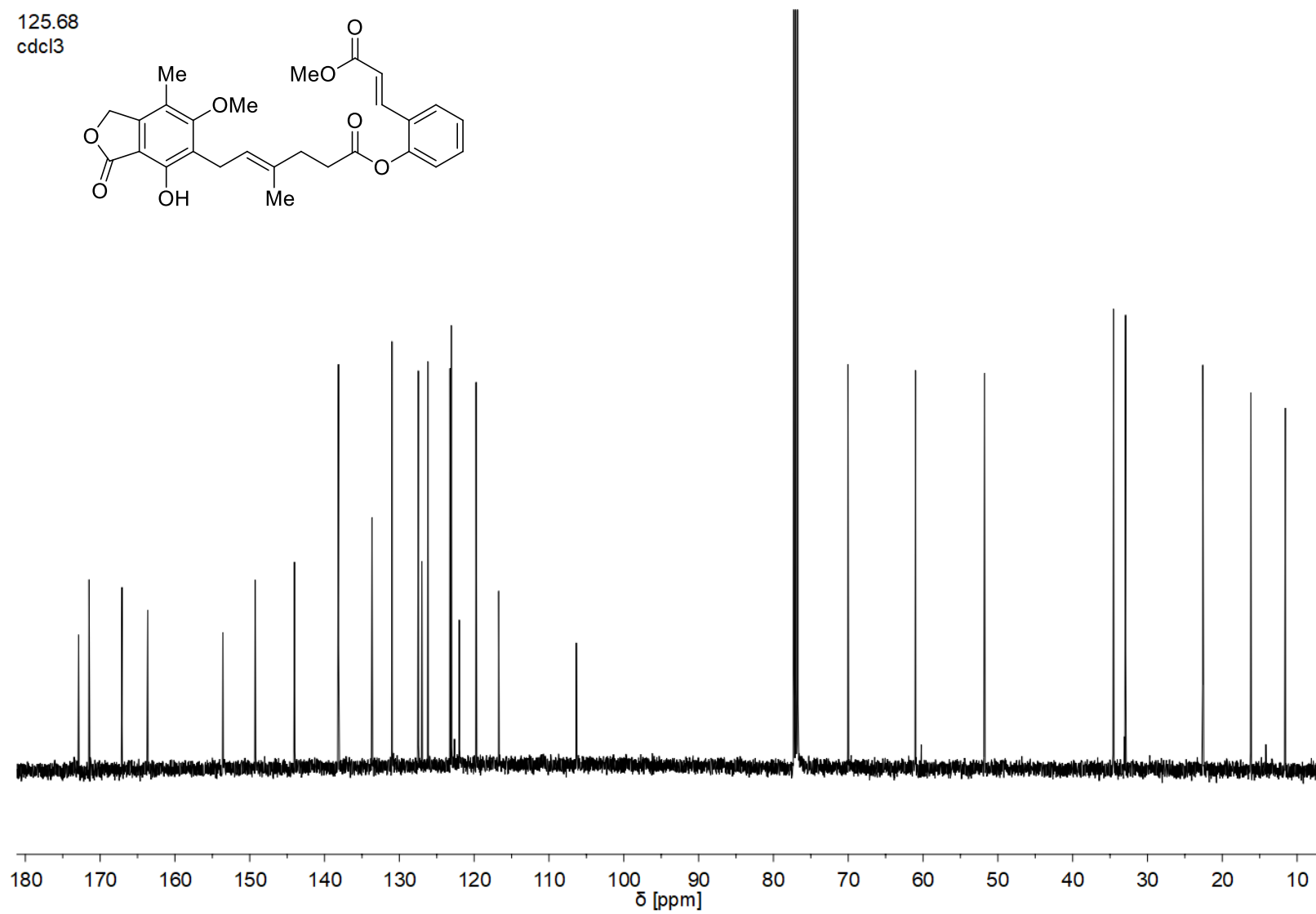
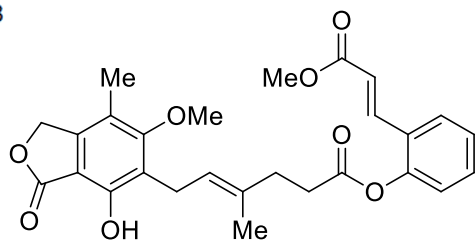
125.68
cdcl3



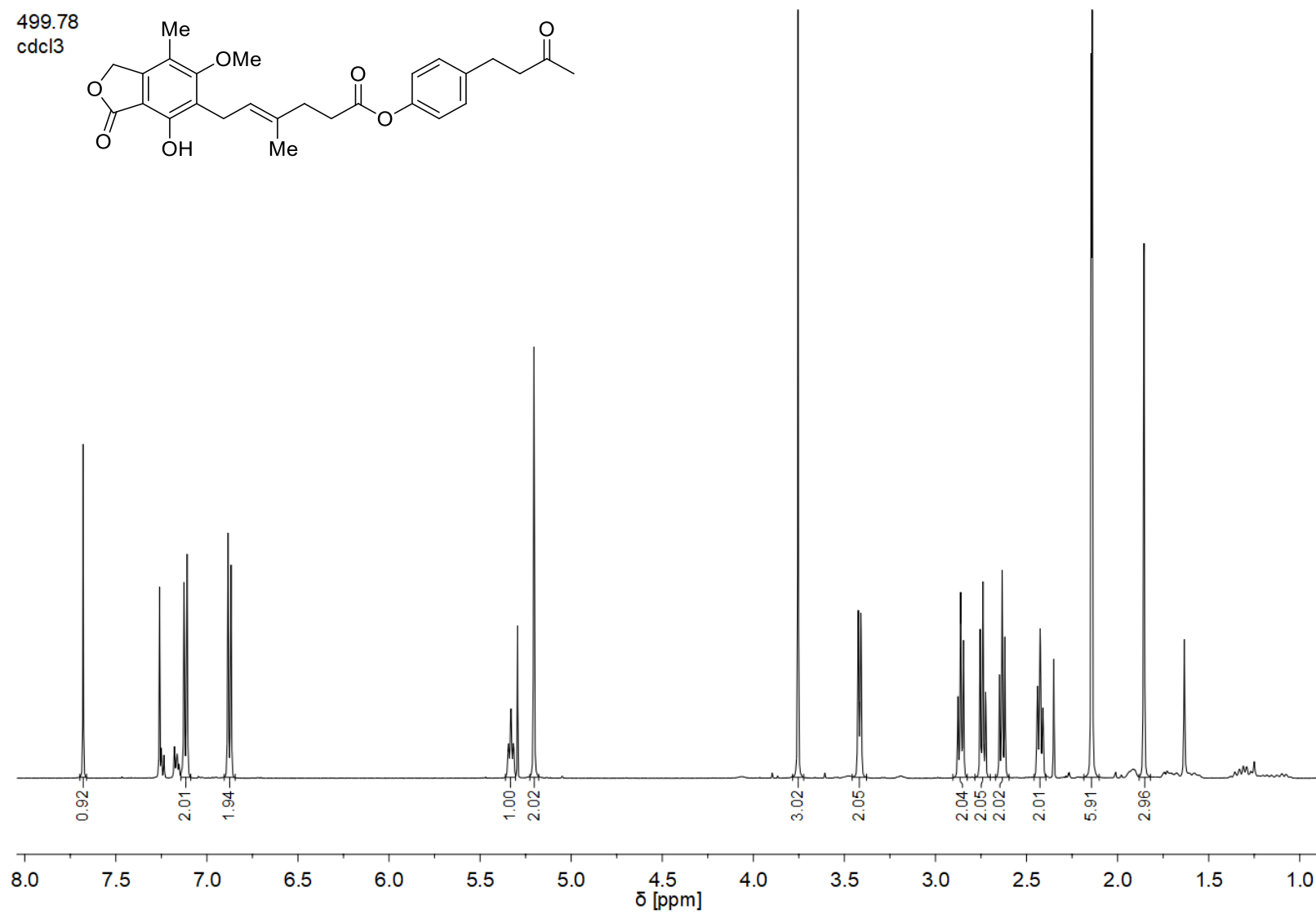
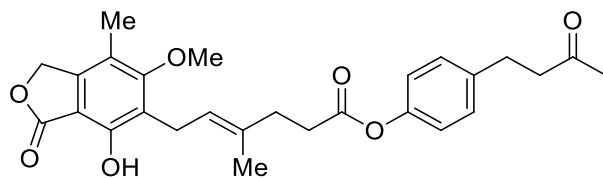
499.79
cdcl3



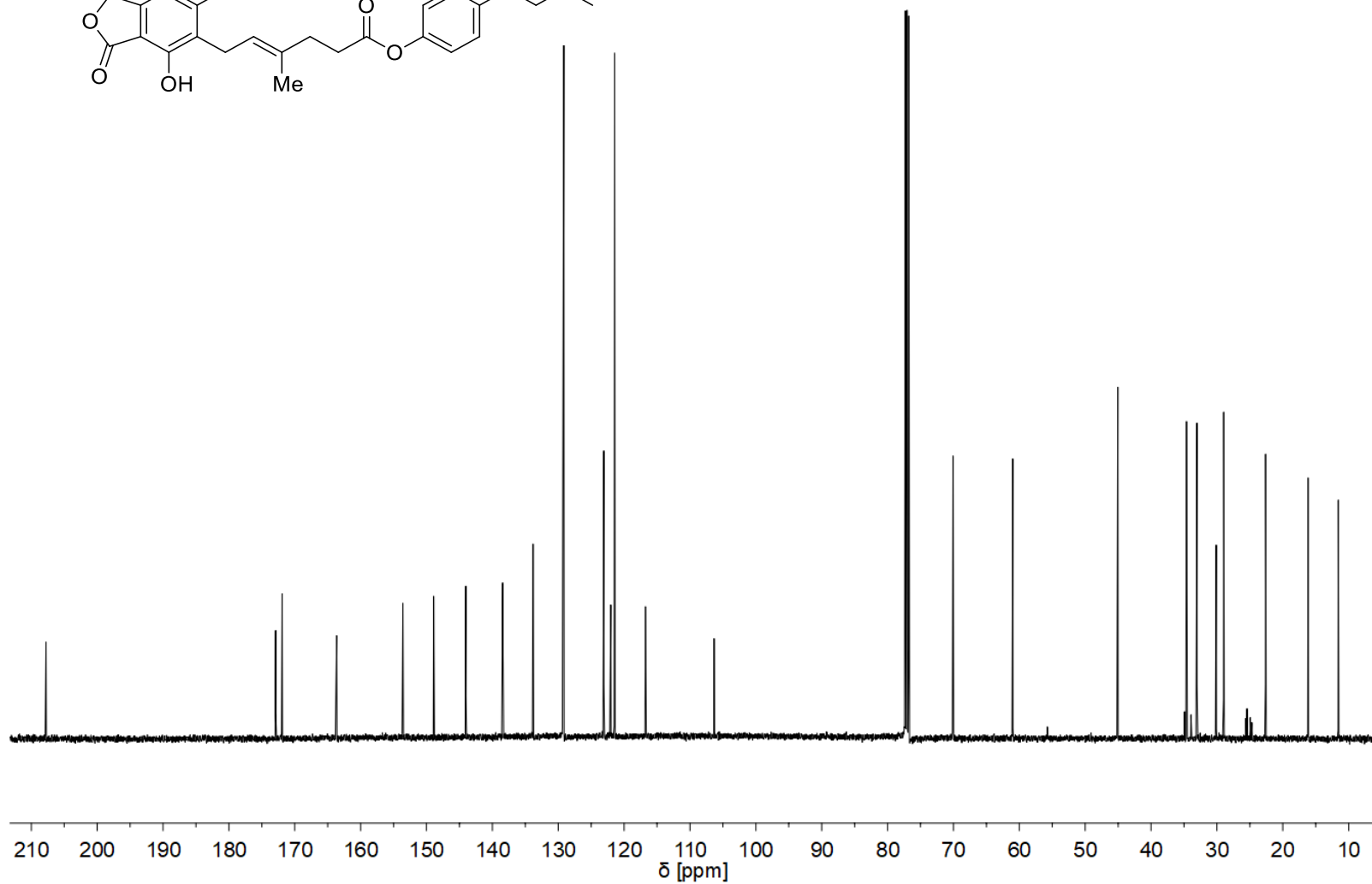
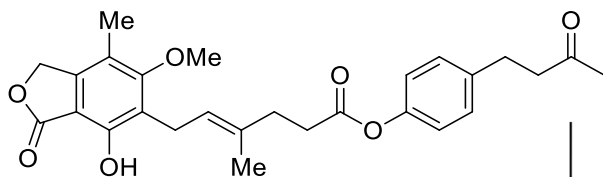
125.68
cdcl3

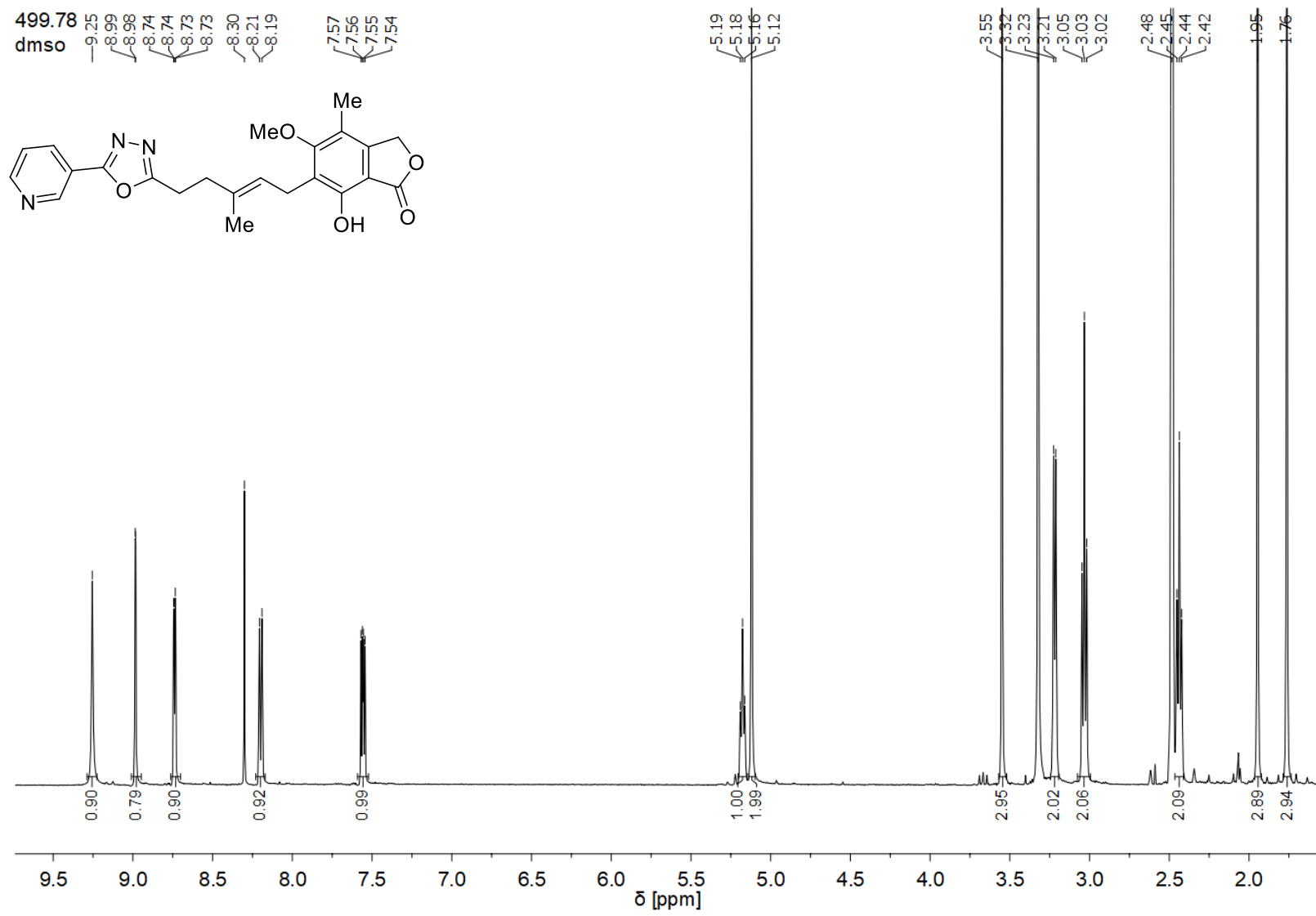


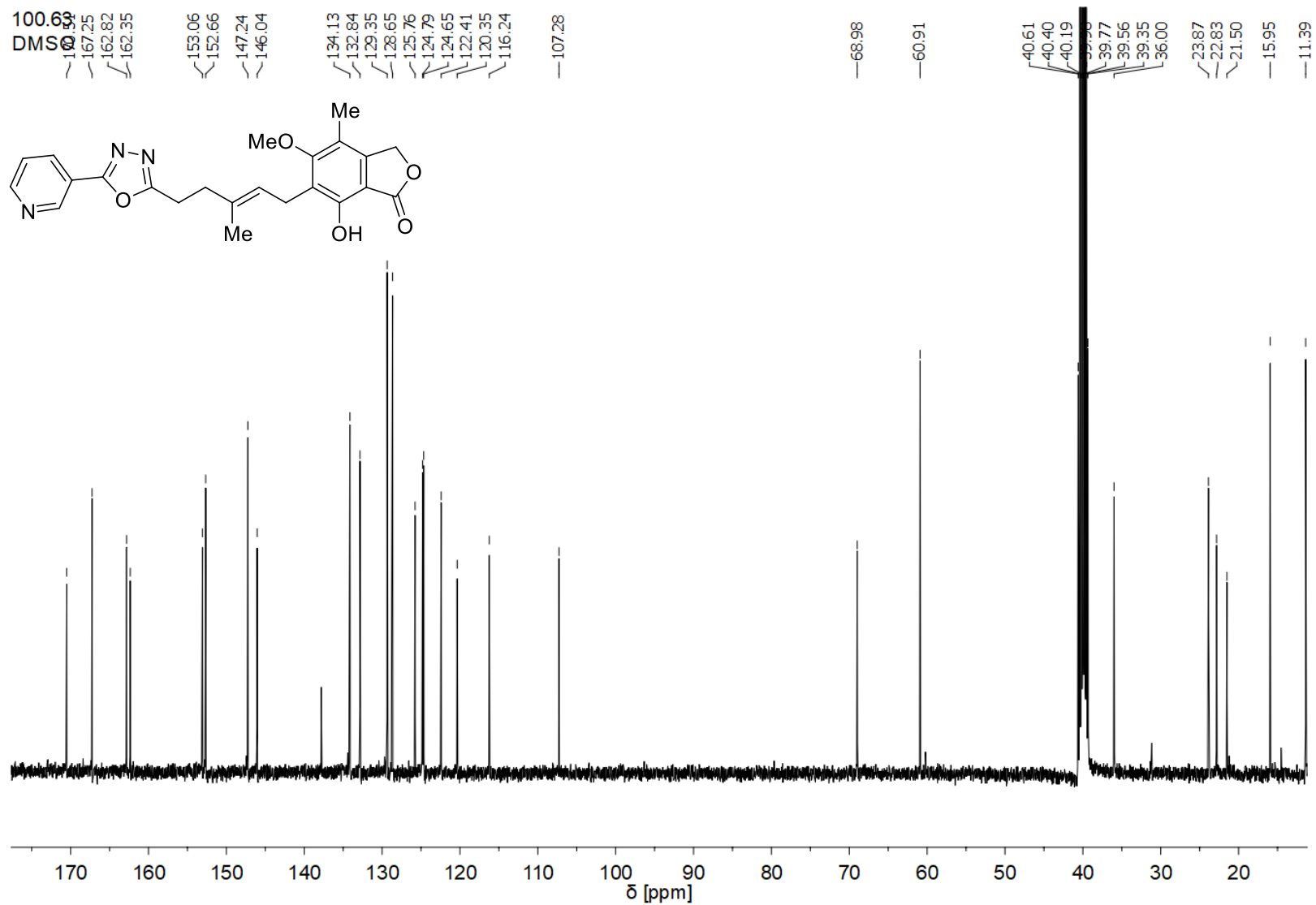
499.78
cdcl3

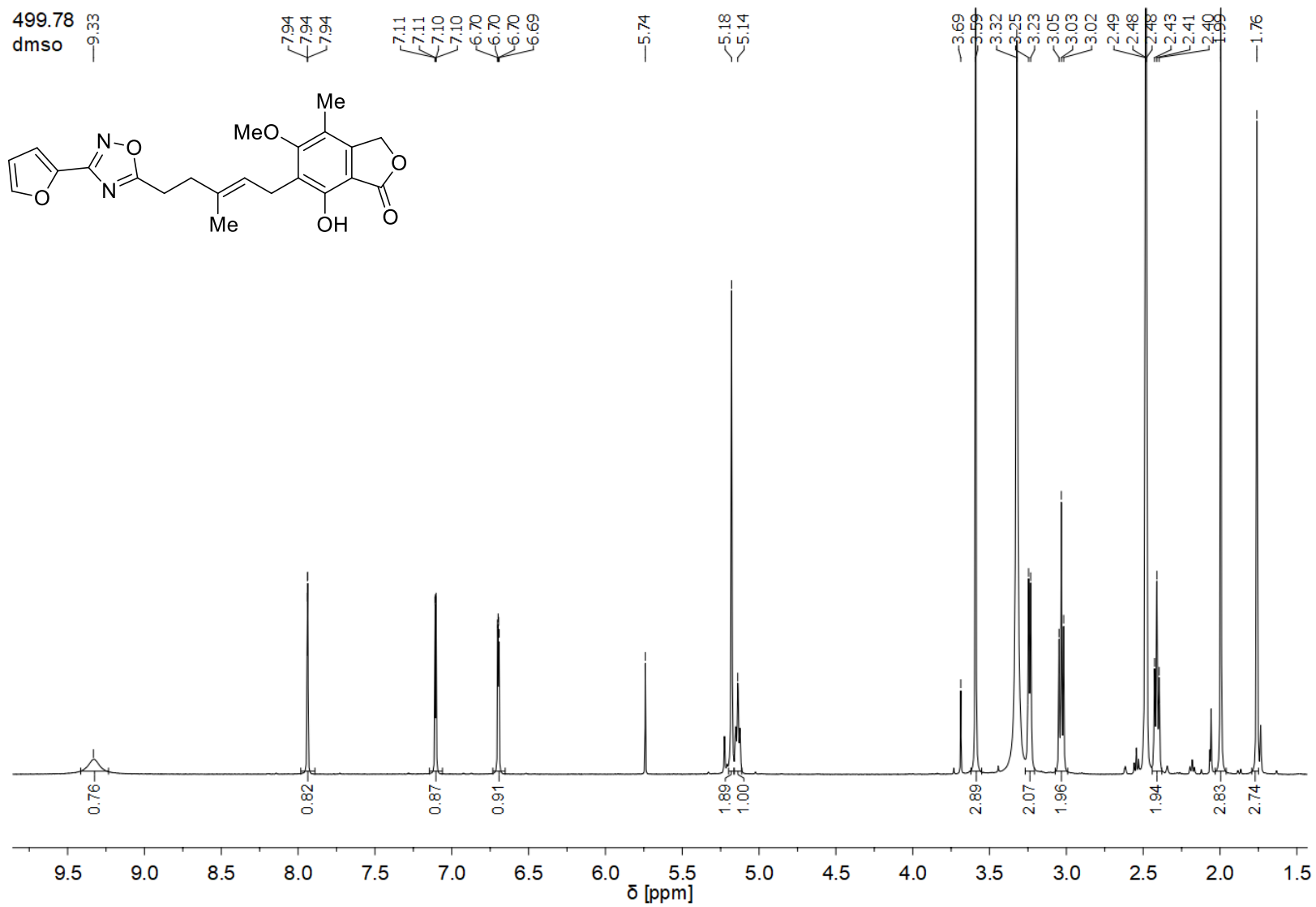


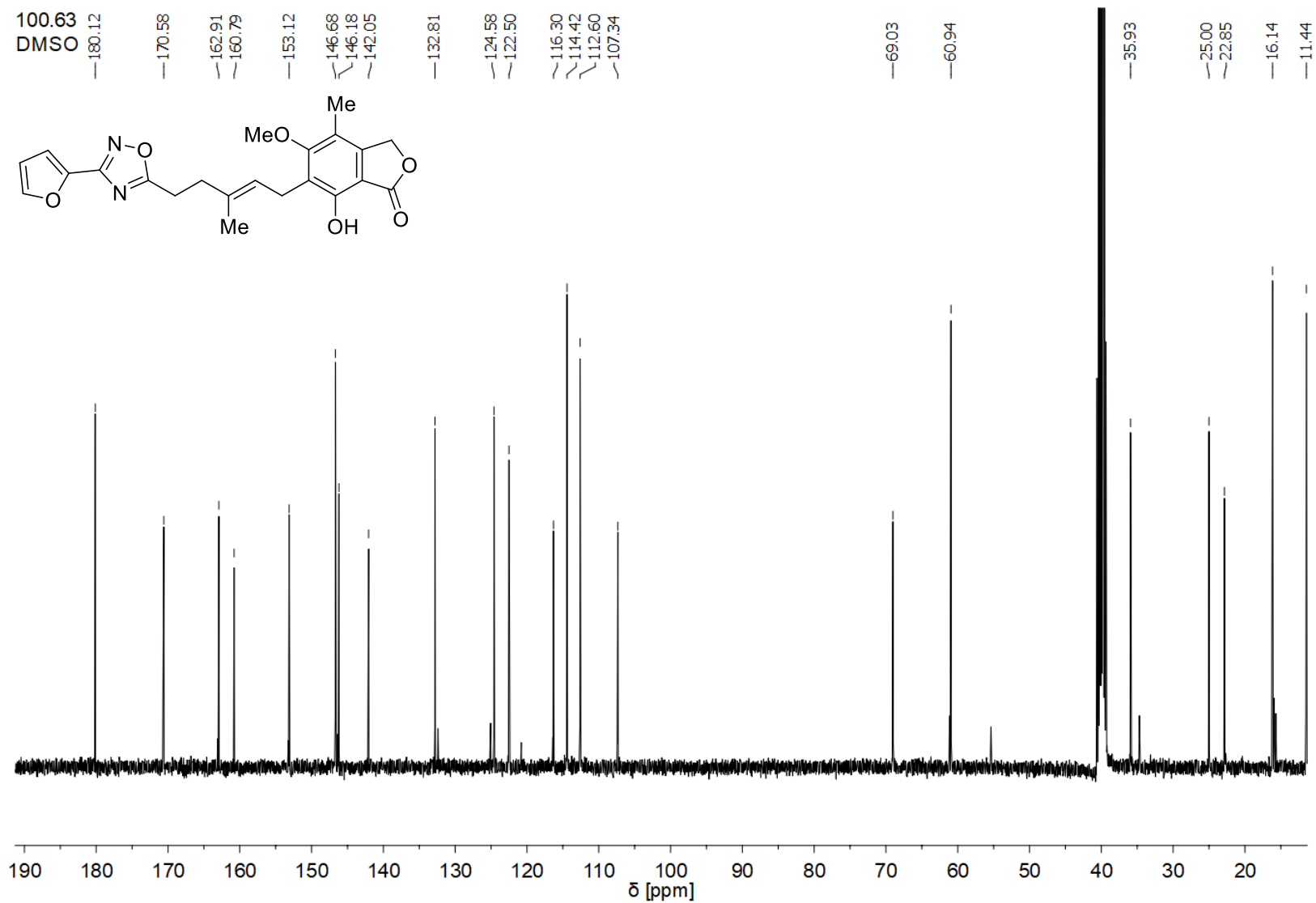
125.68
cdcl3



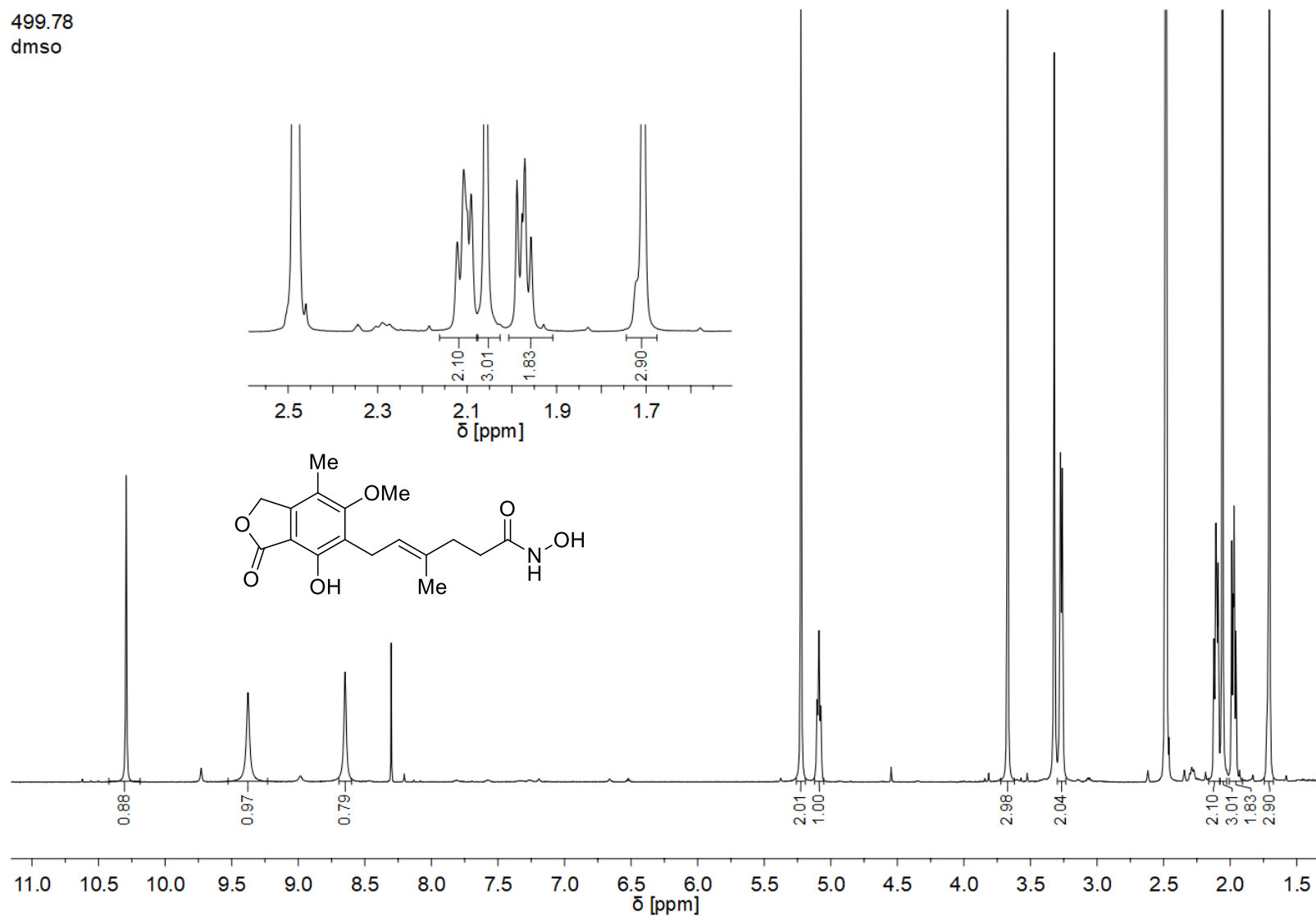


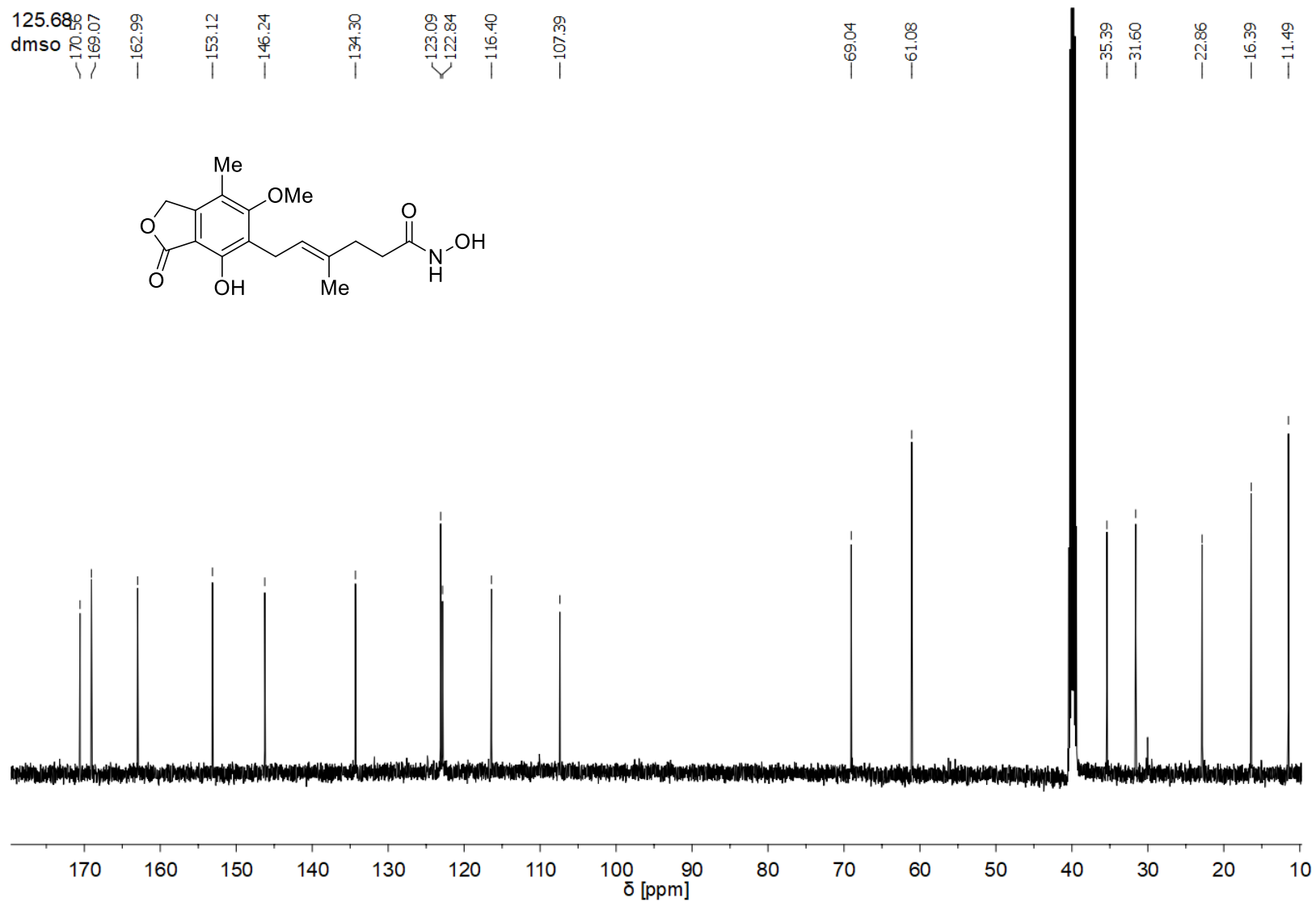






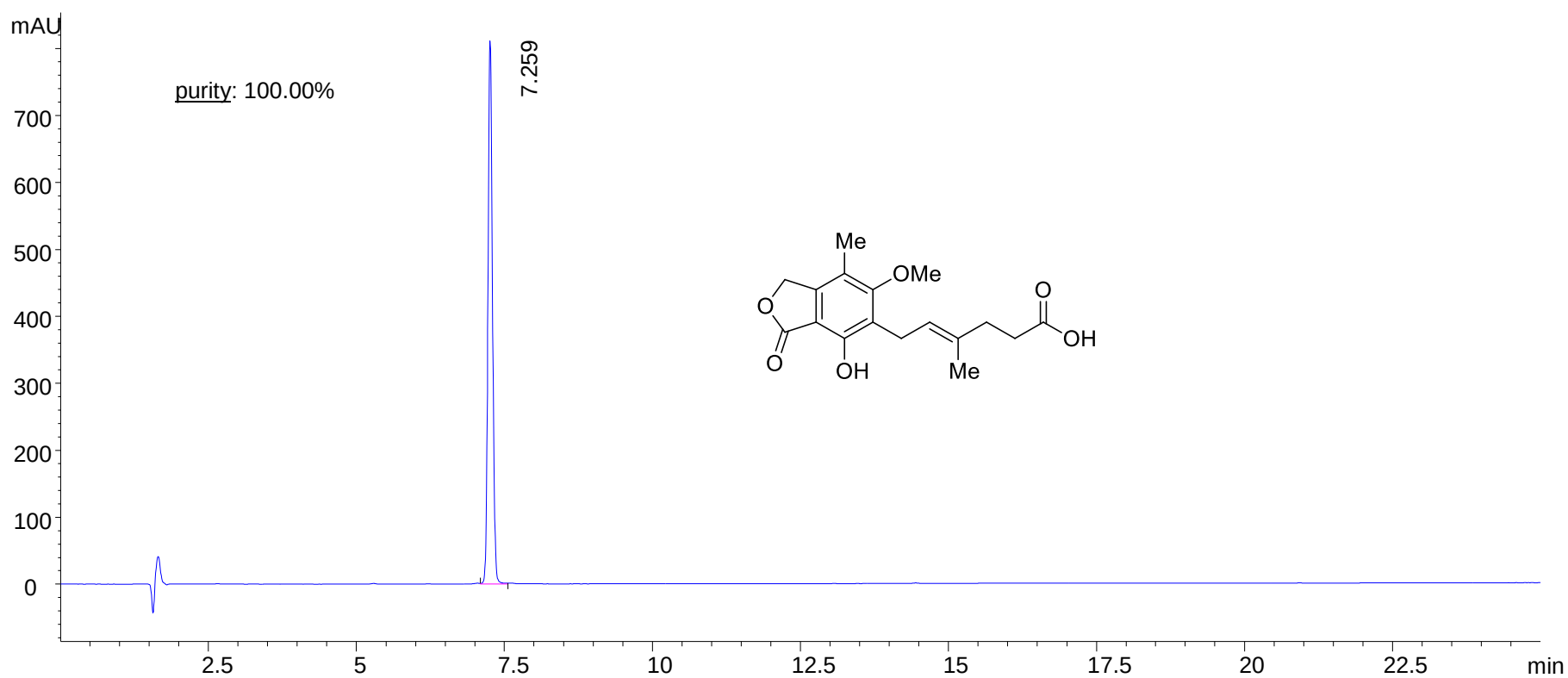
499.78
dmsO



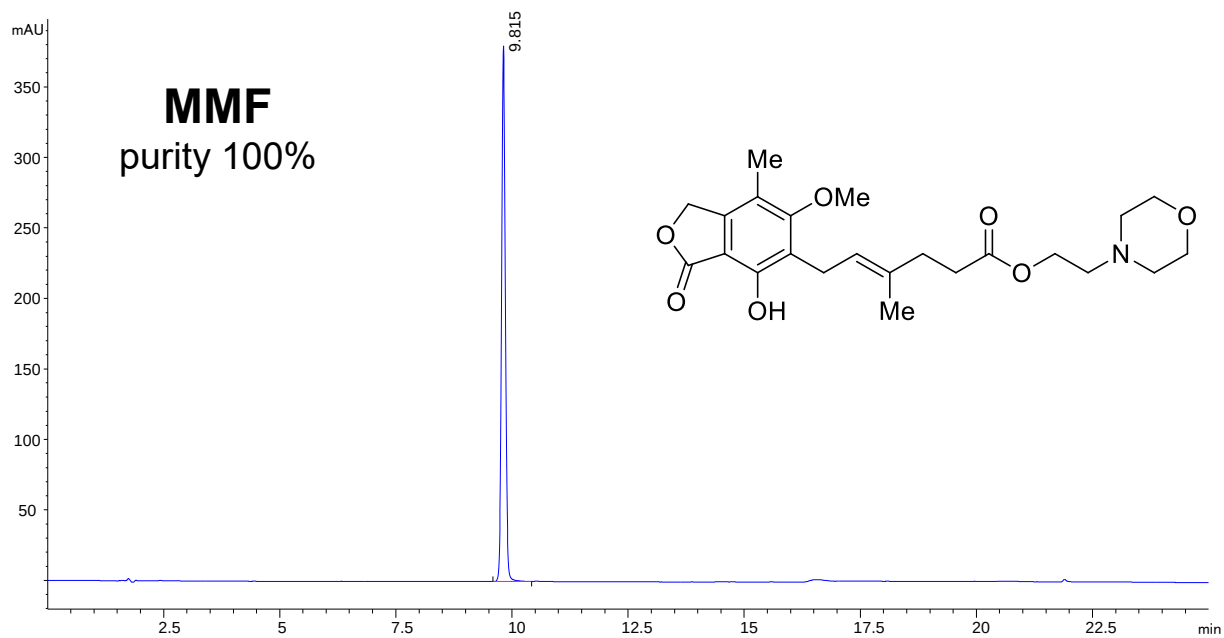


Załącznik B. Chromatogramy wysokosprawnej chromatografii cieczowej dla wybranych związków (HPLC)

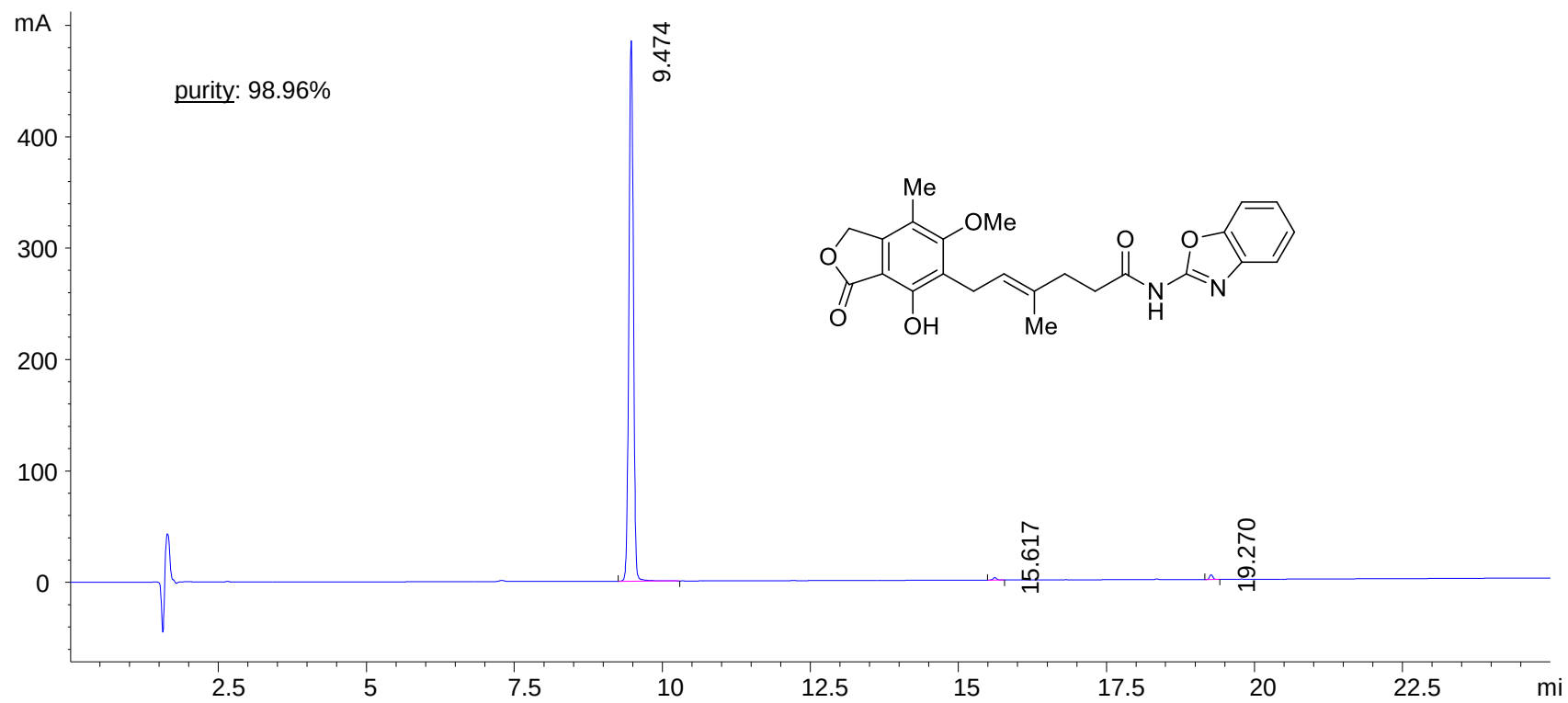
HPLC: MPA



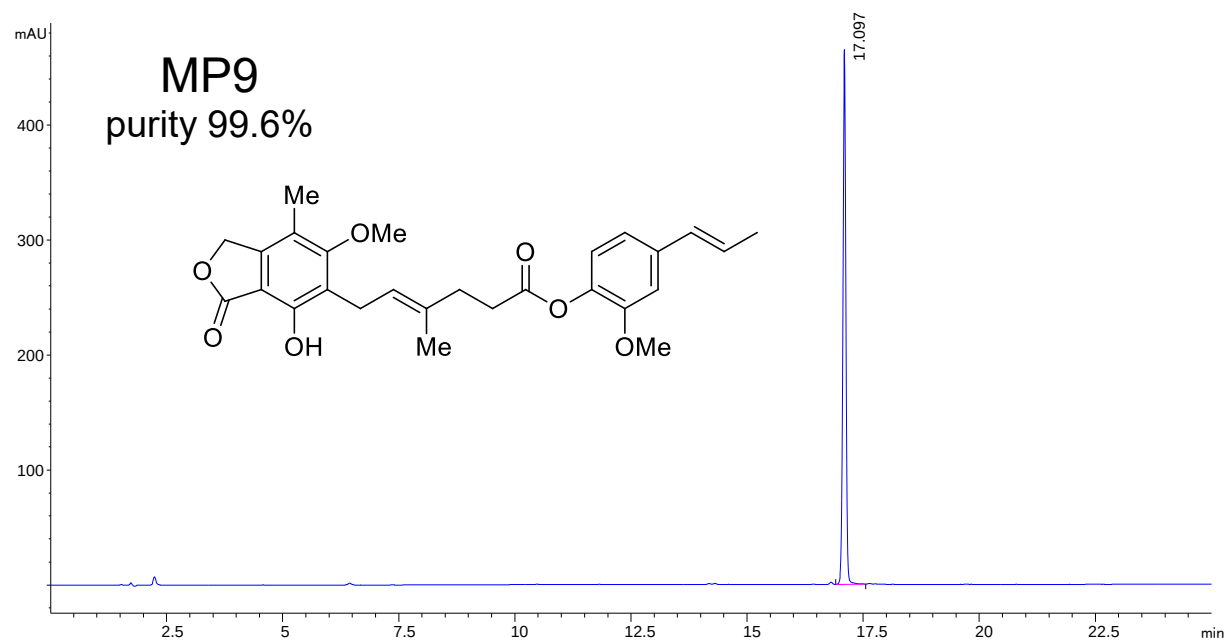
HPLC: MMF



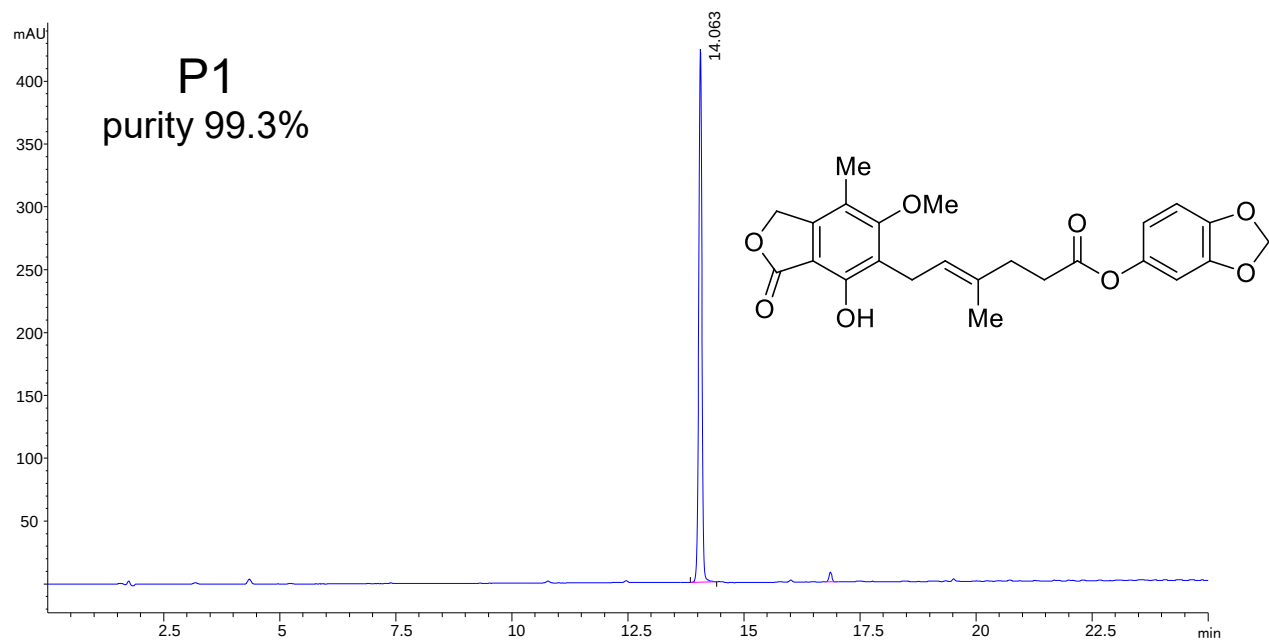
HPLC: A2



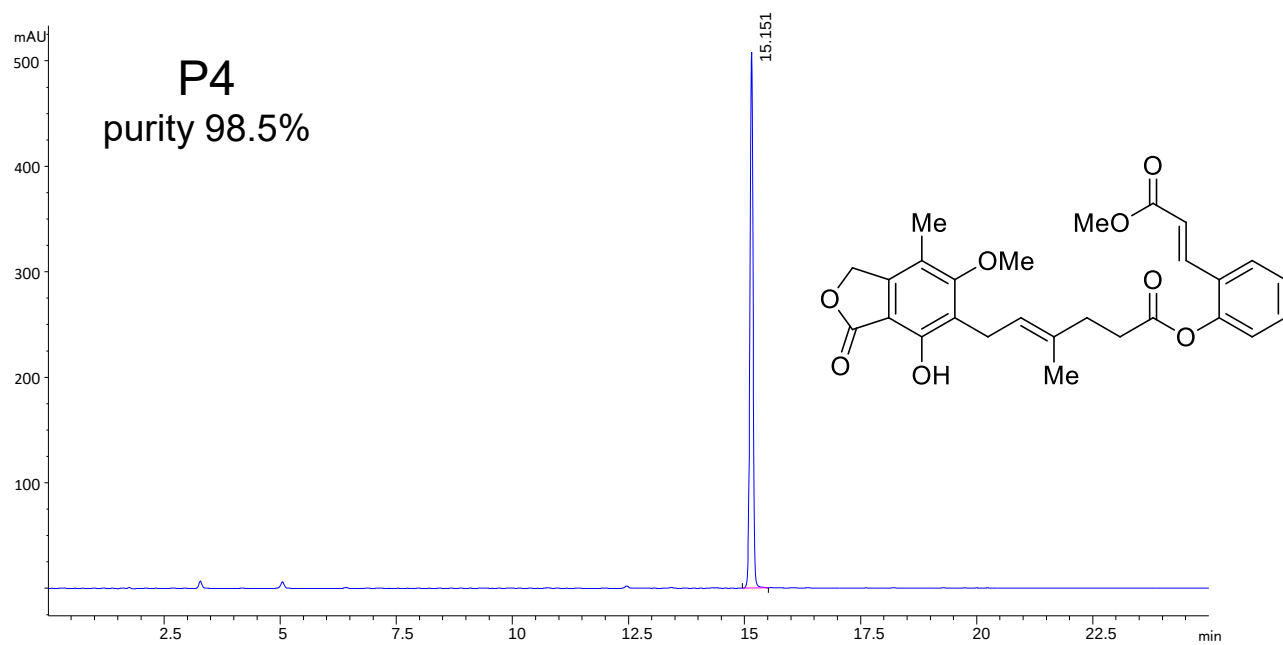
HPLC: **MP9**



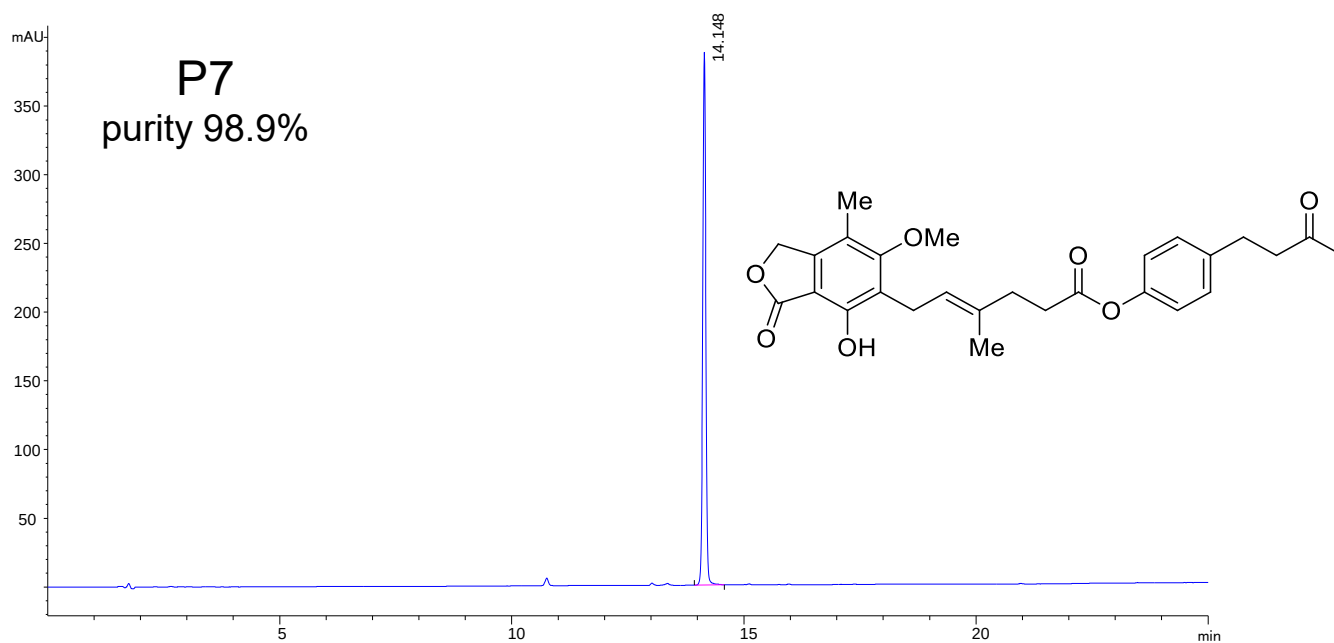
HPLC: **P1**



HPLC: P4

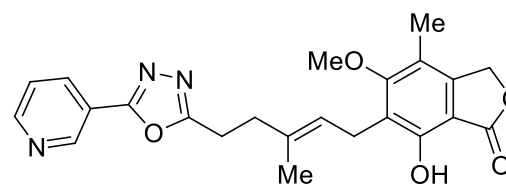


HPLC: P7



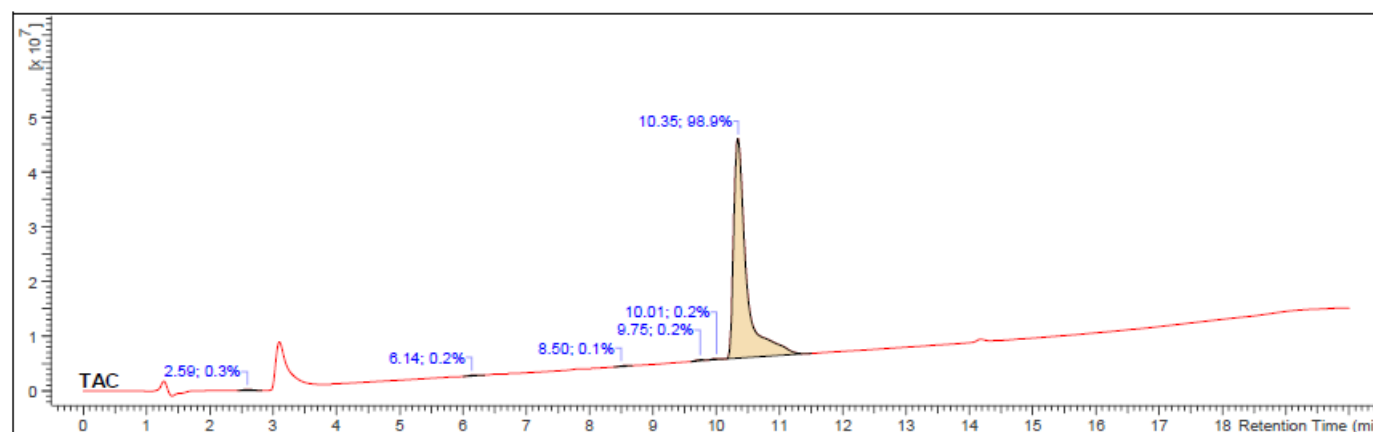
HPLC: 134OX_3-Py

Sample Name: 134OX_3-Py ($\pm$ 1 mg/mL)
Sample ID: 601LCMS00036
Method: DA_25-100-100_15-5min_ $\pm$
Injection volume: 1 μ L
Acquisition date: 03/05/2024
Instrument: Shimadzu LCMS-2020



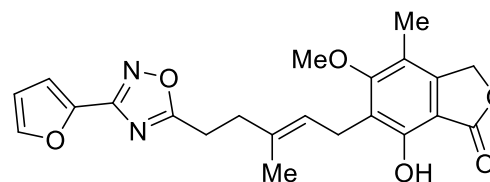
PDA detector (190-800 nm)

Total absorption chromatogram



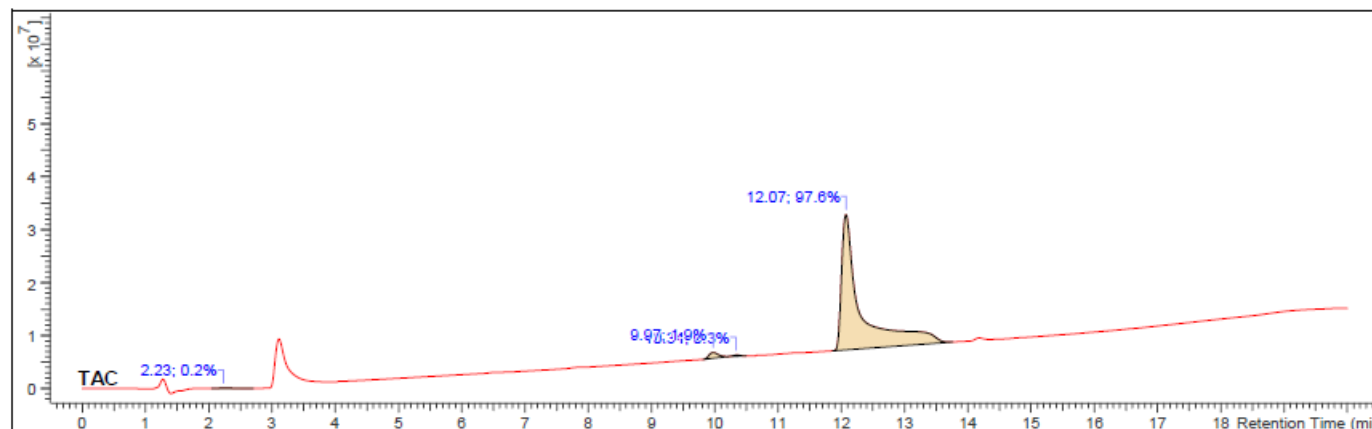
HPLC: 1240X_Fur

Sample Name: 1240X_Fur (± 1 mg/mL)
Sample ID: 601LCMS00037
Method: DA_25-100-100_15-5min_ $\pm$
Injection volume: 1 μ L
Acquisition date: 03/05/2024
Instrument: Shimadzu LCMS-2020



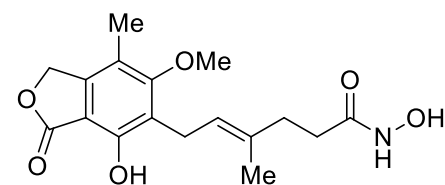
PDA detector (190-800 nm)

Total absorption chromatogram



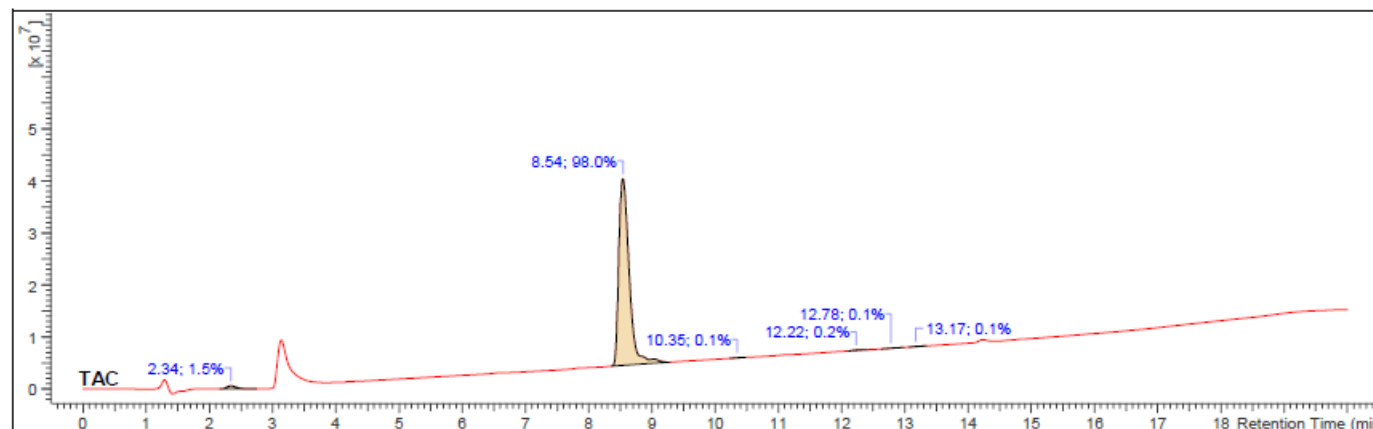
HPLC: MPA-CONH-OH

Sample Name: MPA-NH-OH ($\pm$ 1 mg/mL)
Sample ID: 601LCMS00042
Method: DA_25-100-100_15-5min_ $\pm$
Injection volume: 1 μ L
Acquisition date: 03/05/2024
Instrument: Shimadzu LCMS-2020



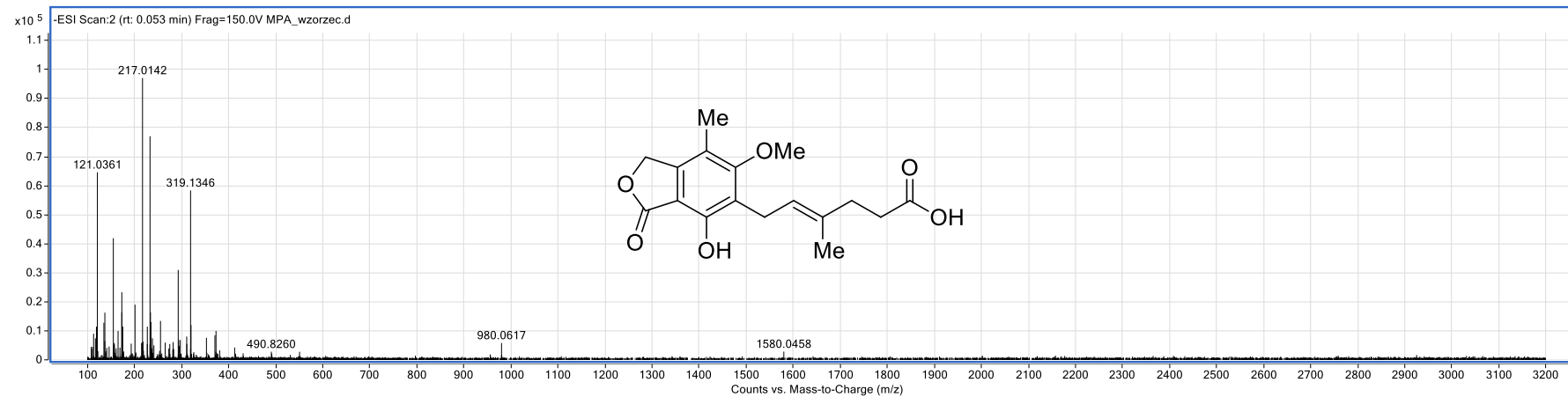
PDA detector (190-800 nm)

Total absorption chromatogram

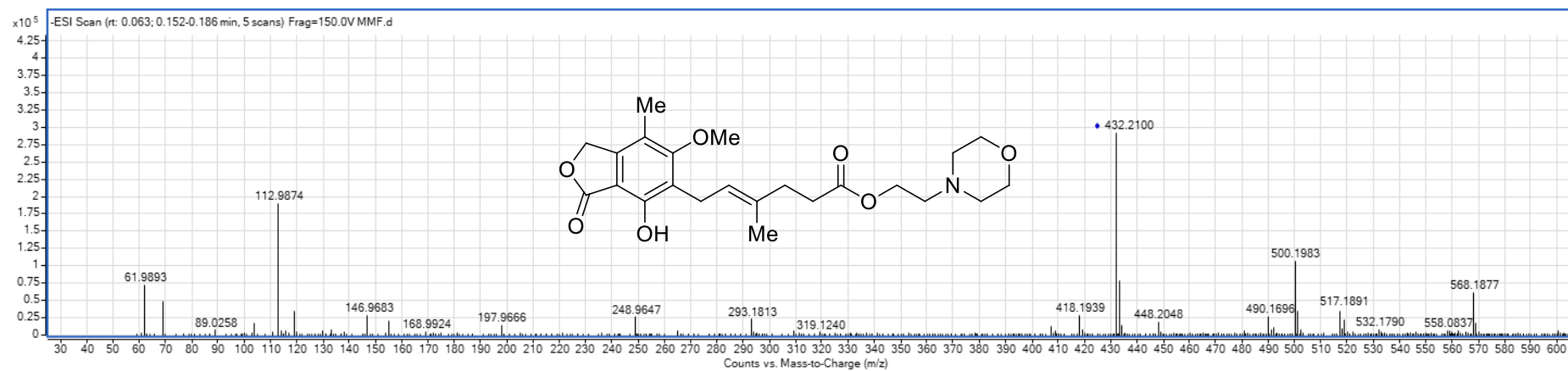


Załącznik C. Widma mas wysokiej rozdzielczości dla wybranych związków (HR-MS)

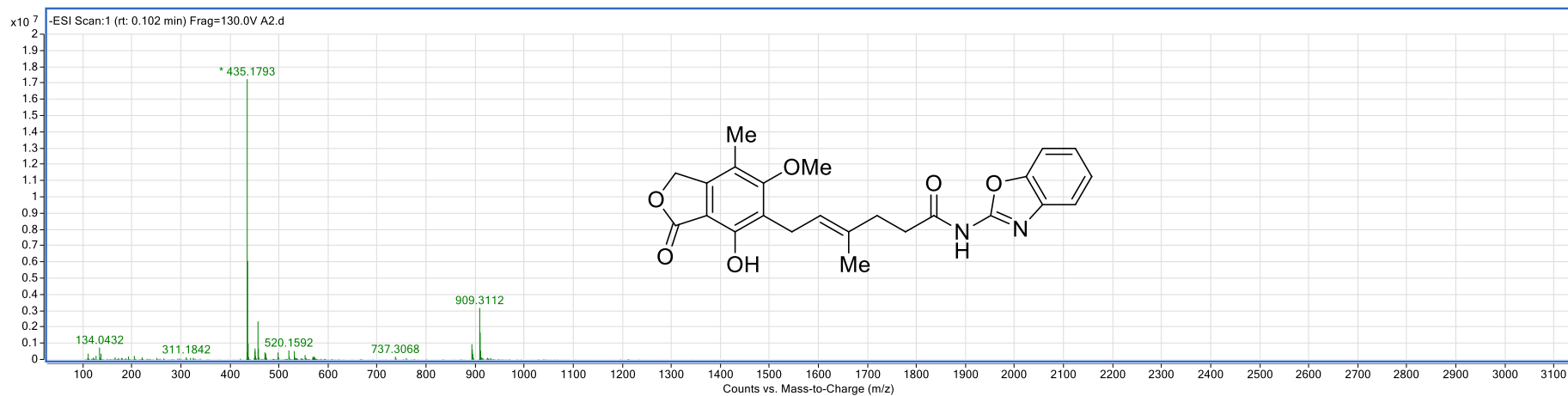
HR-MS: MPA



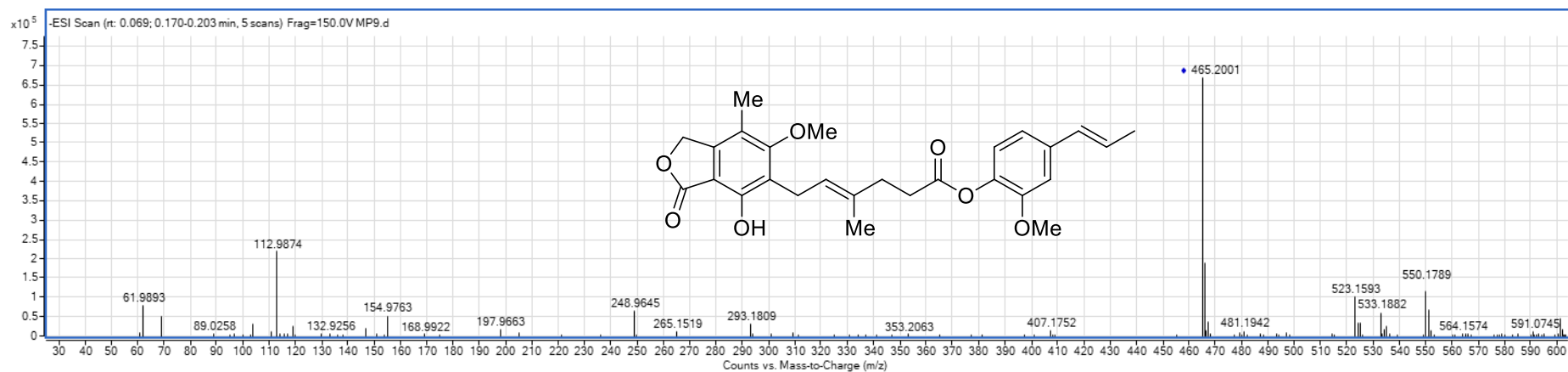
HR-MS: MMF



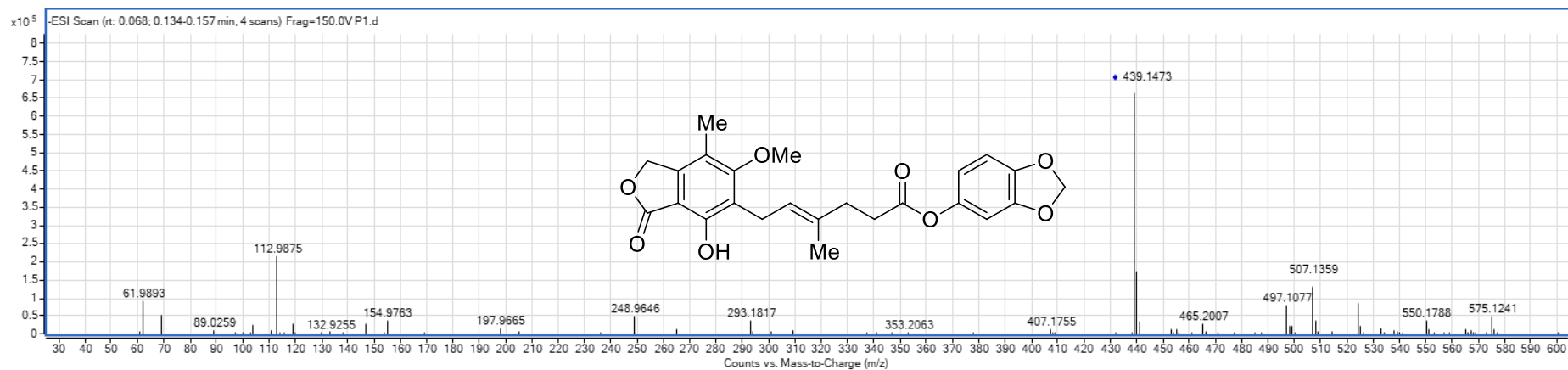
HR-MS: A2



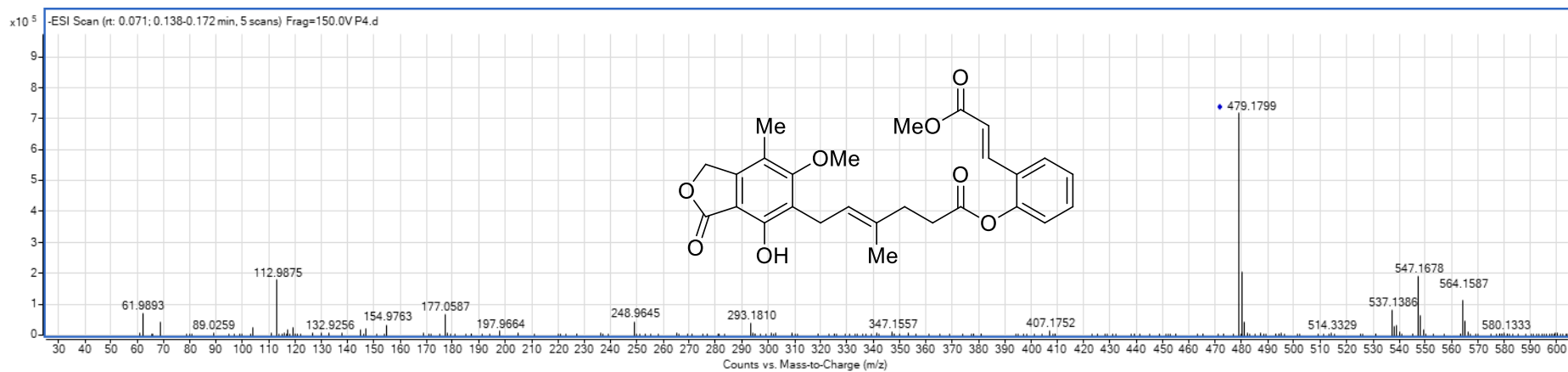
HR-MS: MP9



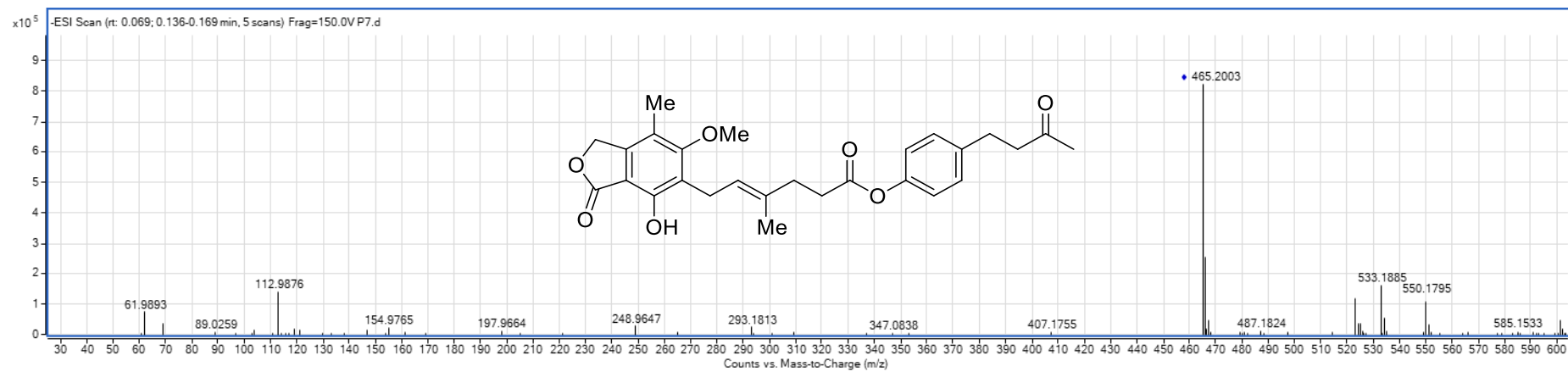
MS: Sesamol mycophenolate (**P1**):



MS: (Methyl *o*-coumarate) mycophenolate (**P4**):



MS: Raspberry ketone mycophenolate (**P7**):

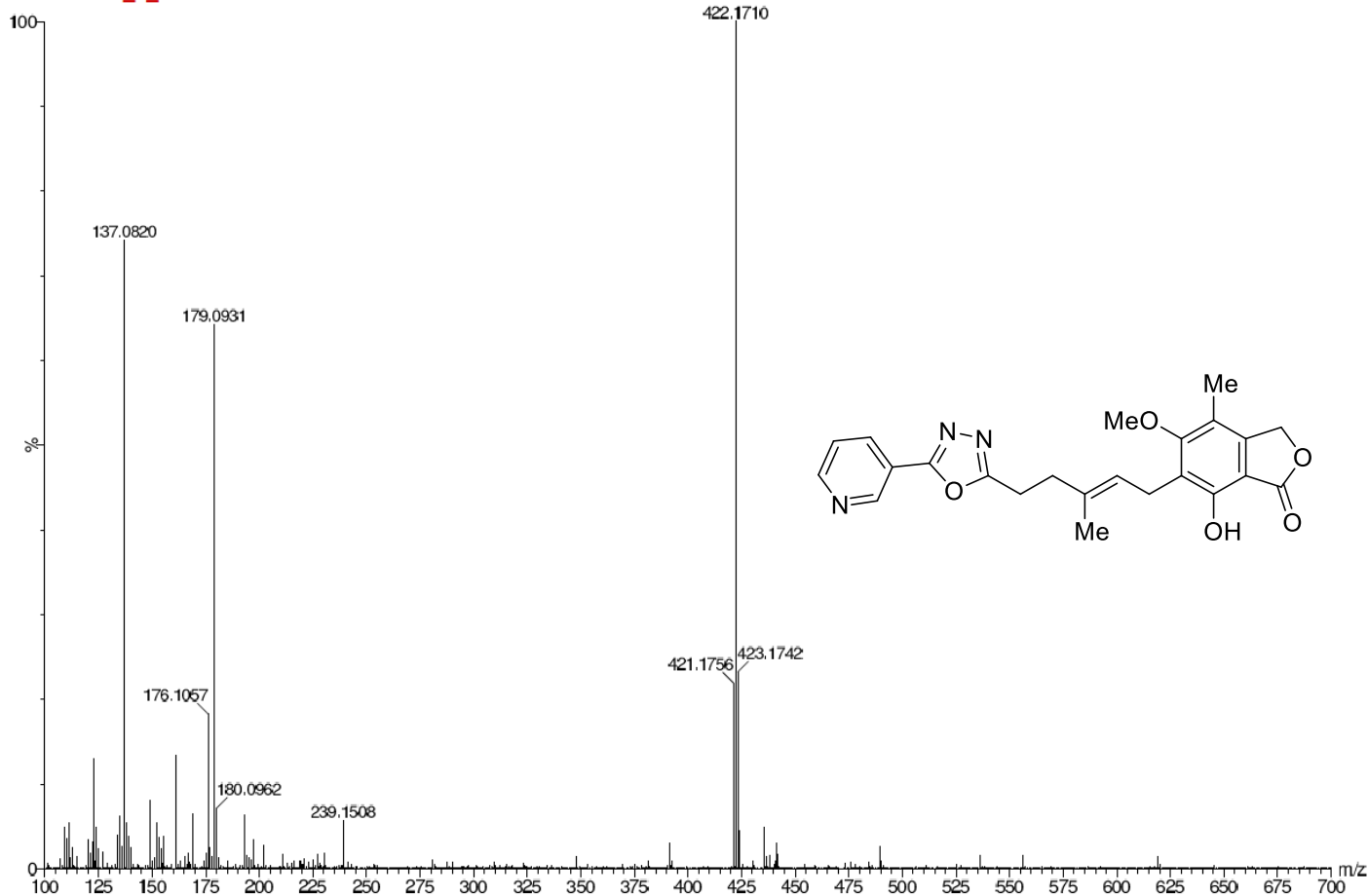


HR-MS: 134OX_3-Py

58796
JMW 134OX_3_PY

accurate mass

ES+
15-Dec-2023

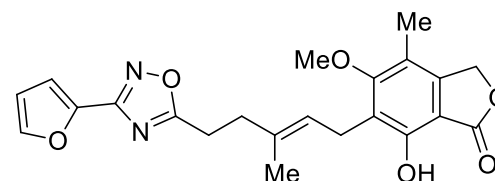
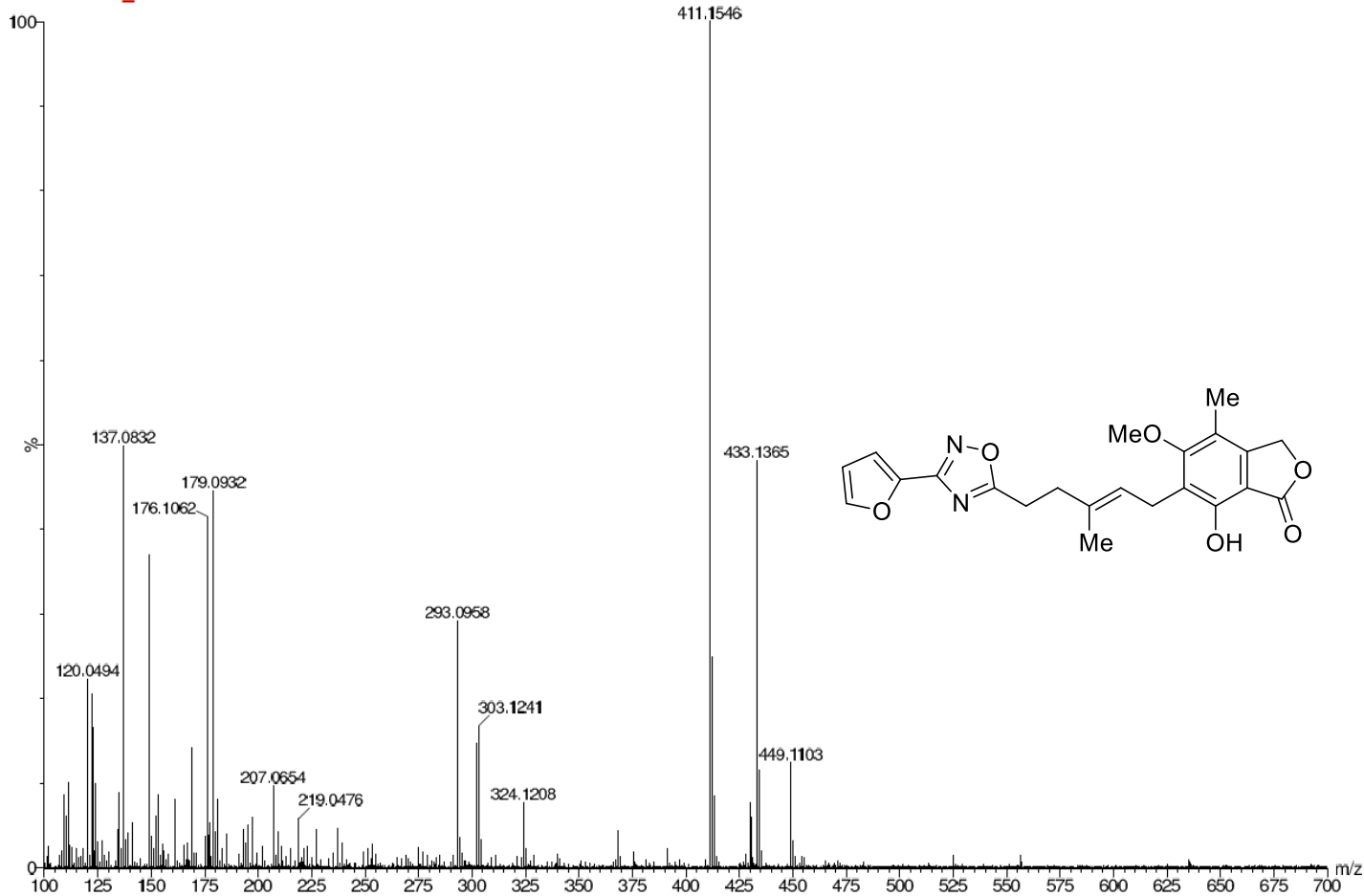


HR-MS: 124OX_Fur

58789
JMW 124OX_FUR

accurate mass

ES+
14-Dec-2023

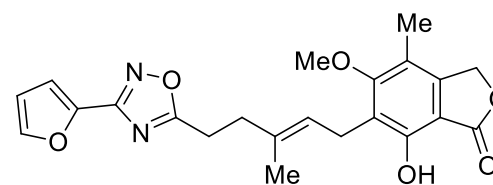
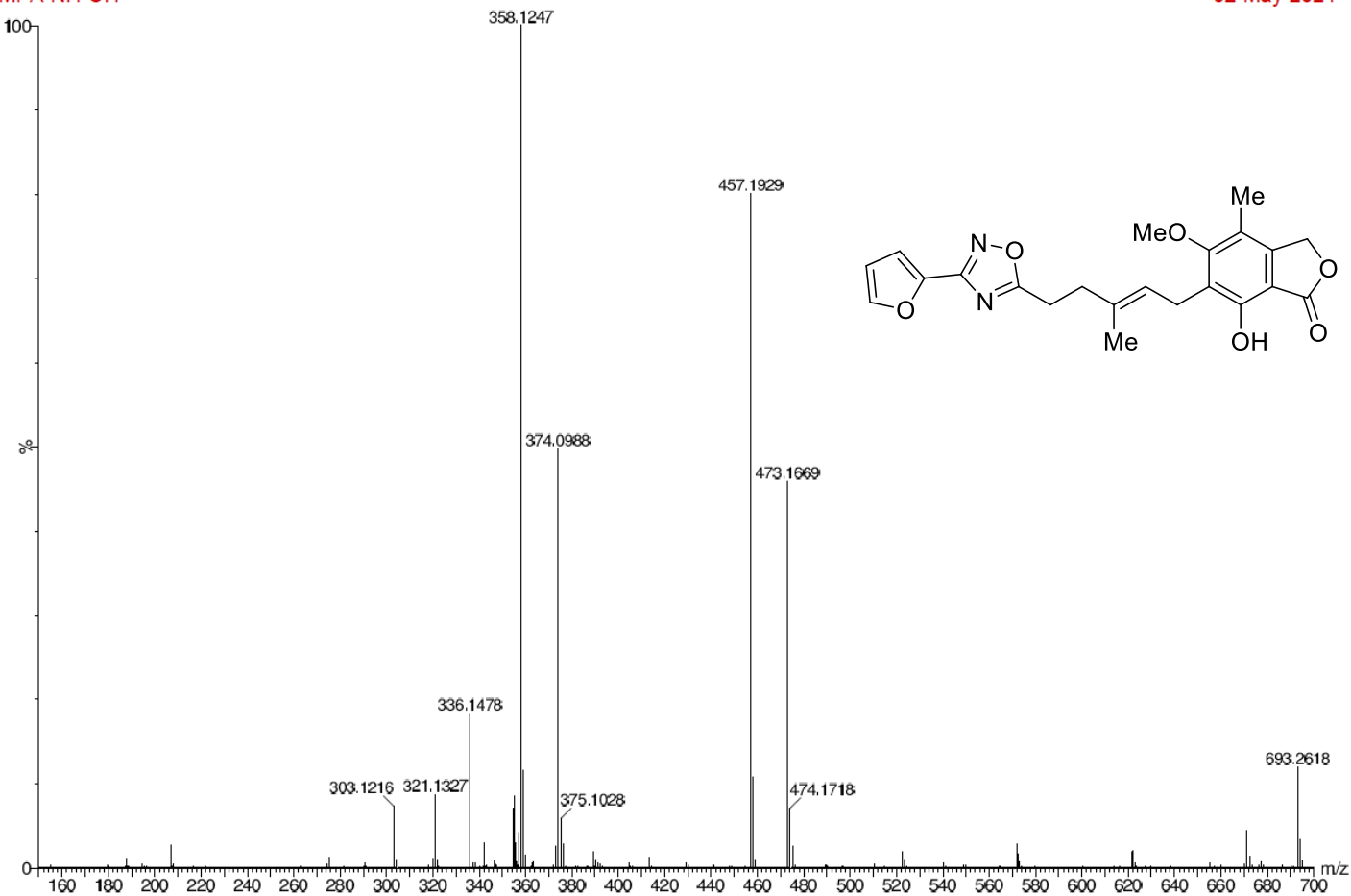


HR-MS: MPA-CONH-OH

59621
MPA-NH-OH

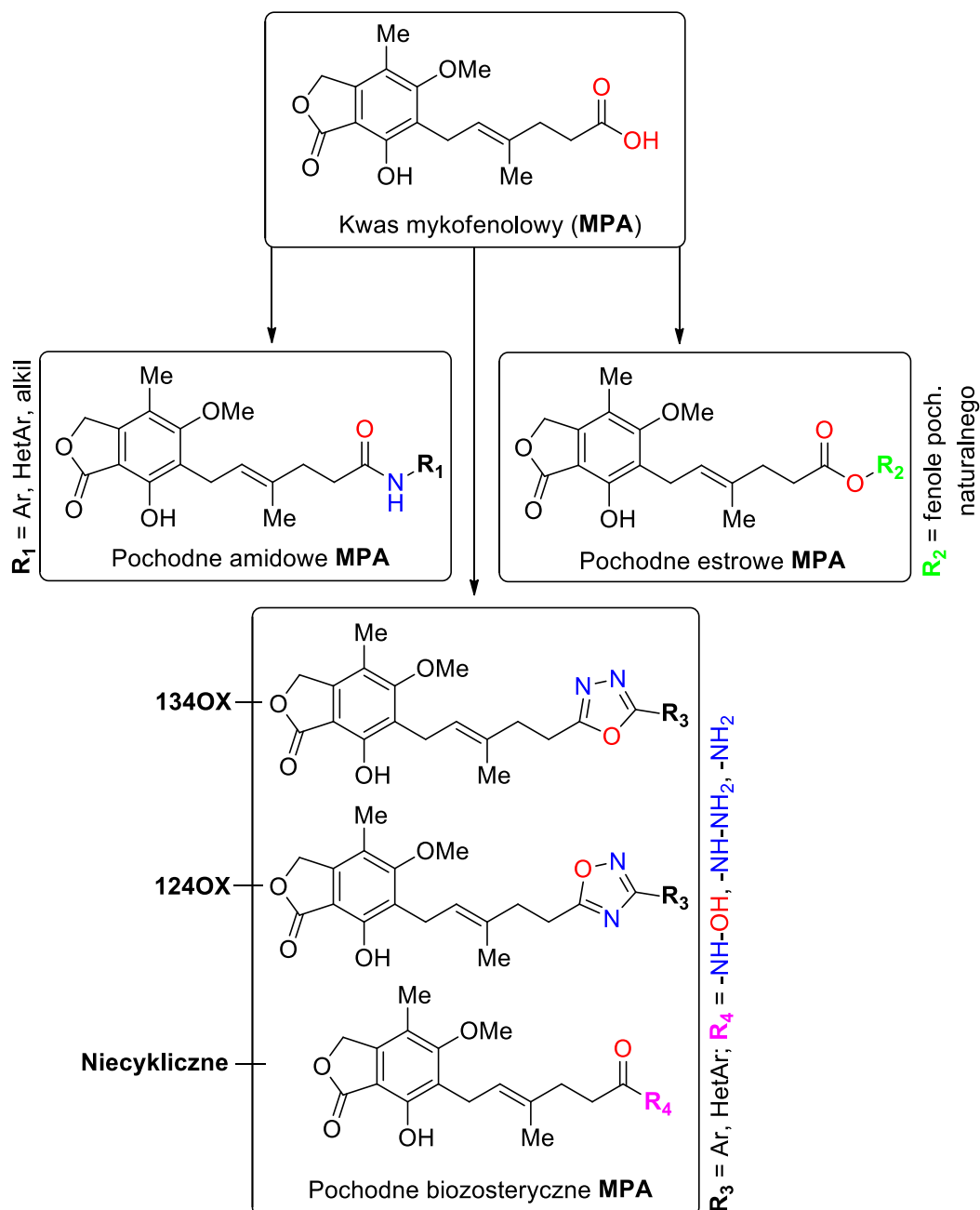
accurate mass

ES+
02-May-2024



Załącznik D. Cele badawcze

Na trakcie realizacji pracy doktorskiej pod opieką dr. hab. inż. Grzegorza Cholewińskiego, profesora Politechniki Gdańskiej, w Katedrze Chemii Organicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej, określonych zostało kilka zadań badawczych.



Rysunek 1ZD. Zestawienie omawianych w niniejszej pracy pochodnych **MPA**

1. Przeprowadzenie przeglądu literaturowego związanego z kwasem mykofenolowym, jego bioaktywnościami i wyszczególnieniem serii pochodnych, które dotychczas udało się otrzymać i zbadać ich aktywność biologiczną.

-
2. Przeprowadzenie przeglądu literaturowego związanego z naturalnie występującymi fenolami, podkreślającego ich pierwotnie przeciwutleniający charakter, a także wskazanie zbioru technik umożliwiających określanie charakteru antyoksydacyjnego cząsteczek.
 3. Przeprowadzenie przeglądu literaturowego na temat technik otrzymywania wybranych klas związków heteroaromatycznych oraz wyszczególnienie interesujących bioaktywności, które te związki wykazują.
 4. Przeprowadzenie przeglądu literatury na temat właściwości deacetylaz histonowych, z wyróżnieniem enzymu HDAC6, oraz wskazaniem właściwości typowych inhibitorów tej klasy enzymów.
 5. Dokonanie odpowiednich analiz oraz przygotowań w ramach poszczególnych klas pochodnych kwasu mykofenolowego (**Rysunek 1ZD**):
 - a. **Amidowe pochodne MPA** — przeprowadzenie analizy dokowania molekularnego dla planowanej serii pochodnych amidowych, zawierających w swej budowie fragment pochodzący od aminy aromatycznej, w stosunku do enzymu IMPDH2, a także synteza projektowanych związków z określeniem ich właściwości biologicznych w stosunku do komórek T-Jurkat i PBMC oraz wskazaniem mechanizmu działania na podstawie testu GMP.
 - b. **Estrowe pochodne MPA** — synteza nowej klasy estrowych pochodnych zawierających w swej budowie fragment pochodzący od naturalnie występujących fenoli, określenie właściwości przeciwutleniających z wykorzystaniem testu kolorymetrycznego DPPH, a także wykazanie właściwości biologicznych tych koniugatów wobec linii komórek T-Jurkat i PBMC, a także AsPC-1 (dla wybranych, najbardziej aktywnych przeciwutleniaczy). Dodatkowo, wskazanym jest zdefiniowanie jego mechanizmu działania na podstawie testu GMP.
 - c. **Bioizosteryczne pochodne MPA** — znalezienie nowego celu molekularnego dla nowej klasy pochodnych bioizosterycznych z wykorzystaniem techniki odwrotnego dokowania i późniejsza weryfikacja siły oddziaływania tej klasy ligandów z nakreślonym w tych badaniach enzymem HDAC6, a także enzymem IMPDH2 (odniesienie do pierwotnej aktywności), bazując na dokowaniu molekularnym. W kolejnym kroku zaplanowana została synteza projektowanych cząsteczek w oparciu o procedurę odwadniającą cyklizacji oraz prostych reakcji dehydratacji. Następnie, konieczne jest zweryfikowanie opracowań komputerowych związanych z nowym celem molekularnym przy pomocy testu enzymatycznego HDAC6. Ostatnim elementem analizy powinny być eksperymenty biologiczne pokrywające badania przesiewowe na szeregu linii komórek nowotworowych, a także weryfikacja bioaktywności na linii komórek T-Jurkat i PBMC, z wyznaczeniem mechanizmu działania testem GMP.

Ponadto, określone zostały hipotezy badawcze, ogólne dla wszystkich rodzajów pochodnych **MPA**. Zostały one zebrane poniżej.

- Możliwe jest otrzymanie nieskomplikowanych pochodnych **MPA** na drodze prostej, bezpośredniej transformacji, która nie wymaga ochrony wolnej grupy fenolowej, występującej w ramach rdzenia strukturalnego **MPA**.
- W ramach badań bioaktywności projektowanych związków, możliwe jest wskazanie co najmniej jednego w każdej serii pochodnych, który charakteryzuje się obniżoną cytotoksycznością wobec komórek PBMC i istotną aktywnością antyproliferacyjną wobec komórek T-Jurkat, osiągając tym samym lepsze parametry niż wejściowy **MPA**.
- Istnieje klasa cząsteczek, w ramach omawianych pochodnych, zdolnych do wykazywania innej aktywności biologicznej niż podstawowa właściwość immunosupresyjna **MPA**.

Dodatkowo, postawiony został szereg szczegółowych pytań roboczych dla poszczególnych klas pochodnych **MPA**. Mają one na celu doprowadzić do bardziej krytycznej analizy prezentowanego wątku.

Amidowe pochodne MPA

- Jakie interakcje molekularne między amidowymi pochodnymi **MPA** a wybranymi białkami docelowymi mogą odpowiadać za ich potencjalną aktywność biologiczną?
- Czy pochodne amidowe MPA wykazują selektywną aktywność cytotoksyczną wobec komórek T-Jurkat w porównaniu z PBMC w warunkach *in vitro*?

Estrowe pochodne MPA

- Dlaczego nie została przeprowadzona synteza estrowych pochodnych **MPA** z wykorzystaniem ochrony wolnej grupy fenolowej i późniejsza selektywna deprotekcja, bez jednoczesnego zachodzenia hydrolizy estru aryłowego?
- W jakim stopniu test enzymatyczny DPPH przekłada się na rzeczywiste właściwości przeciwutleniające cząsteczek?

Bioizosteryczne pochodne MPA

- Jakie strukturalne cechy pochodnych **MPA** korelują z ich zdolnością do inhibicji HDAC6 w testach enzymatycznych?
- Czy modyfikacje strukturalne w pochodnych **MPA** mogą prowadzić do selektywnego działania na linie komórkowe nowotworowe w porównaniu z PBMC?