



Dr inż. Grzegorz Cholewiński
Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej

Autoreferat

Załącznik nr 2 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

Gdańsk, 2018

I. Imię i nazwisko: Grzegorz Cholewiński

II. Stopnie naukowe i tytuły zawodowe:

2000 - magister inżynier technologii chemicznej, specjalność Technologia Organiczna, kierunek dyplomowania Lekka Synteza Organiczna, Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej (praca dyplomowa pt. „Otrzymywanie i reaktywność mieszanych bezwodników ditiofosforowo – karboksylowych”, obroniona w dniu 17.07.2000).

2006 - doktor nauk chemicznych w zakresie chemii, Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej (praca doktorska pt. „Otrzymywanie i reaktywność selenofosforanów acylu”, obroniona w dniu 30.11.2006).

Promotor: prof. dr hab. inż. Janusz Rachoń

III. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu:

01.10.2002 - 30.11.2006 Studia Doktoranckie, Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej.
01.01.2007 - 30.01.2007 Asystent, Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej.
01.02.2007 - 30.04.2008 Staż podoktorski na Uniwersytecie w Leuven (Belgia).
01.05.2008 - nadal Adiunkt, Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej.

IV. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

A. Cykl monotematycznych publikacji „ Synteza i właściwości antyproliferacyjne nowych pochodnych kwasu mykofenolowego jako potencjalnych leków immunosupresyjnych.”

B. Wykaz monotematycznych publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe zgłoszone jako podstawa do przewodu habilitacyjnego. Informacje o udziale własnym, kopie prac, oświadczenia współautorów o ich udziale, w publikacjach wieloautorowych umieszczone są w załącznikach 4-6.

[H1]. **G. Cholewiński**[✉], M. Małachowska, K. Dzierzbicka, „The chemistry of mycophenolic acid – synthesis and modifications towards desired biological activity”, *Curr. Med. Chem.*, **2010**, 17, 1926-1941.

Punktacja MNiSW₂₀₁₀ = 32, IF₍₂₀₁₀₎ = 4,630.

[H2]. M. Malachowska-Ugarte, **G. Cholewinski**[✉], J. Chojnacki, K. Dzierzbicka, „4-[(tert-Butyldimethylsilyloxy]-6-methoxy-7-methyl-5-(oxiran-2-ylmethyl)-2-benzofuran-3(1H)-one”, *Acta Crystallogr. E*, **2011**, 67, o3393.

Punktacja MNiSW: 13, IF₍₂₀₁₁₎ = 0,347.

[H3]. M. Małachowska – Ugarte, **G. Cholewiński**[✉], K. Dzierzbicka, P. Trzonkowski, „Synthesis and biological activity of novel mycophenolic acid conjugates containing nitro-acridine/acridone derivatives”, *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, 54, 197-201.

Punktacja MNiSW: 35, IF₍₂₀₁₂₎ = 3,499.

[H4]. D. Iwaszkiewicz-Grześ, **G. Cholewiński**[✉], A. Kot-Wasik, P. Trzonkowski P., K. Dzierzbicka, “Synthesis and biological activity of mycophenolic acid-amino acid derivatives”, *Eur. J. Med. Chem.*, **2013**, 69, 863-871.

Punktacja MNiSW: 40, IF₍₂₀₁₃₎ = 3,432.

[H4a]. **G. Cholewiński**, K. Dzierzbicka, D. Iwaszkiewicz-Grześ, P. Trzonkowski, „Nowe amidowe pochodne kwasu mykofenolowego, sposób otrzymywania amidowych pochodnych kwasu mykofenolowego i zastosowanie nowych amidowych pochodnych kwasu mykofenolowego do wytwarzania leku immunosupresyjnego zwłaszcza zmniejszającego ryzyko odrzucenia przeszczepów”, Patent PL 402374, **2015**.

[H5]. **G. Cholewiński**[✉], D. Iwaszkiewicz-Grześ, M. Prejs, A. Głowacka, K. Dzierzbicka. „Synthesis of the inosine 5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) Inhibitors”, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2015**, 30, 550-563.

Punktacja MNiSW: 20, IF₍₂₀₁₅₎ = 3,428.

[H6]. **G. Cholewiński**[✉], D. Iwaszkiewicz-Grześ, P. Trzonkowski, K. Dzierzbicka, “Synthesis and biological activity of ester derivatives of mycophenolic acid and acridines/acridones as potential immunosuppressive agents”, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2016**, 31, 974-982.

Punktacja MNiSW: 25, IF₍₂₀₁₆₎ = 4,293.

[H7]. M. Prejs, **G. Cholewiński**, A. Siebert, P. Trzonkowski, K. Dzierzbicka[✉], “New conjugates of mycophenolic acid and their antiproliferative activity”, *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **2016**, 18, 1057-1062.

Punktacja MNiSW: 20, IF₍₂₀₁₆₎ = 1,071.

[H8]. D. Iwaszkiewicz-Grzes, **G. Cholewinski**[✉], A. Kot-Wasik, P. Trzonkowski, K. Dzierzbicka, “Investigations on the immunosuppressive activity of derivatives of mycophenolic acid in immature dendritic cells”, *Int. Immunopharmacol.*, **2017**, 44, 137-142.

Punktacja MNiSW: 30, IF₍₂₀₁₇₎ = 3,118.

[H9]. A. Siebert, M. Prejs, **G. Cholewiński**[✉], K. Dzierzbicka, „New analogues of mycophenolic acid”, *Mini Rev. Med. Chem.*, **2017**, 17, 734 - 745.

Punktacja MNiSW: 30, IF₍₂₀₁₇₎ = 2,645.

[H10]. **G. Cholewinski**[✉], M. Malachowska–Ugarte, A. Siebert, M. Prejs, K. Dzierzbicka, „Modifications of total synthesis of mycophenolic acid”, *Curr. Chem. Lett.*, **2018**, 7, 9-16.

Punktacja MNiSW: 10, IF₍₂₀₁₇₎ = 0.

[H11]. M. Prejs, **G. Cholewiński**[✉], P. Trzonkowski, A. Kot-Wasik, K. Dzierzbicka, „Synthesis and antiproliferative activity of new mycophenolic acid conjugates with adenosine derivatives”, *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **2018**, zaakceptowane, doi:

10.1080/10286020.2018.1451521.

Punktacja MNiSW: 20, IF₍₂₀₁₇₎ = 1,091.

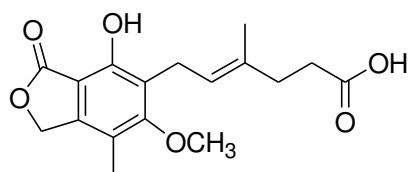
✉ - autor korespondencyjny

Punktacja MNiSW została przygotowana zgodnie z aktualnym ujednoliconym wykazem czasopism naukowych ogłoszonym dla roku publikacji. Dla najnowszych publikacji przyjęto najbardziej aktualne dostępne dane, czyli za rok 2016 (stan na dzień przygotowania wniosku). Wartości IF zostały przedstawione zgodnie z rokiem ukazania się publikacji. Dla publikacji opublikowanych w latach 2017, 2018 podano IF za rok 2017.

C. Omówienie celu naukowego prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

C.1 Omówienie i cel naukowy pracy

Kwas mykofenolowy (MPA) **1** (Rys. 1) jest niekompetycyjnym, odwracalnym inhibitorem dehydrogenazy inozyno-5'-monofosforanu (IMPDH) i ma zastosowanie w leczeniu immunosupresyjnym [1]. Obejmuje ono profilaktykę odrzucania przeszczepów allogenicznych narządów (serca, nerki, wątroby), a także terapii chorób autoimmunizacyjnych jak np. łuszczyca. MPA hamuje IMPDH poprzez blokowanie miejsca wiążącego dla kofaktora (NAD/H₂O), znajdującego się w bliskim sąsiedztwie miejsca aktywnego enzymu. Biosynteza limfocytów jest zależna od funkcjonowania tego szlaku, gdyż odpowiada on za syntezę puryn (szlak *de novo*), a co za tym idzie replikację DNA. Inne komórki wykorzystują w tym celu zarówno syntezę *de novo*, jak również syntezę z produktów degradacji puryn (tzw. szlak z odzysku). Wynika z tego, iż MPA hamuje selektywnie proliferację limfocytów B i T.



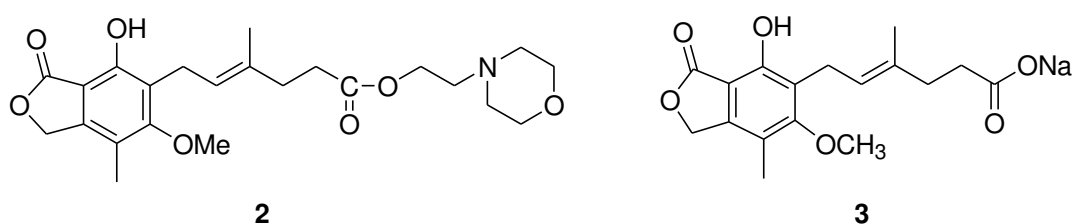
1

Rysunek 1. Struktura kwasu mykofenolowego **1**.

Enzym IMPDH istnieje w dwóch izoformach, posiadających identyczne rozmiary cząsteczek (514 reszt aminokwasowych, masa cząsteczkowa 56 kDa), a ich sekwencja aminokwasowa pokrywa się w 84 % [2]. Ekspresja typu I zachodzi zarówno w komórkach zdrowych, jak i nowotworowych, podczas gdy przeważający udział ekspresji typu II obserwuje się przede wszystkim w przypadku komórek nowotworowych. Obydwie izoformy IMPDH I oraz IMPDH II są celem dla leków immunosupresyjnych, a kwas mykofenolowy wykazuje nieco silniejszą inhibicję wobec izoformy drugiej. Podobnie jak sam MPA, liczne jego pochodne będące inhibitorami IMPDH *in vitro*, wykazują także właściwości przeciwnowotworowe. W tym miejscu należy podkreślić, że kwas mykofenolowy charakteryzuje się szerokim spektrum aktywności biologicznej, był on pierwszym antybiotykiem otrzymanym w 1893 roku w czystej, krystalicznej postaci. Pomimo tego odkrycia, aktywność przeciwbakteryjna MPA nie była systematycznie badana przez długi czas. Znane są także właściwości

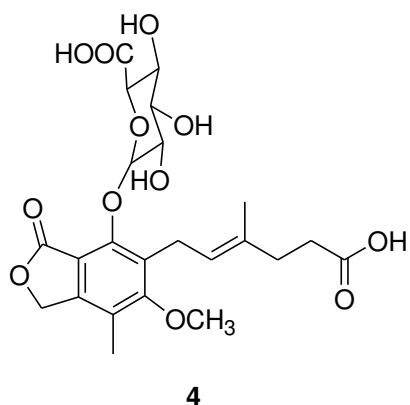
przeciwgrzybiczne i przeciwwirusowe tego związku. Obecnie kwas mykofenolowy stosowany jest klinicznie jako lek immunosupresyjny.

W 1995 roku ester morfolinowy kwasu mykofenolowego – mykofenolan mofetylu (MMF) **2** (Rys. 2) został zatwierdzony przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA), jako środek zmniejszający ryzyko odrzucenia przeszczepów narządów, takich jak: nerki, wątroba i serce. Obecnie lek ten jest sprzedawany również w Polsce (CellCept[®], Roche AG). Inną postacią leku jest sól sodowa kwasu mykofenolowego **3** (MPS, Myfortic[®], Novartis Farma AG). Obydwie formy stosuje się w połączeniu z innymi immunosupresantami, takimi jak cyklosporyna, czy takrolimus.



Rysunek 2. Pochodne MPA stosowane w leczeniu immunosupresyjnym.

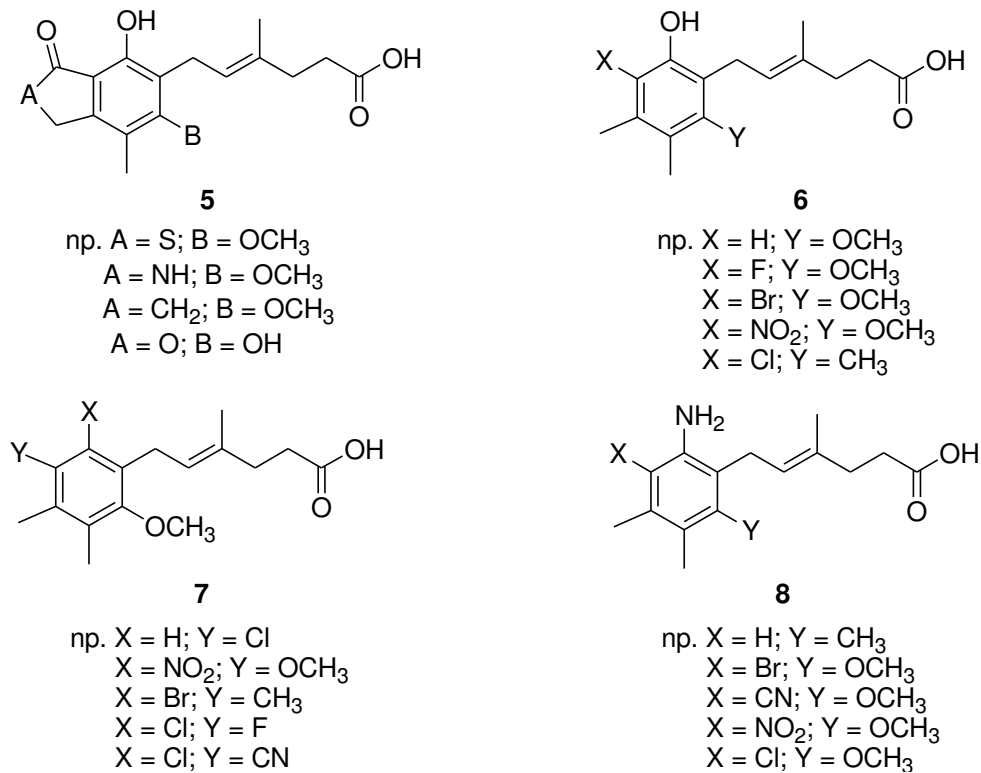
Transplantologia nabiera coraz większego znaczenia jako metoda terapii nieuleczalnych chorób. Pomimo postępów w leczeniu immunosupresyjnym wciąż nie udało się wyeliminować ryzyka odrzucenia przeszczepu. Ograniczeniem stosowanych proleków MPA **2, 3** jest przekształcanie MPA *in vivo* do nieaktywnego metabolitu, tj. glukuronidu fenolowego (phenolic glucuronide) - MPAG **4** (Rys. 3) wydalanego z moczem. Ponadto terapia immunosupresyjna wiąże się z niepożądanymi efektami ubocznymi takimi jak: nudności, biegunka, łysienie, zwiększenie podatności na infekcje oraz nowotwory.



Rysunek 3. Struktura glukuronidu fenolowego MPAG **4**.

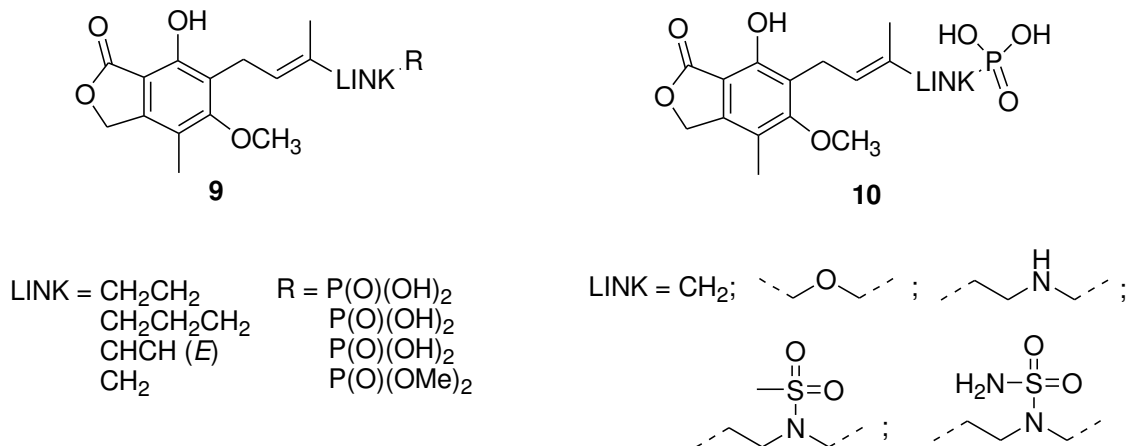
Powyższe ograniczenia wyraźnie zaznaczają problemy pojawiające się w trakcie leczenia MMF. Stąd uzasadnione jest poszukiwanie nowych analogów MPA, które w większym stopniu zmniejszyłyby ryzyko odrzutów przeszczepów narządów, przy stosowaniu mniejszej dawki i ograniczeniu toksyczności leku [H1].

W literaturze opisano m.in. analogi zawierające różne cykliczne ugrupowania **5**, monocykliczne fenole **6**, niefenolowe analogi **7** oraz monocykliczne aminy **8** (Rys. 4), a uzyskane wyniki inhibicji IMPDH były w znacznej mierze zbieżne badaniami *in silico* kompleksu aktywnego MPA z tym enzymem [3,4]. Wykazano, że dla zachowania aktywności biologicznej niezbędna jest grupa fenolowa (wiązania wodorowe z Thr 333, Gln 441 IMPDH) i aromatyczna grupa metylowa (oddziaływania Van der Waals'a z Arg 322 IMPDH). Zastąpienie aromatycznej grupy metoksylovej (sąsiedztwo z Arg 322, Asp 274 IMPDH) etylową lub winylową prowadzi do silniejszych inhibitorów IMPDH w porównaniu z MPA, a zastąpienie laktonowego pierścienia (wiązania wodorowe z Gly 326, Thr 333 IMPDH) innym cyklicznym fragmentem powoduje utratę aktywności. Ponadto konfiguracja *trans* wiązania podwójnego w łańcuchu bocznym jest istotna dla zachowania czynności biologicznej, gdyż pozwala na właściwe usytuowanie polarnej grupy karboksylowej i jej oddziaływanie z Ser 276 IMPDH.



Rysunek 4. Modyfikacje strukturalne MPA.

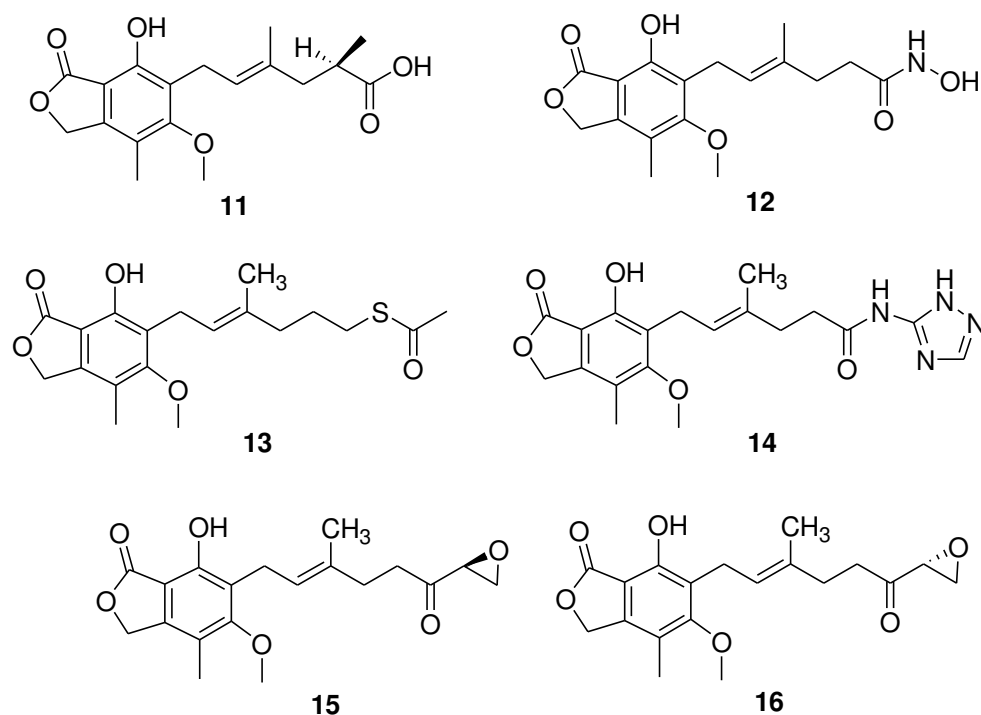
Wymiana grupy karboksylowej na inną, polarną mogącą oddziaływać poprzez wiązania wodorowe z Ser 276 IMPDH nie powoduje zaniku inhibicji. Na przykład pochodne zawierające grupę fosforanową **9**, **10** [5] wykazują porównywalną aktywność do MPA **1** (Rys. 5).



Rysunek 5. Fosforanowe analogi MPA.

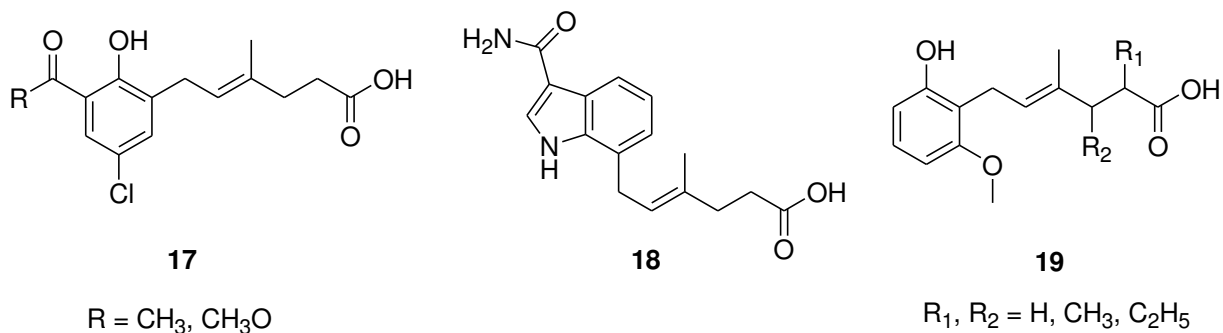
Inną modyfikację łańcucha bocznego stanowi kwas (*S*)- α -metylomykofenolowy **11** (Rys. 6) [6], który okazał się silniejszym immunosupresantem aniżeli MPA **1**. Nie opisano jednak wpływu konfiguracji na chiralnym atomie węgla na tą aktywność. Z kolei pochodna hydroksamowa (MAHA) **12** oprócz porównywalnych do MPA **1** właściwości immunosupresyjnych, jest również inhibitorem deacetylaz histonowych (HDECs), które to są jednym z celów molekularnych w opracowywaniu leków przeciwnowotworowych [7]. Biorąc pod uwagę fakt, iż deacetylazy histonowe są enzymami zależnymi od jonów cynku, zaprojektowano analogi MAHA **12** zawierające, zgodnie z teorią twardych i miękkich kwasów zasad Pearsona, grupy funkcyjne bardziej polaryzowalne. Uzyskane wyniki aktywności antyproliferacyjnej *in vitro* wobec komórek ludzkiej białaczki K562 nie potwierdziły jednak silniejszego działania przeciwnowotworowego pochodnej tioestrowej **13** wobec MAHA **12**, czy MPA **1**. W tej grupie związków jedynie *N*-(2,3,5-triazoilo)amid kwasu mykofenolowego **14** wykazał silniejszą aktywność przeciwnowotworową aniżeli **12**, a porównywalną do MPA **1**. Podobne działanie antyproliferacyjne obserwowano w przypadku enancjomerycznych epoksydów **15** i **16**, przy czym analogi te posiadały nieznacznie większą niż MPA **1** selektywność wobec izoformy II IMPDH [8]. Uzyskane wyniki sugerują, że pomimo obecności ligandów odznaczających się silnym powinowactwem do jonów cynku, inhibicja IMPDH pozostaje istotnym mechanizmem aktywności przeciwnowotworowej tych pochodnych MPA [H5]. Ostatnio opisano także amidowe pochodne MPA, które oprócz

inhibicji IMPDH II wykazywały znaczącą cytotoksyczność wobec komórek nowotworowych [9]. Spośród badanych analogów, pochodne *N*-benzylowe amidów kwasu mykofenolowego były aktywne wobec komórek raka piersi (MDA-MB-231), prostaty (DU-145), czy mózgu (U87MG).



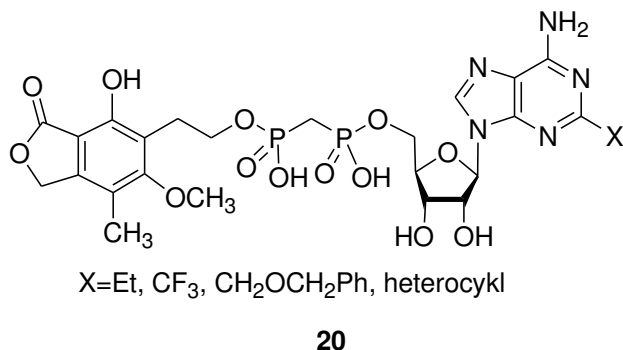
Rysunek 6. Modyfikacje struktury MPA w łańcuchu bocznym.

Kwas mykofenolowy **1** był testowany klinicznie na różne typy nowotworów jednak bez znaczących sukcesów. Główną przyczyną niepowodzeń było tworzenie się koniugatów z kwasem glukuronowym co utrudniało utrzymanie odpowiedniego stężenia leku dla wykazania aktywności przeciwnowotworowej. Dlatego też zsyntezowano monocykliczne analogi **17** (Rys. 7), pochodną indolową **18**, która została wyselekcjonowana do badań przeciw nowotworowi prostaty [10], podczas gdy monocykliczne analogi **19** [11] nie wykazywały znaczącej aktywności przeciwnowotworowej.



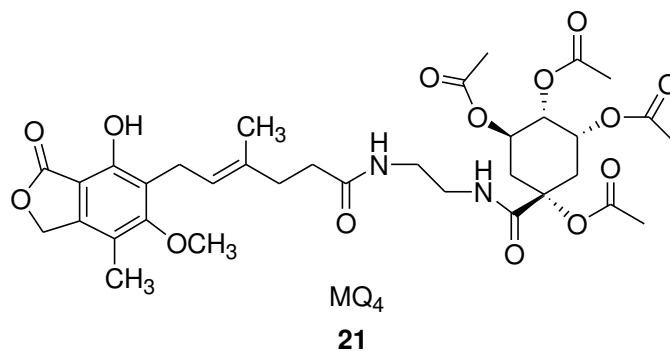
Rysunek 7. Pochodne MPA badane przeciwnowotworowo.

Opisano również pochodne mykofenolowo-adenino bis(fosfonowe) (MAD) **20** (Rys. 8), które okazały się interesujące jako potencjalne substancje przeciw ludzkiej białaczce [12,13]. Związki te projektowano jako analogi dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NAD), także wiążącego się z IMPDH. Koniugaty typu **20** wykazywały silną inhibicję IMPDH, aktywność przeciwnowotworową, a także odporność na hydrolizę oraz glukuronidację *in vivo*. Biorąc pod uwagę fakt, że podwyższoną ekspresję IMPDH obserwowano w przypadku m.in. przewlekłej białaczki szpikowej, enzym ten jest także jednym z celów molekularnych dla leków przeciwnowotworowych.



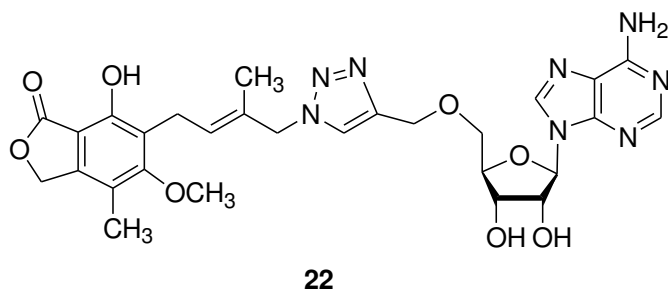
Rysunek 8. Pochodne mykofenolowo-adenino bis(fosfonowe) (MAD).

Projektowanie koniugatów kwasu mykofenolowego ze związkami biologicznie aktywnymi o innym mechanizmie działania może dostarczyć pochodnych o silniejszym, bądź bardziej selektywnym, zoptymalizowanym działaniu [H9]. Na przykład modyfikacja MPA na drodze przyłączenia kwasu chinowego poprzez łącznik diaminoetylowy pozwoliła otrzymać koniugat **21** (Rys. 9) wykazujący działanie immunosupresyjne w trakcie badań nad przeszczepem ludzkich komórek trzustki, przy jednocześnie niższej toksyczności [14].



Rysunek 9. Struktura koniugatu MPA i kwasu chinowego.

Z kolei koniugat MPA i adenozyiny zawierający jako łącznik pochodną triazolu **22** (Rys. 10) okazał się inhibitorem nie tylko ludzkiego enzymu IMPDH, ale również prątka gruźlicy co stanowi o potencjalnych właściwościach przeciwbakteryjnych [15].



Rysunek 10. Struktura triazolowej pochodnej MPA.

Na podstawie danych literaturowych można stwierdzić, iż modyfikacje struktury MPA polegające na wprowadzaniu polarnych grup funkcyjnych na końcu łańcucha bocznego nie powodują utraty aktywności wobec IMPDH i są obiecujące. Ponadto projektowanie koniugatów MPA zawierających fragmenty innych biologicznie czynnych związków może dostarczyć nowych pochodnych o interesujących właściwościach leczniczych [H5, H9].

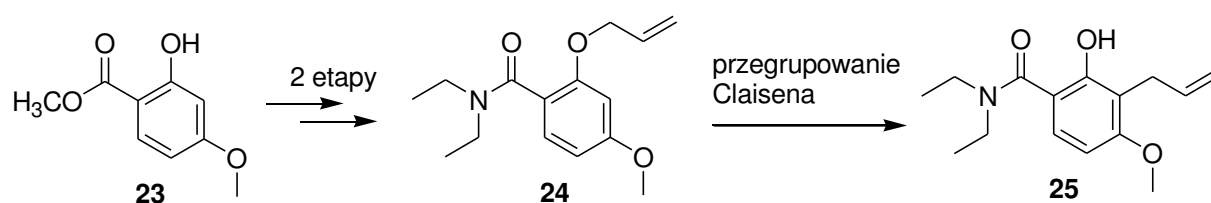
C.2 Omówienie uzyskanych wyników

Podsumowanie najważniejszych osiągnięć związanych z zaprezentowanym cyklem publikacji

C.2.1 Synteza kwasu mykofenolowego

Głównym nurtem mojej pracy badawczej było otrzymanie i zbadanie nowych pochodnych kwasu mykofenolowego. Syntezę tych związków postanowiłem przeprowadzić poprzez

modyfikacje grupy karboksylowej MPA. Pomimo faktu, iż kwas mykofenolowy produkowany jest w skali przemysłowej na drodze fermentacyjnej [16], jego cena w momencie podjęcia przeze mnie tego zagadnienia była wysoka. W literaturze chemicznej opisano kilka metod syntezy tego związku z handlowo dostępnych substratów. Z uwagi na fakt, iż MPA **1** jest ftalidem zawierającym w swojej strukturze sześciopodstawiony pierścień benzenu, a wiązanie podwójne w łańcuchu bocznym posiada ściśle określoną geometrię *trans*, synteza totalna tego związku jest procesem wieloetapowym. Biorąc pod uwagę ilość etapów i dostępność substratów wybrałem metodę opisaną przez Pattersona [17], w której substratem wyjściowym jest 2-hydrokso-4-metoksybenzoesan metylu **23** (Schemat 1). W procedurze oryginalnej *N,N*-dietylo-4-metoksy-2-(prop-2-enyloksy)benzamid **24** ulega przegrupowaniu Claisena w tetrametylobenzenie jako rozpuszczalniku do *N,N*-dietylo-2-hydrokso-4-metoksy-3-(prop-2-enylo)benzamid **25** w temperaturze 210 °C z wydajnością 86 %, przy czasie reakcji 6 godzin.

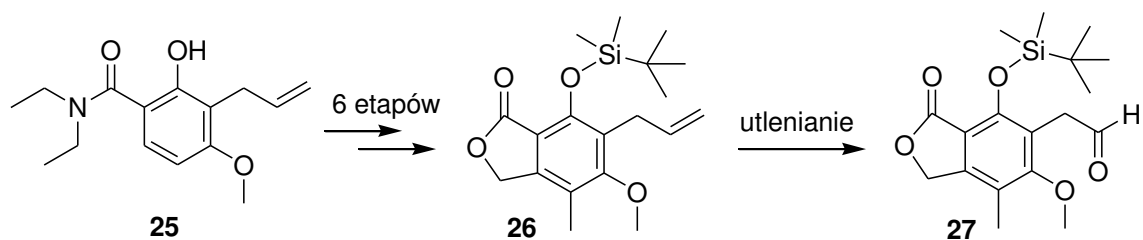


Schemat 1. Synteza *N,N*-dietylo-2-hydrokso-4-metoksy-3-(prop-2-enylo)benzamid **25** z 2-hydrokso-4-metoksybenzoesan metylu **23**.

Warto nadmienić, iż 1,2,3,4-tetrametylobenzen wrze w temperaturze 205 °C, podczas gdy temperatura wrzenia znacznie bardziej dostępnego 1,2,4,5-tetrametylobenzenu wynosi 197 °C. Przeprowadzenie reakcji w użyciu lotniejszego izomeru tetrametylobenzenu jako rozpuszczalnika pozwoliło uzyskać związek **25** z wydajnością jedynie 15 %. Tak niska wydajność w syntezie wieloetapowej kwasu mykofenolowego, który dodatkowo ma zostać użyty do opracowania syntezy nowych jego pochodnych, wydawała się szczególnie niekorzystna. Stąd podjąłem próbę optymalizacji tego etapu w oparciu o dobór rozpuszczalnika możliwie najbardziej zbliżonych właściwościach fizykochemicznych do 1,2,3,4-tetrametylobenzenu [H10]. Najlepsze wyniki udało się uzyskać w przypadku tetraliny (temperatura wrzenia 206 - 208 °C), gdzie wydajność produktu wynosiła 73 % po 2 godzinach prowadzenia reakcji.

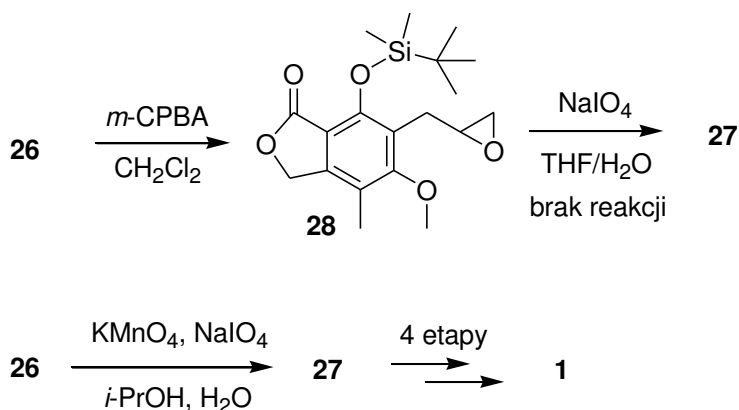
W kolejnym etapie prac amid **25** posłużył do otrzymania 1,3-dihydro-4-[(*tert*-butylo-dimetylosililo)-oksy]-6-metoksy-7-metylo-3-okso-5-(prop-2-enylo)izobenzofuranu **26**

(Schemat 2). W procedurze opisanej przez Pattersona alken **26** poddawano ozonolizii do aldehydu **27**. Biorąc pod uwagę fakt, iż ozonoliza wymaga specjalnej aparatury, w swoim projekcie postanowiłem zastosować inne warunki dla tego etapu.



Schemat 2. Synteza [4-(*tert*-butyldimetylosililo)-oksy]-6-metoksy-7-metylo-3-okso-1,3-dihydrobenzofuran-5-ylo]acetaldehydu **27** z *N,N*-dietylo-2-hydroksy-4-metoksy-3-(prop-2-enylo)benzamidu **25**.

Opierając się na danych literaturowych podjąłem próbę utlenienia alkenu **26** do aldehydu **27** poprzez 1,3-dihydro-4-[(*tert*-butyldimetylosililo)-oksy]-6-metoksy-7-metylo-3-okso-5-(prop-2,3-epoksy)izobenzofuran **28** (Schemat 3). Utlenienie związku **26** za pomocą nadkwasu *meta*-chlorobenzoesowego prowadziło do epoksydu **28** [H2, H10], który okazał się na tyle trwałym związkiem, że próby jego dalszego utlenienia do oczekiwanego produktu **27** za pomocą NaIO_4 nie powiodły się. Pomimo faktu, iż analogiczne przekształcenia pierścienia epoksydowego są znane, to w przypadku **28** zatłoczenie steryczne powodowane przez grupę *tert*-butyldimetylosililową mogło uniemożliwiać reakcję z rozbudowanym przestrzennie nadjordanem.



Schemat 3. Optymalizacja syntezy [4-(*tert*-butyldimetylosililo)-oksy]-6-metoksy-7-metylo-3-okso-1,3-dihydrobenzofuran-5-ylo]acetaldehydu **27** w celu otrzymania kwasu mykofenolowego **1**.

Z kolei bezpośrednio utlenienie związku **26** do aldehydu **27** za pomocą mieszaniny KMnO_4 i NaIO_4 pozwoliło uzyskać oczekiwany produkt **27** z wydajnością 73 %. Następnie aldehyd **27** wykorzystano do otrzymania kwasu 6-(4-hydroksy-6-metoksy-7-metylo-3-okso-1,3-dihydroizobenzofuranilo)-4-metyloheks-4-enowego (MPA) **1**.

C.2.2 Nowe pochodne kwasu mykofenolowego

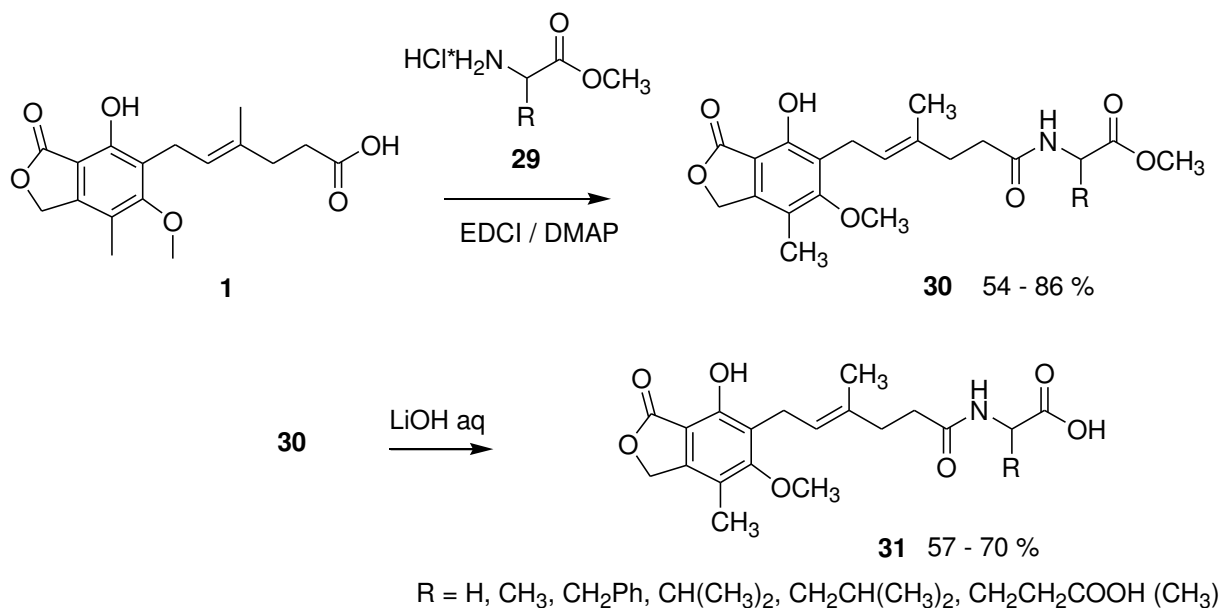
Posiadając kwas mykofenolowy (MPA) przystąpiłem do syntezy nowych jego pochodnych celem zbadania ich właściwości antyproliferacyjnych. Istotne znaczenie w realizacji tego zagadnienia miało otrzymanie przeze mnie finansowania z Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (Program Lider, II edycja), co pozwoliło zakupić potrzebne ilości MPA jako substratu. Badania aktywności biologicznej *in vitro* zostały przeprowadzone we współpracy z Zakładem Immunologii i Transplantologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

C.2.2.1 Pochodne aminokwasowe MPA

W pierwszej kolejności skupiłem się na aminokwasowych pochodnych MPA **30**, **31** (Schemat 4), które to na końcu łańcucha bocznego zawierają polarną grupę amidową, a także grupę karboksylową przyłączonego aminokwasu. Na podstawie danych literaturowych [1,2,4], taka modyfikacja cząsteczki MPA mogła dostarczyć silnych inhibitorów IMPDH. Ponadto reakcje acylowania aminokwasów należą do szeroko opisanych i względnie prostych procedur syntetycznych, co w razie stwierdzenia obiecującej aktywności biologicznej ma istotne znaczenie praktyczne.

W literaturze chemicznej opisano *N*-mykofenoioglicynę oraz *N*-mykofenoiloalaninę jako potencjalne związki przeciwnowotworowe [18]. Były one produktami przemian mikrobiologicznych MPA lub reakcji kondensacji MPA z estrami aminokwasów za pomocą *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimidu (DCC) oraz następczej hydrolizy. W swoim projekcie postanowiłem zoptymalizować procedurę *N*-acylowania aminokwasów za pomocą MPA w celu otrzymania serii aminokwasowych analogów MPA, a następnie zbadania wpływu konfiguracji oraz podstawnika w części aminokwasowej na aktywność antyproliferacyjną. Kwas mykofenolowy **1** poddawany był reakcji z chlorowodorkami estrów metylowych odpowiednich aminokwasów **29** (formy D lub L z wyjątkiem R = H) w obecności 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu (EDCI) jako odczynnika kondensującego i 4-

dimetyloaminopirydyny (DMAP) jako zasady. Następnie tak uzyskane estry **30** poddano hydrolizie zasadowej do kwasów karboksylowych **31** (Schemat 4) [H4, H4a].



Schemat 4. Synteza aminokwasowych pochodnych MPA.

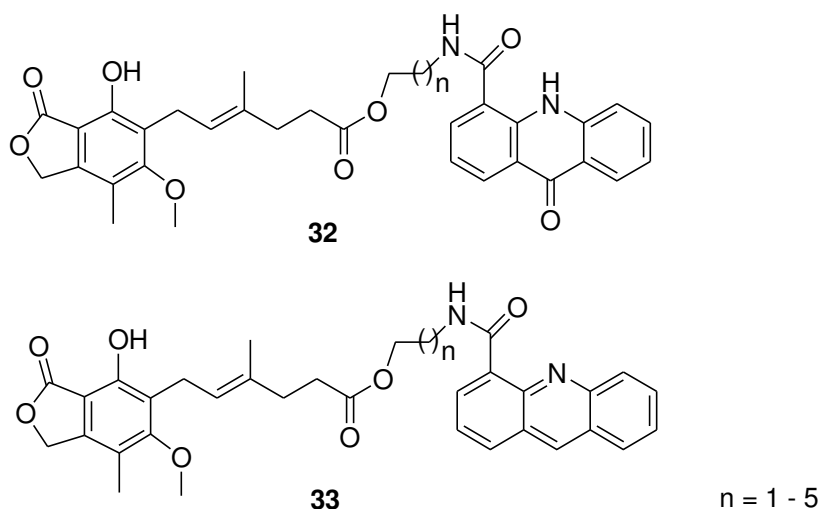
Analogi **30**, **31** poddano badaniu aktywności antyproliferacyjnej wobec komórek ludzkiej białaczki Jurkat oraz mononuklearnych komórek krwi obwodowej (PBMC) od zdrowych dawców jako modelu aktywności immunosupresyjnej. Przeprowadzono test żywotności wobec bromku 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazoliowego MTT, gdzie wynikiem było maksymalne stężenie danego związku powodujące apoptozę połowy komórek IC_{50} (50% *inhibitory concentration*). Parametr ten jest miarą toksyczności badanych pochodnych. Im wyższa wartość IC_{50} , tym wyższe stężenia danej substancji, jakie można byłoby stosować w leczeniu. Z kolei aktywność antyproliferacyjną badano w teście inkorporacji znakowanej trytem tymidyny $^3\text{H-TdR}$ uzyskując stężenie efektywne danego analogu powodujące zahamowanie proliferacji komórek w 50% (EC_{50}). Im niższa wartość EC_{50} (50% *effect concentration*), tym substancja aktywniejsza i niższe stężenie powodowałoby efekt leczniczy. Analizę statystyczną uzyskanych danych przeprowadzono w programach *Sigma Plot* oraz *Statistica 10.0*. Następnie obydwa parametry IC_{50} i EC_{50} wykorzystano do wyznaczenia współczynnika selektywności $SI = IC_{50} / EC_{50}$, który porównuje potencjalne właściwości terapeutyczne nowych pochodnych MPA z uwzględnieniem ich toksyczności.

W większości przypadków hydroliza estru metylowego do wolnej grupy karboksylowej zwiększała aktywność. Odstępstwem od tej reguły był ester metylowy *N*-mykofenoilofenyloalaniny ($R = \text{CH}_2\text{Ph}$, $EC_{50} = 6,66 \mu\text{M}$ wobec Jurkat, $EC_{50} = 0,0042 \mu\text{M}$

wobec PBMC), który wykazał silniejszą aktywność aniżeli *N*-mykofenoilofenyloalanina ($EC_{50} = 19,49 \mu\text{M}$ wobec Jurkat, $EC_{50} = 0,016 \mu\text{M}$ wobec PBMC) co sugeruje, iż zmniejszenie polarności także może korzystnie wpływać na efektywność działania, prawdopodobnie na skutek polepszenia zdolności przenikania przez ścianę komórkową. Spośród pochodnych **31** wyróżniającą aktywność wykazała *N*-mykofenoiloizoleucyna ($R = \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $IC_{50} = 8,78 \mu\text{M}$, $EC_{50} = 6,01$, $SI = 1,5$ wobec Jurkat, $IC_{50} = 27,95 \mu\text{M}$, $EC_{50} = 0,0039 \mu\text{M}$, $SI = 7166,7$ wobec PBMC), dla której uzyskano porównywalne do MPA **1** wartości współczynnika selektywności zarówno wobec linii komórkowej Jurkat, jak i PBMC ($IC_{50} = 28,21 \mu\text{M}$, $EC_{50} = 9,45$, $SI = 2,99$ wobec Jurkat, $IC_{50} = 0,044 \mu\text{M}$, $EC_{50} = 0,00006 \mu\text{M}$, $SI = 7333$ wobec PBMC). Szczególnie dobre wyniki otrzymano dla kwasu *N*-mykofenoilo-D-glutaminowego ($R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, $IC_{50} = 21,18 \mu\text{M}$, $EC_{50} = 0,45$, $SI = 47,1$ wobec Jurkat, $IC_{50} = 115,5 \mu\text{M}$, $EC_{50} = 0,0033 \mu\text{M}$, $SI = 33787,3$ wobec PBMC), gdzie wartości obydwu współczynników SI były wyraźne lepsze niż dla MPA **1**. Obecność dwóch grup karboksylowych w części aminokwasowej znacząco poprawiła aktywność. Z kolei konfiguracja D prawdopodobnie zwiększyła odporność cząsteczki na działanie enzymów proteolitycznych [H4, H4a].

C2.2.2 Koniugaty MPA z akrydonami i akrydynami

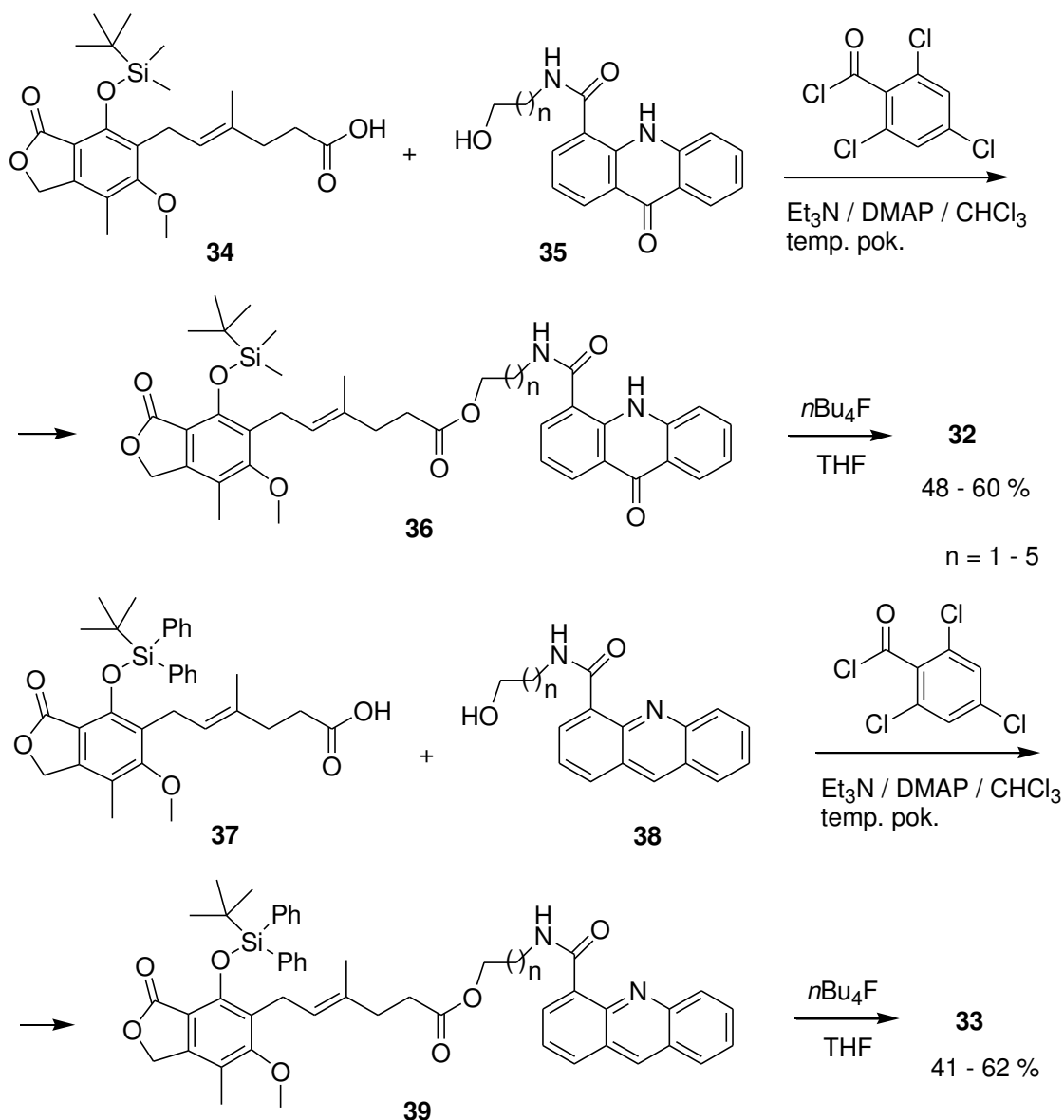
Akrydony i akrydyny należą do związków wykazujących interesujące aktywności biologiczne, a w tym przeciwnowotworową, przeciwwirusową, antybakteryjną, a także immunosupresyjną [V8]. Biorąc to pod uwagę, zaprojektowałem estrowe koniugaty kwasu mykofenolowego i akrydonów **32**, bądź akrydyn **33** (Rys. 11) celem zbadania ich aktywności antyproliferacyjnej oraz porównania z wyjściowym MPA **1** [H6].



Rysunek 11. Estrowe koniugaty MPA z pochodnymi akrydonu / akrydyn.

Synteza koniugatów typu **32** i **33** wymagała opracowania warunków estryfikacji z udziałem pochodnych kwasu mykofenolowego **34**, **37** z *N*-(ω -hydroksyalkilo) amidami kwasu 9-akrydono-4-karboksylowego **35** oraz *N*-(ω -hydroksyalkilo) amidów kwasu 4-akrydynokarboksylowego **38** (Schemat 5). Ochrona grup fenolowych była niezbędna dla selektywnej estryfikacji grupy karboksylowej MPA. Najlepsze wydajności estrów **36** i **39** uzyskałem z wykorzystaniem reakcji Yamaguchi. W metodzie tej kwas karboksylowy przekształca się w odpowiedni mieszany bezwodnik standardowo za pomocą chlorku 2,4,6-trichlorobenzoiłu, po czym generowany bezwodnik ulega podstawieniu nukleofilowemu na acylowym atomie węgla w reakcji z alkoholem [19].

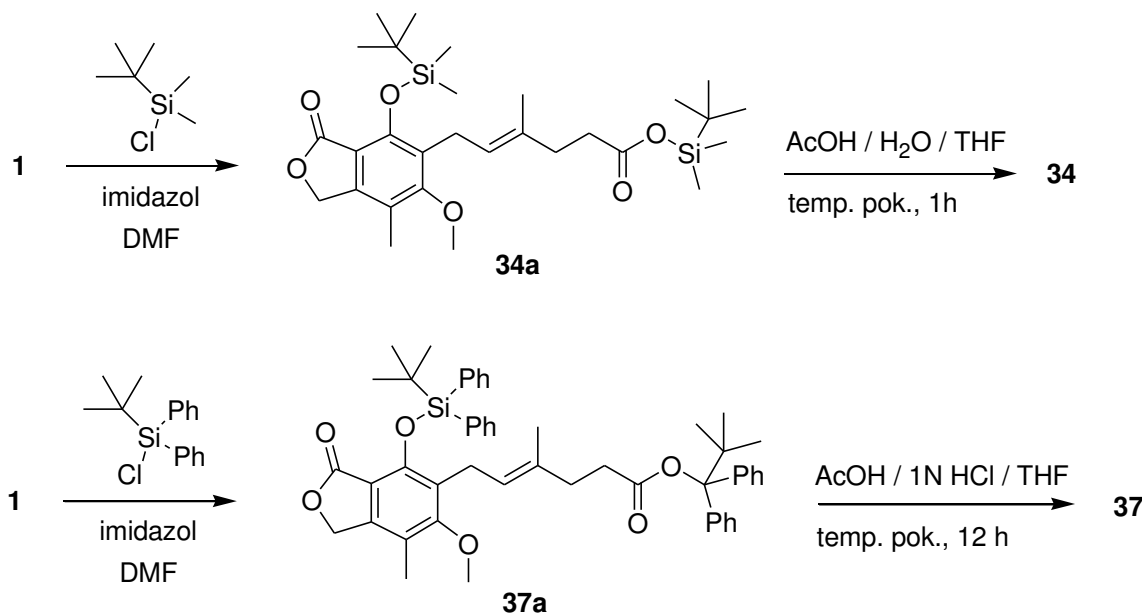
Skuteczność tej metody potwierdzają doniesienia literaturowe [20], także w przypadku estryfikacji z udziałem związków wielofunkcyjnych, gdzie inne testowane metody dawały gorsze rezultaty bądź nie działały w ogóle [21].



Schemat 5. Synteza koniugatów MPA z akrydonem **32** i akrydyną **33**.

Na uwagę zasługuje fakt, iż synteza akrydonów **36** zachodziła z powodzeniem przy użyciu eteru *t*-butylodimetylosililowego **34**, podczas gdy reakcja z pochodnymi akrydyn **38** wymagała zastosowania pochodnej MPA jako eteru *t*-butylodifenylosililowego **37**. Innymi słowy, estryfikacja alkoholowymi pochodnymi akrydyn **38** wymagała sililowej grupy ochronnej z większymi podstawnikami na atomie krzemu. W przeciwnym razie podczas estryfikacji zachodziła niepożądana deprotekcja grupy fenolowej, co prowadziło do reakcji ubocznych i złożonej mieszaniny produktów. Zwiększenie zawady sterycznej na atomie krzemu w **37** poprawiło stabilność sililowej grupy ochronnej wobec pochodnych akrydyn **38** i umożliwiło syntezę koniugatów **33**.

Przygotowanie kwasu mykofenolowego z odpowiednio chronioną grupą fenolową **34**, **37** obejmowało 2 etapy (Schemat 6). I tak, kwas mykofenolowy **1** poddawałem silylowaniu z nadmiarem chlorku *tert*-butylodimetylosililu lub *tert*-butylodifenylosililu w obecności imidazolu. Następnie biorąc pod uwagę fakt, iż estry silylowe są bardziej labilne aniżeli etery silylowe, estry **34a** oraz **37a** poddałem selektywnej hydrolizie do eterów, odpowiednio **34** i **37** [H6].



Schemat 6. Otrzymywanie kwasu mykofenolowego z osłoniętą grupą fenolową **34**, **37**.

Następnie wykonano testy żywotności oraz hamowania proliferacji dla związków **32** i **33**. Dodatkowo biorąc pod uwagę, iż akrydyny i akrydony charakteryzują się znaczącą i szeroką aktywnością biologiczną, badania wykonano także dla samych komponentów **35** i **38** celem sprawdzenia istotności wiązania kowalencyjnego pomiędzy MPA, a pochodną heterocykliczną.

Koniugaty akrydonowe **32** posiadały wyższe wartości IC_{50} (0,513 – 3,989 μM) aniżeli koniugaty akrydynowe **33** (0,513 – 3,989 μM) czy MPA **1** (0,097 μM) oraz niższe od odpowiednich komponentów **35** (2,158 – 15,586 μM) wobec Jurkat z wyjątkiem łącznika $n = 4$. Z kolei pomiary z udziałem PBMC sugerowały wyższą toksyczość wszystkich koniugatów **32** (3,934 – 16,71 μM) oraz **33** (1,601 – 17,59 μM) w porównaniu z MPA **1** (31,22 μM), a także w większości przypadków z odpowiednimi komponentami **35**, **38** (3,09 – 35,42 μM). Wśród koniugatów akrydonowych **32** wyraźnie najwyższą toksyczość wykazał analog zawierający najkrótszy linker metylenowy $n = 1$.

Koniugaty akrydonowe **32** (EC_{50} w zakresie 0,274 – 0,855 μM) były mniej aktywne niż MPA **1** (0,072 μM) i analogi akrydynowe **33** (0,009 – 0,024 μM) oraz aktywniejsze od swoich wyjściowych substratów **35** (21,254 – 33,750 μM) w teście hamowania proliferacji wobec Jurkat. Jak widać z przytoczonych wyników, pochodne akrydynowe **33** okazały się być aktywniejsze od MPA **1**. Ponadto koniugaty obydwu grup **32** (EC_{50} w zakresie 0,0016 – 0,0017 μM) oraz **33** (0,0016 – 0,003 μM) wykazywały wyższą aktywność od MPA **1** (0,043 μM) oraz swoich komponentów odpowiednio **35** (1,233 – 6,376 μM), **38** (0,310 – 1,13 μM) podczas eksperymentów z PBMC.

Biorąc pod uwagę fakt, że nie można wykluczać hydrolizy wiązań estrowych podczas badania aktywności koniugatów **32** oraz **33**, postanowiono zbadać nieco dokładniej wpływ połączenia kowalencyjnego pomiędzy MPA **1**, a odpowiednim komponentem akrydynowym/akrydynowym **35** i **38**. W tym celu zbadano inhibicję proliferacji komórek Jurkat powodowaną przez równomolową mieszaninę MPA **1** wraz z odpowiednim substratem **35**, **38**, a następnie porównano z wartościami EC_{50} otrzymanymi dla koniugatów o danej wartości n . Z uzyskanych danych wynikało, że tylko analog **32** dla $n = 1$ ($EC_{50} = 0,855 \mu\text{M}$) posiadał wyższą wartość EC_{50} aniżeli mieszanina MPA **1** z *N*-(ω -hydroksyalkilo)amidem kwasu 9-akrydono-4-karboksylowego **35**, $n = 1$ ($EC_{50} = 0,333 \mu\text{M}$). W pozostałych przypadkach koniugat **32**, **33** był bardziej aktywny (EC_{50} w zakresie 0,009 – 0,357 μM) aniżeli mieszanina MPA **1** z komponentem **35**, **36** (EC_{50} w zakresie 0,634 – 2,676 μM), co sugeruje, że w mechanizm działania zaangażowana jest cała jego cząsteczka.

Następnie policzono współczynniki selektywności SI dla estrowych pochodnych **32**, **33** (SI w zakresie 1 – 93 wobec Jurkat, 1611 – 10000 wobec PBMC), otrzymane wartości SI są porównywalne lub wyższe niż w przypadku MPA **1** (SI = 1 wobec Jurkat, 730 wobec PBMC) [H6].

Reasumując, obserwowano wpływ długości linkera na aktywność biologiczną, jednak trudno zauważyć jednoznaczną korelację pomiędzy tymi parametrami. Z pewnością bardzo istotny jest rodzaj przyłączonego heterocykla, gdyż akrydynowe koniugaty **33** wykazywały znacznie wyższą aktywność aniżeli analogi akrydonowe **32**.

Ponadto bazując na doniesieniach literaturowych badano, czy mechanizm działania nowych pochodnych MPA **30** – **33** wiąże się z inhibicją IMPDH. Przeprowadzony test polega na dodaniu do hodowli komórek guanozyny lub guanozyno-5'-monofosforanu (GMP), które to promują proliferację komórek wykorzystując tzw. szlak z odzysku biosyntezy puryn i mimo obecności inhibitorów IMPDH blokujących biosyntezę puryn *de novo*, obniżają powodowaną przez nie apoptozę [22]. Analogiczne eksperymenty przeprowadzone z udziałem nowych

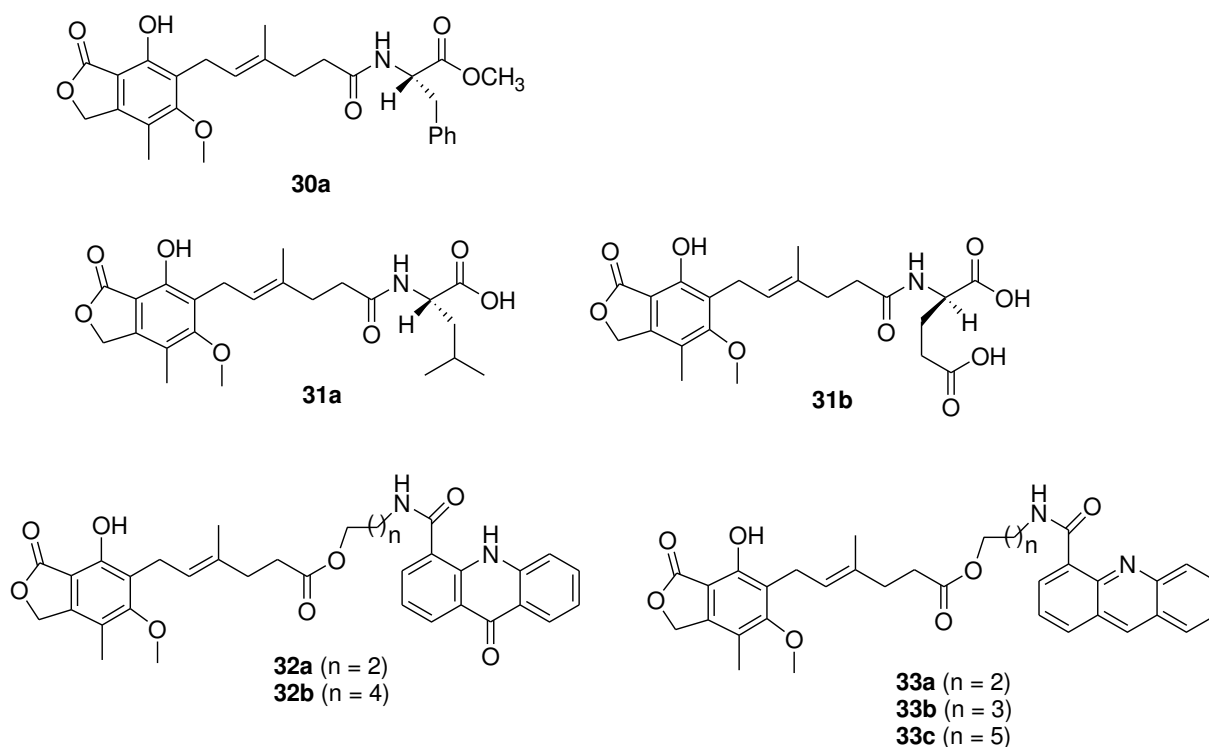
pochodnych MPA **30 – 33** wobec komórek Jurkat potwierdziły, że działają one poprzez inhibicję IMPDH.

C2.2.3 Wybrane pochodne MPA jako inhibitory dojrzewania komórek dendrytycznych

W kolejnych pracach badano hamowanie wzrostu komórek dendrytycznych z użyciem PBMC oraz przeprowadzono test immunoenzymatyczny z udziałem najbardziej obiecujących pochodnych **30a, 31a,b, 32a,b, 33a-c** (Rys. 12) [H8].

W celu wywołania odpowiedzi immunologicznej organizmu konieczne jest rozpoznanie antygeny przez efektorowe komórki układu odpornościowego. Limfocyty B posiadają zdolność wiązania antygenów dzięki posiadaniu odpowiednich receptorów. W przypadku limfocytów T antygeny rozpoznawane są dopiero, gdy zostaną przetworzone i związane z cząsteczkami głównego układu zgodności tkankowej (MHC) przez tzw. komórki prezentujące antygen. Do komórek tych zaliczamy: limfocyty B, makrofagi, komórki dendrytyczne (DC, *dendritic cell*). Doniesienia literaturowe świadczą o ważności komórek dendrytycznych jako modulatorów reakcji immunologicznych. Dowiedziono, że DC wpływają praktycznie na wszystkie populacje limfocytów T [23,24].

Biorąc to pod uwagę postanowiono zbadać wpływ wybranych pochodnych aminokwasowych **30a, 31a,b**, akrydynowych **32a,b** i akrydynowych **33a-c** kwasu mykofenolowego oraz MPA **1** na generowanie komórek dendrytycznych.



Rysunek 12. Wyselekcjonowane pochodne MPA do badania hamowania wzrostu komórek dendrytycznych.

Związki **32b** i **33b** wykazywały wobec komórek CD80⁺ słabszą aktywność niż MPA **1**. Podobnie jak dla pochodnych aminokwasowych **30a**, **31a,b**, ilość komórek CD83⁺ była w ilości pomijalnej. Ekspansja komórek CD86⁺ hamowana była przez związki **32b**, **32c**, **33c**. Jednak również w tym przypadku porównywalną aktywność do MPA **1** wykazał jedynie związek **32b**.

W celu weryfikacji uzyskanych wyników przeprowadzono test na obecność endotoksyn w badanych związkach (*LAL*, *Endpoint Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate*), co potwierdziło, że badane związki nie zawierają endotoksyny, która mogłaby powodować dojrzewanie DC, a tym samym zafałszowanie aktywności badanych związków.

Następnie przeprowadzono badanie wpływu dojrzewania komórek dendrytycznych na aktywność proliferacyjną limfocytów metodą inkorporacji TdR-3H w obecności pochodnych **30a**, **31a,b**, **32a,b**, **33a-c**. Wygenerowane DC dodawano do wyizolowanych limfocytów w ilości (DC/limfocyty): 2:1, 1:1, 0,5:1, 0,25:1, 0,125:1 i oznaczano wpływ ilości DC traktowanych badanymi związkami na proliferację limfocytów.

Związki **31a**, **31b**, **32a**, **32b** i **33c** wykazały nieznacznie wyższy poziom hamowania dojrzewania DC w porównaniu z MPA **1**. Najsłabsze działanie wykazały związki **30a**, **33b** i **33c** które powodowały najwyższy stopień dojrzewania DC. Na uwagę zasługuje fakt, że DC

traktowane każdym z badanych związków w proporcjach DC : limfocyty zbliżonych do fizjologii czyli 0.25:1 i 0.125:1 stymulowały proliferację limfocytów w mniejszym stopniu niż MPA **1**. Jest to niewątpliwie zaleta uzyskanych związków, która w przypadku zastosowania ich w leczeniu prowadziłyby do sprawniejszego hamowania reakcji odrzucania mediowanego przez limfocyty w porównaniu do samego MPA **1** [H8].

C.2.2.3.1 Test immunoenzymatyczny wybranych pochodnych MPA

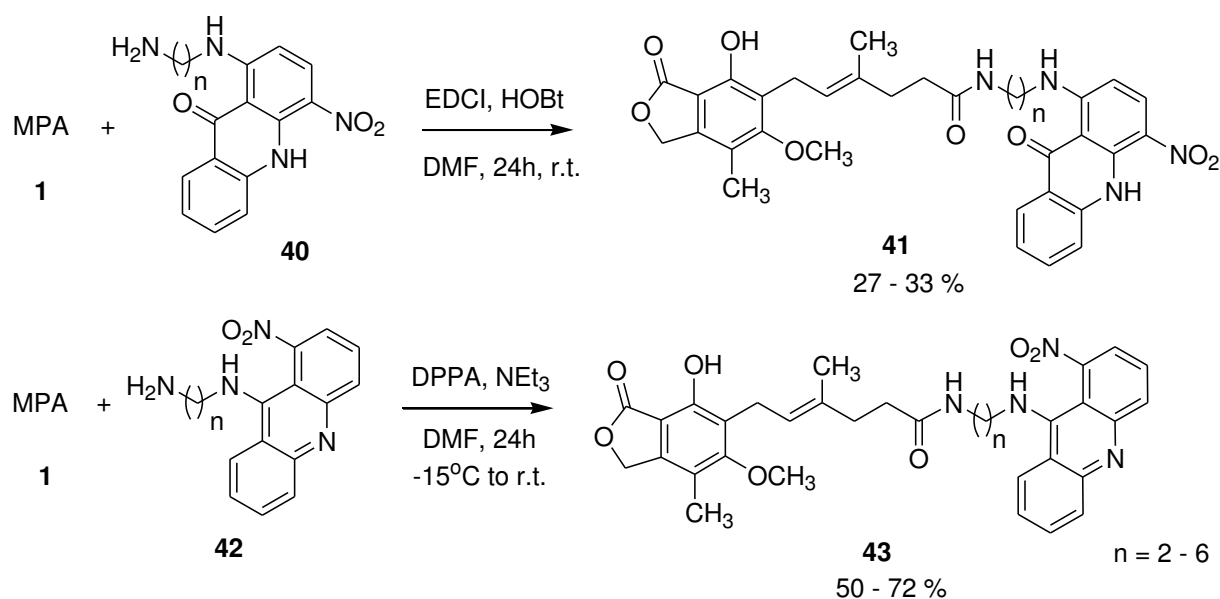
W kolejnym etapie badań nad pochodnymi MPA jako potencjalnymi immunosupresantami przeprowadzono test immunoenzymatyczny (ELISA, enzyme-linked immunoabsorbent assay). Test ELISA jest szybką metodą służącą do wykrywania i ilościowego oznaczania stężenia białek, czy antygenów. W teście tym enzym związany kowalencyjnie ze specyficznym przeciwciałem, które rozpoznaje określony antygen, reaguje z bezbarwnym substratem, przekształcając go w barwny produkt. I tak, cytokinami biorącymi udział w odrzucaniu przeszczepu są IFN- γ , IL-4 oraz IL-2. Badane związki nie wykazywały większego wpływu na stężenie IFN- γ , czy IL-4. Z drugiej strony, trzy pochodne znacznie obniżały ilość IL-2: **32a** (1,577 pg/ml), **32b** (3,371 pg/ml) oraz **33c** (1,874 pg/ml), w porównaniu do MPA **1** (4,192 pg/ml). Dość dobry wynik uzyskano także dla pochodnej D-glutaminowej **31b** (3,238 pg/ml), która to wyróżniała się wysokimi wartościami współczynnika selektywności SI [H4]. Z kolei właściwości prozapalne otrzymanych związków badano wobec IL-6, IL-12 oraz IL-15, jednak nie stwierdzono wpływu pochodnych na DC. Pochodną, która wykazała najbardziej interesującą aktywność w tej serii badań był koniugat **33c**. Spowodował on oprócz obniżenia stężenia IL-2, także IL-15 (2,143 pg/ml, MPA **1** 6,781 pg/ml), jak również zwiększył stężenie IL-10 (2,699 pg/ml, MPA **1** 1,239 pg/ml) odpowiedzialnej za właściwości antyzapalne [H8].

Reasumując, badania wpływu wyselekcjonowanych związków na proliferację limfocytów w obecności komórek dendrytycznych, jak i oddziaływania na stężenia cytokin prozapalnych i antyzapalnych dostarczyły obiecujących wyników dotyczących właściwości antyproliferacyjnych nowych pochodnych MPA. Stąd uzasadnione są badania *in vivo* najlepiej rokujących pochodnych aminokwasowych i koniugatów MPA jako potencjalnych leków immunosupresyjnych.

C.2.2.4 Badanie pochodnych MPA jako potencjalnych związków o działaniu przeciwnowotworowym

Jednym z istotnych ograniczeń chemoterapeutyków przeciwnowotworowych jest ich toksyczność. Biorąc pod uwagę fakt, iż nitroakrydyny są związkami o wysokiej aktywności antyproliferacyjnej i przeciwnowotworowej, kolejny etap badań koniugatów MPA obejmował amidowe pochodne **41** oraz **43** (Schemat 7) [H3]. Postanowiono zbadać wpływ przyłączenia pochodnych nitroakrydonów i nitroakrydyn do biologicznie aktywnej cząsteczki MPA **1** na ich toksyczność, a tym samym oszacować ich potencjalne znaczenie terapeutyczne.

Warunki reakcji kwasu mykofenolowego **1** z 1-[(ω -aminoalkilo)-4-nitro-9(10*H*)]akrydonami **40** oraz z 9-(ω -aminoalkilo)amino-1-nitroakrydynami **42** optymalizowano z kilkoma odczynnikami kondensującymi. W przypadku syntezy koniugatów akrydonowych **41** najwyższe wydajności uzyskano przy użyciu 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu (EDCI) w obecności hydroksybenzotriazolu (HOBt), natomiast otrzymywanie pochodnych akrydynowych **43** zachodziło najkorzystniej przy zastosowaniu azydku difenylofosforu (DPPA). Prawdopodobnym powodem niższych wydajności produktów **41** była słaba rozpuszczalność akrydonów **40** w środowisku reakcji.



Schemat 7. Synteza amidowych koniugatów MPA z 4-nitroakrydonami **41** oraz 1-nitroakrydynami **43**.

Cytotoksyczność koniugatów **41**, **43** badano jako test z MTT wobec ludzkich linii komórek ostrej białaczki Jurkat, Molt-4, HL-60, CCRF-CEM, mysich komórek białaczki L1210, a także PBMC uzyskanych od zdrowych dawców. Zgodnie z przewidywaniami, pochodne akrydynowe **43** były bardziej aktywne, aniżeli akrydony **41**. Z drugiej strony niższa cytotoksyczność koniugatów **41** mogłaby okazać się istotną zaletą podczas badań *in vivo*.

Ponadto wnioskowano ogólną prawidłowość, że koniugaty **43** są mniej aktywne w porównaniu z wyjściowymi akrydynami **42** oraz aktywniejsze niż MPA **1**, a obserwowany wpływ poszczególnych fragmentów struktury był raczej addytywny, aniżeli synergistyczny. Cytotoksyczność koniugatów akrydonowych **41** wobec PBMC (IC_{50} w zakresie 0,60 – 1,06 μM) była podobna do MPA **1** ($IC_{50} = 1,28 \mu\text{M}$). Nieco wyższą toksyczność wykazywała pochodna **41** ($n = 3$) wobec PBMC ($IC_{50} = 0,6 \mu\text{M}$) oraz Molt-4 ($IC_{50} = 0,027 \mu\text{M}$, dla porównania: MPA **1** $IC_{50} = 0,075 \mu\text{M}$). Z kolei linia komórkowa Jurkat okazała się szczególnie podatna na wszystkie badane koniugaty **41** ($IC_{50} > 0,0008 \mu\text{M}$) w porównaniu do MPA **1** ($IC_{50} = 0,193 \mu\text{M}$).

Najbardziej wrażliwymi komórkami na koniugaty **43** była linia L1210, gdzie IC_{50} mieściło się w zakresie 0,02 μM – 0,27 μM (dla MPA **1** $IC_{50} = 2,18 \mu\text{M}$). Najbardziej odporną linią komórek okazała się HL-60, gdzie najaktywniejszy koniugat akrydynowy **43** ($n = 3$) posiadał wartość $IC_{50} = 2,67 \mu\text{M}$ (dla MPA **1** $IC_{50} = 9,77 \mu\text{M}$). Z kolei związek **43** ($n = 4$) był najbardziej toksyczny wobec Molt-4 ($IC_{50} = 0,124 \mu\text{M}$), L1210 ($IC_{50} = 0,02 \mu\text{M}$) oraz PBMC ($IC_{50} = 0,108 \mu\text{M}$, MPA **1** $IC_{50} = 1,28 \mu\text{M}$). Zarówno koniugaty **43** (IC_{50} w zakresie 0,53 μM - 2,27 μM) jak i wyjściowe akrydyny **42** (IC_{50} w zakresie 0,151 μM – 1,27 μM) były wyraźnie cytotoksyczne wobec komórek ludzkiej ostrej białaczki CCRF-CEM, podczas gdy MPA **1** praktycznie nie wykazywał tej aktywności ($IC_{50} > 156 \mu\text{M}$).

Badano także wpływ wiązania amidowego w związkach **41**, **43** na ich aktywność antyproliferacyjną. Testy żywotności zostały przeprowadzone dla równomolowych mieszanin MPA **1** oraz odpowiednich komponentów **40**, **42** wobec PBMC oraz Jurkat, gdzie wartości IC_{50} odpowiednich koniugatów **41**, **43** były porównywalne bądź wyższe. Z drugiej strony koniugaty **41**, **43** wykazywały wyższą aktywność aniżeli MPA **1**.

Reasumując, wszystkie koniugaty **41**, **43** były aktywne wobec badanych linii komórkowych, a ich zróżnicowana toksyczność może umożliwić dalszą optymalizację potencjalnej substancji o działaniu przeciwnowotworowym.

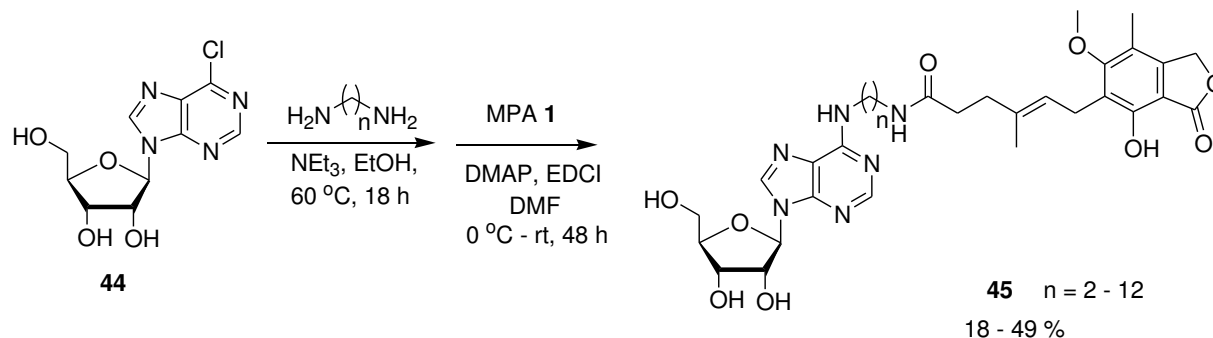
C.2.2.5 Koniugaty MPA z adenozyzną

W literaturze chemicznej opisano koniugaty MPA z adenozyzną odznaczające się obiecującą aktywnością biologiczną, takie jak pochodne mykofenolowo-adenino bis(fosfonowe) (MAD) [12,13] **20** (Rys. 8), czy też pochodna triazolowa **22** (Rys. 10) [15]. Adenozyzna jest związkiem o niezmiernie istotnym znaczeniu biologicznym, między innymi bierze udział w transporcie energii (ATP, ADP), pełni rolę neuroprzekaźnika, czy składnika DNA, RNA. Jako

lek (Adenocor, Adenocard, Adenoscan) stosowana jest w leczeniu napadowego częstoskurczu komorowego. Adenozyne poprzez swoje receptory może oddziaływać także na układ odpornościowy zarówno stymulująco, czy też jako immunosupresant. Ograniczeniem dla zastosowań klinicznych adenozyne jest krótki czas półtrwania *in vivo*, a połączenie tej cząsteczki z kwasem mykofenolowym mogłoby poprawić właściwości terapeutyczne [25]. Powyższe dane skłoniły mnie do podjęcia się otrzymania i zbadania koniugatów MPA z adenozyną, w ramach realizacji rozprawy doktorskiej, w której pełniłem rolę promotora pomocniczego.

C.2.2.5.1 Amidowe koniugaty MPA z adenozyną

Synteza amidowych koniugatów **45** obejmowała dwa etapy (Schemat 8). Rybozyd 6-chloropuryny **44** reagował w odpowiednią diamina w reakcji aromatycznej substytucji nukleofilowej. Następnie tak otrzymane *N*⁶-(ω -aminoalkilo)adenozyne poddawano kondensacji z kwasem mykofenolowym **1** za pomocą 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu (EDCI) w obecności 4-dimetyloaminopirydyny (DMAP) [H7].



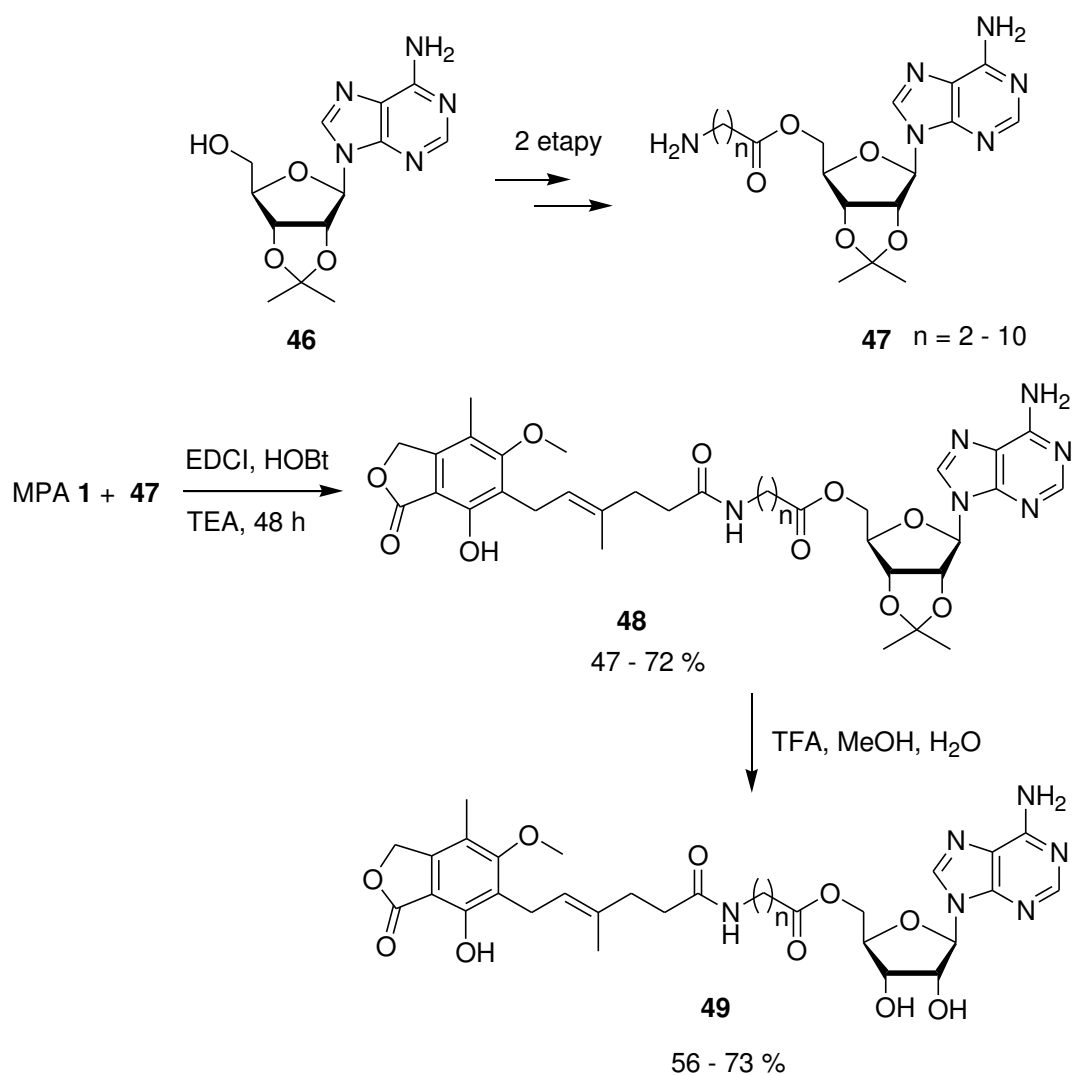
Schemat 8. Synteza amidowych koniugatów MPA z adenozyną.

Badania aktywności immunosupresyjnej *in vitro* obejmowały test żywotności z MTT oraz test antyproliferacyjny ze znakowaną tymidyną ³H-TdR. Uzyskane koniugaty **45** wykazały słabszą aktywność antyproliferacyjną wobec PBMC aniżeli MPA **1**. W przeciwieństwie do tego, aktywność pochodnych **45** wobec linii komórkowej Jurkat była porównywalna, a niekiedy nieco lepsza niż w przypadku MPA **1**. Nie obserwowano jednoznacznej korelacji pomiędzy długością diaminowego linkera koniugatów **45** a ich aktywnością, lecz wpływ ten był wyraźny. Najbardziej obiecujący związek **45** ($n = 3$) posiadał $\text{EC}_{50} = 1,28 \mu\text{M}$, $\text{IC}_{50} = 1109,5 \mu\text{M}$, $\text{SI} = 867$ (Jurkat), $\text{EC}_{50} = 17,71 \mu\text{M}$, $\text{IC}_{50} = 80,9 \mu\text{M}$, $\text{SI} = 4,6$ (PBMC), gdzie

analogiczne wartości dla kwasu mykofenolowego **1** wynosiły: $EC_{50} = 12,17 \mu\text{M}$, $IC_{50} = 1553,3 \mu\text{M}$, $SI = 128$ (Jurkat), $EC_{50} = 0,001 \mu\text{M}$, $IC_{50} = 15,92 \mu\text{M}$, $SI = 15,92$ (PBMC). Dość wysoki współczynnik selektywności SI związku **45** ($n = 3$) wobec linii komórek Jurkat wskazuje na korzystny stosunek aktywności do toksyczności, a co za tym idzie interesujące właściwości antyproliferacyjne do potencjalnego zastosowania w transplantologii [H7].

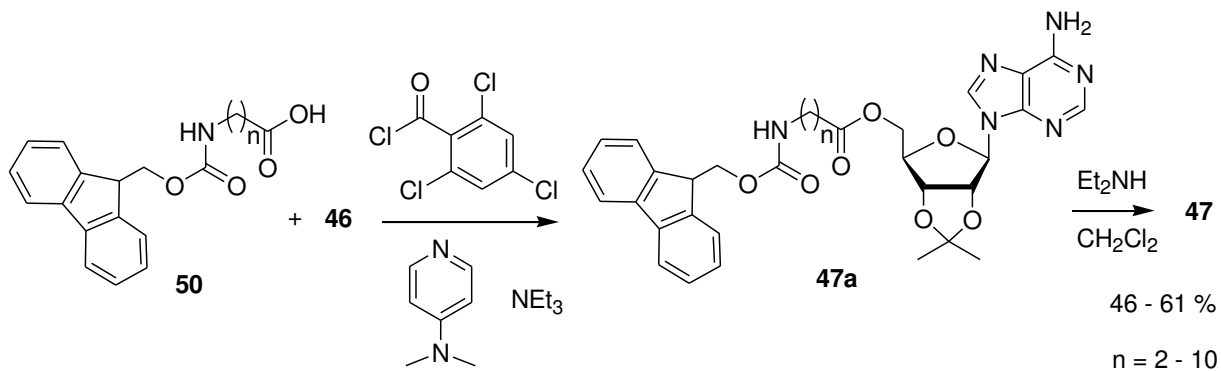
C.2.2.5.2 Estrowe koniugaty MPA z adenozyzną

Według danych literaturowych estrowe koniugaty MPA i adenozyzny mogą być odpornymi na glukuronidację inhibitorami IMPDH [11, 12]. Na tej podstawie zaprojektowałem estrowe koniugaty **49**, w których cząsteczka kwasu mykofenolowego jest połączona poprzez łącznik aminokwasowy z adenozyzną (Schemat 9) [H11]. Strategia syntetyczna polegała na przekształceniu 2',3'-*O*-izopropylidenoadozozyzny **46** w estry aminokwasów **47**, które to poddawano kondensacji z MPA **1** w obecności 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu (EDCI) oraz hydroksybenzotriazolu (HOBt). W kolejnym etapie koniugaty **48** ulegały deprotekcji do pochodnych adenozyzny **49**.



Schemat 9. Synteza estrowych koniugatów MPA z adenozyną.

Do otrzymania aminokwasowych pochodnych adenozyzny **47** wykorzystano *N*-(fluorenylometoksykarbonylo) aminokwasy **50**, które w warunkach reakcji Yamaguchi [19] ulegały kondensacji do estrów **47a** (Schemat 10). Następnie deprotekcja za pomocą roztworu dietyloaminy w dichlorometanie prowadziła do związków z wolną grupą aminową **47** [H11].



Schemat 10. Synteza estrowych pochodnych adenozyzny **47**.

Podobnie jak w przypadku amidowych koniugatów **45**, cytotoksyczność tej serii związków badano z użyciem testu kolorymetrycznego MTT, z kolei aktywność antyproliferacyjną na podstawie pomiaru inkorporacji znakowanej trytem tymidyny $^3\text{H-TdR}$.

Biorąc pod uwagę fakt, iż wg doniesień literaturowych [26] grupa ochronna 2',3'-*O*-izopropylidenowa, prawdopodobnie na skutek zmniejszenia podatności na deaminazy, nie powoduje utraty aktywności biologicznej adenozyiny, analogi **48** także poddano badaniom aktywności antyproliferacyjnej. Na podstawie uzyskanych wyników, w większości przypadków koniugaty **49** są mniej cytotoksyczne aniżeli **48**. W szczególności związek **49** ($n = 2$) posiadał wartość $\text{IC}_{50} = 35.745 \mu\text{M}$ wobec Jurkat, $\text{IC}_{50} = 15.453 \mu\text{M}$ wobec PBMC, gdzie analog **48** ($n = 2$) odpowiednio $\text{IC}_{50} = 1.470 \mu\text{M}$ wobec Jurkat, $\text{IC}_{50} = 0.881 \mu\text{M}$ wobec PBMC, z kolei MPA **1**: $\text{IC}_{50} = 0.624 \mu\text{M}$ wobec Jurkat, $\text{IC}_{50} = 2.185 \mu\text{M}$ wobec PBMC. Dawało się zauważyć ogólną tendencję, iż dłuższy łącznik aminokwasowy sprzyjał wyższej cytotoksyczności. Jednak korelacja ta nie potwierdzała się dla koniugatów **48**, **49** o najdłuższych linkerach ($n = 10$). Prawdopodobnym wyjaśnieniem tych obserwacji jest wpływ długości łącznika na podatność koniugatów na enzymy proteolityczne, których działanie może powodować rozkład do toksycznych metabolitów w komórce.

Zarówno wszystkie pochodne **48** (EC_{50} w zakresie od 0.814 do 1.384 μM), jak i **49** (EC_{50} w zakresie od 1.407 do 4.995 μM) wykazywały silniejsze właściwości antyproliferacyjne wobec Jurkat niż MPA **1** ($\text{EC}_{50} = 30.592 \mu\text{M}$). W przeciwieństwie do tego, żaden z badanych koniugatów **48**, **49** (EC_{50} w zakresie od 0.147 do 12.019 μM) nie posiadał silniejszych właściwości antyproliferacyjnych względem PBMC aniżeli MPA **1** ($\text{EC}_{50} = 0.0299 \mu\text{M}$).

Deprtekcja analogów 2',3'-*O*-izopropylidenowych **48** do **49** wyraźnie zwiększała cytotoksyczność oraz aktywność antyproliferacyjną. W szczególności koniugat **48** ($n = 5$) posiadał wartości $\text{IC}_{50} = 41.891 \mu\text{M}$, $\text{EC}_{50} = 4.980 \mu\text{M}$ podczas gdy analog po deprtekcji **49** ($n = 5$) $\text{IC}_{50} = 0,83 \mu\text{M}$, $\text{EC}_{50} = 1.384 \mu\text{M}$ wobec Jurkat. Badanie stabilności związków wobec tych komórek za pomocą HPLC potwierdziło, że chroniony koniugat **48** ($n = 5$) był metabolizowany szybciej niż MPA **1** oraz niechroniona pochodna **49** ($n = 5$).

Najwyższą wartość współczynnika selektywności wobec Jurkat uzyskano dla pochodnej **49** ($n = 5$) $\text{SI} = 8,124$ (MPA **1** $\text{SI} = 0.020$), natomiast wobec PBMC najbardziej obiecujący wynik otrzymano dla koniugatu **49** ($n = 10$) $\text{SI} = 49.500$, który był porównywalny z uzyskanym dla MPA **1** ($\text{SI} = 73.069$) [H11].

C3. Wnioski i plany dalszej działalności badawczej

W toku prac nad wybranym zagadnieniem habilitacyjnym zaproponowałem modyfikacje sposobu otrzymywania kwasu mykofenolowego oraz zaplanowałem syntezę i badania aktywności antyproliferacyjnej kilku klas jego pochodnych. Do najważniejszych osiągnięć zaliczam:

- dokładniejsze zbadanie i modyfikacja warunków wybranych etapów syntezy totalnej kwasu mykofenolowego,
- otrzymanie i charakterystyka aminokwasowych pochodnych kwasu mykofenolowego, a następnie zbadanie wpływu konfiguracji absolutnej oraz reszty w części aminokwasowej na aktywność antyproliferacyjną tych związków,
- opracowanie syntezy estrowych koniugatów kwasu mykofenolowego i akrydonów / akrydyn, następnie zbadanie wpływu długości łącznika oraz rodzaju heterocykla na właściwości antyproliferacyjne otrzymanych pochodnych,
- zbadanie właściwości immunosupresyjnych wybranych pochodnych kwasu mykofenolowego jako inhibitorów dojrzewania komórek dendrytycznych oraz cytokin wpływających na odrzucanie przeszczepów,
- otrzymanie i charakterystyka amidowych koniugatów kwasu mykofenolowego z pochodnymi nitroakrydonów / nitroakrydyn oraz zbadanie ich aktywności cytotoksycznej wobec wybranych linii komórek białaczki,
- opracowanie syntezy koniugatów kwasu mykofenolowego i adenozy, następnie zbadanie wpływu długości, rodzaju łącznika na aktywność tych pochodnych jako potencjalnych immunosupresantów.

W każdej serii otrzymanych związków dało się wyselekcjonować pochodną, która pod względem aktywności bądź toksyczności jest obiecująca w porównaniu do wyjściowego kwasu mykofenolowego. Stąd dalsze plany obejmują badania *in vivo* potencjalnych immunosupresantów w podtrzymywaniu allogenicznych przeszczepów skóry u myszy. Ponadto aktualnie pełnię rolę promotora pomocniczego w przewodzie doktorskim, gdzie nowe pochodne MPA wykazały obiecującą aktywność przeciwbakteryjną w porównaniu z takimi antybiotykami jak kanamycyna, czy ampicylina [V16]. Z uwagi na narastający problem oporności wielolekowej, ten kierunek badań nad nowymi pochodnymi MPA jest również obiecujący.

V. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych)

Swoje pierwsze zadania badawcze realizowałem w Katedrze Chemii Organicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej pod kierunkiem profesora Janusza Rachonia. Przygotowywana przez mnie praca magisterska dotyczyła syntezy i badania stabilności termodynamicznej mieszanych bezwodników ditiofosforowo - karboksylowych $>P(S)S-C(O)-$, a w szczególności ich izomeryzacji do pochodnych tiocyloych $>P(O)S-C(S)-$ oraz $>P(O)S-C(S)-$. Celem tego projektu było opracowanie nowych odczynników tioacylujących. Zagadnienie to kontynuowałem w ramach swojej rozprawy doktorskiej, w ramach której syntezowałem i badałem mieszane bezwodniki selenofosforowo - karboksylowe $>P(Se)O-C(O)-$. Pomimo, iż nie stwierdziłem ich izomeryzacji do oczekiwanych pochodnych selenoacyloych $>P(O)O-C(Se)-$, to badania mechanizmu izomeryzacji do selenofosforanów Se-acylu $>P(O)Se-C(O)-$ dostarczyły dowodów na jej rodnikowy przebieg [V1]. Ponadto kwasy tio i selenofosforowe będące substratami do syntezy tego typu mieszanych bezwodników mogą służyć jako donory pojedynczego elektronu w procesach SET [V2]. Niedługo po uzyskaniu stopnia naukowego doktora zostałem zatrudniony na Wydziale Chemicznym PG na stanowisku asystenta, a następnie rozpocząłem staż podoktorski (15 miesięcy) na Uniwersytecie w Leuven (Belgia). Badania te wykonywałem we współpracy z profesorem Wimem Dehaenem oraz profesorem Mario Smetem i dotyczyły one otrzymywania oraz charakterystyki wysoce rozgałęzionym polimerów. Moje zadanie w tym projekcie polegało na syntezie potrzebnych do polimeryzacji monomerów [V3]. Po zakończeniu stażu podoktorskiego postanowiłem dokładniej zbadać wpływ struktury pochodnych kwasu selenofosforowego na ich trwałość termodynamiczną oraz potencjalne wykorzystanie w syntezie [V4,V5,V7]. W przypadku mieszanych imidów kwasu *O,O*-neopentylidenoselenofosforowego i kwasów karboksylowych obserwowałem efekt anomeryczny [V6], jednak żaden z badanych przeze mnie analogów nie izomeryzował do pochodnej selenoacyloych, a tym samym nie był potencjalnym odczynnikiem selenoacylującym. Podjąłem decyzję o zmianie swojej tematyki badawczej i zainteresowałem się syntezą związków biologicznie czynnych, które mogłyby znaleźć zastosowanie lecznicze. Dotyczyło to pochodnych akrydyn jako substancji o szerokim działaniu biologicznym [V8], a także innych klas związków będących immunosupresantami [V9], czy też inhibitorami angiogenezy [10]. W ramach swojej pracy habilitacyjnej zainteresowałem się otrzymywaniem nowych pochodnych kwasu mykofenolowego jako potencjalnych immunosupresantów, a w między czasie brałem udział w pracach syntetycznych stanowiących część dwóch projektów

grantowych, które miały na celu otrzymanie i zbadanie nowych substancji przeciwnowotworowych [V11-V14]. Ponadto uwzględniając szerokie spektrum aktywności kwasu mykofenolowego zaproponowałem nowe jego amidowe pochodne [V15, V16], spośród których część wykazała interesującą aktywność przeciwbakteryjną.

V1. Zestawienie publikacji dokumentujących pozostałe osiągnięcia naukowo – badawcze

[V1]. J. Rachoń[✉], **G. Cholewiński**, D. Witt, „Synthesis and reactivity of *O*-acyl selenophosphates”; Chem. Commun., **2005**, 2692-2694.

Punktacja MNiSW₂₀₀₅ = 24, IF₍₂₀₀₅₎ = 4,426.

[V2]. **G. Cholewinski**, D. Witt, R. Majewski, T. Ossowski, J. Rachoń[✉], „The reaction of thio and seleno phosphoric acid derivatives with *O*-thioacylated hydroxylamine”, Heteroatom Chem. **2007**, 18, 767-773.

Punktacja MNiSW₂₀₀₇ = 15, IF₍₂₀₀₇₎ = 0,984.

[V3]. A. Kowalczyk, A. Vandendriessche, B. Trzebicka, B. Mendrek, U. Szeluga, **G. Cholewinski**, M. Smet, A. Dworak, W. Dehaen, “Core-Shell Nanoparticles with Hyperbranched Poly(arylene-oxindole) Interiors”, J. Polym. Sci. Pol. Chem., **2009**, 47, 1120-1135.

Punktacja MNiSW₂₀₀₉ = 24, IF₍₂₀₀₉₎ = 3,971.

[V4]. **G. Cholewiński**, J. Chojnacki, J. [✉], Pikies, J. Rachoń, „*O*-4-Chlorobenzoyl diphenylselenophosphinate”, Acta Crystallogr. E **2009**, 65, o855.

Punktacja MNiSW₂₀₀₉ = 10, IF₍₂₀₀₉₎ = 0,411.

[V5]. **G. Cholewiński**, J. Chojnacki, J. [✉], Pikies, J. Rachoń, „*O*-Pivaloyl diphenylselenophosphinate”, Acta Crystallogr. E **2009**, 65, o853-o854.

Punktacja MNiSW₂₀₀₉ = 10, IF₍₂₀₀₉₎ = 0,411.

[V6]. **G. Cholewiński**, J. Chojnacki, J. Pikies, J. Rachoń[✉], “Synthesis and structural investigation of *N*-acyl selenophosphoroamides”, Org. Biomol. Chem., **2009**, 7, 4095 – 4100.

Punktacja MNiSW₂₀₀₉ = 24, IF₍₂₀₀₉₎ = 3,762.

[V7]. **G. Cholewiński**, J. Chojnacki, J. [✉], Pikies, J. Rachoń, „5,5-Dimethyl-2-methylseleno-1,3,2-dioxaphosphorinan-2-one” Acta Crystallogr. E **2010**, 66, o856.

Punktacja MNiSW₂₀₀₉ = 10, IF₍₂₀₀₉₎ = 0,411.

[V8]. **G. Cholewiński**[✉], K. Dzierzbicka, A. M. Kołodziejczyk, „Natural and synthetic acridines/acridones as antitumor agents: their biological activities and methods of synthesis”, *Pharmacol. Rep.* **2011**, 63, 305 – 336.

Punktacja MNiSW₂₀₁₁ = 27, IF₍₂₀₁₁₎ = 1,769.

[V9]. K. Dzierzbicka[✉], **G. Cholewiński**, D. Iwaszkiewicz - Grześ, P. Trzonkowski, „Poszukiwanie nowych leków immunosupresyjnych”, *Wiad. Chem.*, **2011**, 1-2, 59-92.

Punktacja MNiSW₂₀₁₁ = 6, IF₍₂₀₁₁₎ = 0.

[V10]. M. Gensicka, A. Glowacka, K. Dzierzbicka[✉], **G. Cholewiński**, “Inhibitors of Angiogenesis in Cancer Therapy – Synthesis and Biological Activity”, *Curr. Med. Chem.*, **2015**, 22, 3830-3847.

Punktacja MNiSW₂₀₁₅ = 40, IF₍₂₀₁₁₎ = 3,455.

[V11]. W. Januchta, M. Serocki, K. Dzierzbicka[✉], **G. Cholewiński**, A. Skladanowski, “Synthesis of functionalized new conjugates of batracylin with tuftsin/retro-tuftsin derivatives and their biological evaluation”, *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 106, 85-94.

Punktacja MNiSW₂₀₁₅ = 40, IF₍₂₀₁₁₎ = 3,902.

[V12]. W. Januchta, M. Serocki, K. Dzierzbicka[✉], **G. Cholewiński**, M. Gensicka, A. Skladanowski, “Synthesis and biological evaluation of novel analogues of batracylin with synthetic amino acids and adenosine: an unexpected effect on centromere segregation in tumor cells through a dual inhibition of topoisomerase II alpha and Aurora B”, *RSC Adv.*, **2016**, 6, 42794-42806.

Punktacja MNiSW₂₀₁₆ = 35, IF₍₂₀₁₆₎ = 3,108.

[V13]. A. Siebert, M. Gensicka, **G. Cholewiński**, K. Dzierzbicka[✉], “Synthesis of Combretastatin A-4 Analogs and their Biological Activities”, *Anticancer Agents Med. Chem.*, **2016**, 16, 942-960.

Punktacja MNiSW₂₀₁₆ = 35, IF₍₂₀₁₆₎ = 2,598.

[V14]. M. Gensicka – Kowalewska, **G. Cholewiński**, K. Dzierzbicka[✉], “Recent developments in the synthesis and biological activity of acridine/acridone analogues”, *RSC Adv.*, **2017**, 7, 15776–15804.

Punktacja MNiSW₂₀₁₆ = 35, IF₍₂₀₁₇₎ = 2,936.

[V15]. A. Siebert, **G. Cholewiński**, D. Garwolińska, A. Olejnik, J. Rachoń, J. Chojnacki[✉], “The synthesis and structure of a potential immunosuppressant: *N*-mycophenoyl malonic acid dimethyl ester”, *J. Mol. Struct.*, **2018**, 1151, 218-222.

Punktacja MNiSW₂₀₁₆ = 20, IF₍₂₀₁₇₎ = 2,011.

[V16]. A. Siebert, M. Wysocka, B. Krawczyk, **G. Cholewiński**✉, J. Rachoń, “Synthesis and antimicrobial activity of amino acid and peptide derivatives of mycophenolic acid”, *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 143, 646-655.

Punktacja MNiSW₂₀₁₆ = 40, IF₍₂₀₁₇₎ = 4,816.

✉ - autor korespondencyjny

Punktacja MNiSW została przygotowana zgodnie z aktualnym ujednoliconym wykazem czasopism naukowych ogłoszonym dla roku publikacji. Dla najnowszych publikacji przyjęto najbardziej aktualne dostępne dane, czyli za rok 2016 (stan na dzień przygotowania wniosku). Wartości IF zostały przedstawione zgodnie z rokiem ukazania się publikacji. Dla publikacji opublikowanych w latach 2017, 2018 podano IF za rok 2017.

Literatura

- [1]. R. Bentley, Mycophenolic acid: a one hundred year odyssey from antibiotic to immunosuppressant, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 3801-3826.
- [2]. L. Hedstrom, IMP Dehydrogenase: structure, mechanism and inhibition, *Chem. Rev.* **2009**, 109, 2903-2928.
- [3]. P.H. Nelson, S.F. Carr, B.H. Devens, E.M. Eugui, F.Franco, C. Gonzalez, R.C. Havley, D.G. Loughhead, D.J. Milan, E. Papp, J.W. Patterson, S. Rouhafza, E.B. Sjogren, D.B. Smith, R.A. Stephenson, F.X. Talamas, A-N. Waltos, R.J. Weikert, J.C. Wu Structure-Activity Relationships for Inhibition of Inosine Monophosphate Dehydrogenase by Nuclear Variants of Mycophenolic Acid, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 4181-4196.
- [4]. M.D. Sintchak, E. Nimmesgern, The structure of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and the design of novel inhibitors, *Immunopharmacol.* **2000**, 47, 163-184.
- [5]. W.J. Watkins, J.M. Chen, A. Cho, L. Chong, N. Collins, M. Fardis, W. Huang, M. Hung, T. Kirschberg, W.A. Lee, X. Liu, W. Thomas, X. Xu, A. Zeynalzadegan, J. Zhang, Phosphonic acid-containing analogues of mycophenolic acid as inhibitors of IMPDH, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 3479-3483.
- [6]. J.C. Rohloff, J.O. Gardner, R.W. Towne, Mycophenolate dianions, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 43, 7803-7806.
- [7]. L. Chen, D. Wilson, H.N. Jayaram, K.W. Pankiewicz, Dual inhibitors of IMP-dehydrogenase and histone deacetylases for cancer treatment, *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 6685-6691.

- [8]. K. Sunohara, S. Mitsuhashi, K. Shigetomi, M. Ubukata, Discovery of N-(2,3,5-triazoyl)mycophenolic amide and mycophenolic epoxyketone as novel inhibitors of human IMPDH, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23, 5140-5144.
- [9]. Ch.P. Shah, P.S. Kharkar, Newer human inosine 5'-monophosphate dehydrogenase 2 (hIMPDH2) inhibitors as potential anticancer agents, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2018**, 33, 972-977.
- [10]. G. Lai, W.K. Anderson, Synthesis of Novel Indole Analogues of Mycophenolic Acid as Potential Antineoplastic Agents, *Tetrahedron* **2000**, 56, 2583-2590.
- [11]. M.E. Meza-Aviña, M. Ordoñez, M. Fernández-Zertuche, L. Rodríguez-Fragoso, J. Reyes-Esparza, A.A. Martínez de los Ríos-Corsino, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 6521-6528.
- [12]. K.W. Pankiewicz, K.B. Lesiak-Watanabe, K.A. Watanabe, S.E. Patterson, H.N. Jayaram, J.A. Yalowitz, M.D. Miller, M. Seidman, A. Majumdar, G. Prehna, B.M. Goldstein, Novel Mycophenolic Adenine Bis(phosphonate) Analogues As Potential Differentiation Agents against Human Leukemia, *J. Med. Chem.* 45, 2002, 703-712.
- [13]. K. Felczak, R. Vince, K.W. Pankiewicz, NAD-based inhibitors with anticancer potential, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, 24, 332-336.
- [14]. Y. Peng, Y. Dong, R.I. Mahato, Synthesis and Characterization of a Novel Mycophenolic Acid - Quinic Acid Conjugate Serving as Immunosuppressant with Decreased Toxicity, *Mol. Pharmaceutics* 2015, 12, 4445-4453.
- [15]. L. Chen, D.J. Wilson, Y. Xu, C.C. Aldrich, K. Felczak, Y.Y. Sham, K.W. Pankiewicz, Triazole-linked inhibitors of inosine monophosphate dehydrogenase from human and *mycobacterium tuberculosis*. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 4768-4778.
- [16]. F. Alani, J.A. Grove, W.A. Anderson, M. Moo-Young, Mycophenolic acid production in solid-state fermentation using a packed-bed bioreactor. *Biochem. Eng. J.*, **2009**, 44, 106-110.
- [17]. J.W. Patterson, The Synthesis of Mycophenolic Acid from 2,4-Dihydroxybenzoic Acid. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 4542-4548.
- [18]. D.F. Jones, S.D. Mills, Preparation and antitumor properties of analogs and derivatives of mycophenolic acid, *J. Med. Chem.* **1971**, 14, 305-311.
- [19]. J. Inanaga, K. Hirata, H. Saeki, T. Katsuki, M. Yamaguchi, A rapid esterification by means of mixed anhydride and its application to large-ring lactonization, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1979**, 52, 1989-1993.

- [20]. I. Dhimitruka, J. SantaLucia Jr., Investigation of the Yamaguchi esterification mechanism. Synthesis of the Lux-S enzyme inhibitor using an improved esterification method, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 47-50.
- [21]. K. Hung, P.W.R. Harris, A.M. Heapy, M.A. Brimble, Synthesis and assignment of stereochemistry of the antibacterial cyclic peptide xenematide, *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, *9*, 236-242.
- [22]. S. Mitsuhashi, J. Takenaka, K. Iwamori, N. Nakajima, M. Ubukata, Structure-activity relationships for inhibition of inosine monophosphate dehydrogenase and differentiation induction of K562 cells among the mycophenolic acid derivatives, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 8106-8111.
- [23] X. He, R.L. Smeets, H.J. Koenen, P.M. Vink, J. Wagenaars, A.M. Boots, I. Joosten, Mycophenolic Acid-Mediated Suppression of Human CD4+ T Cells: More Than Mere Guanine Nucleotide Deprivation, *Am. J. Transplant.* **2011**, *11*, 439-449.
- [24] A.E. Morelli, Dendritic cells of myeloid lineage: the masterminds behind acute allograft rejection, *Curr. Opin. Organ Transplant.* **2014**, *19*, 20-27.
- [25]. M. Samsel, K. Dzierzbicka, Therapeutic potential of adenosine analogues and conjugates, *Pharmacol. Rep.* **2011**, *63*, 601-617.
- [26]. G. Vistoli, A. Pedretti, L. Alessandrini, S. Casati, P. Ciuffreda, G. Meroni and E. Santaniello, Enhanced activity or resistance of adenosine derivatives towards adenosine deaminase-catalyzed deamination: Influence of ribose modifications, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 2877-2879.

Gregor Andrianti