

POSZUKIWANIE NOWYCH LEKÓW IMMUNOSUPRESYJNYCH

QUEST FOR NEW IMMUNOSUPPRESSIVE DRUGS

**Krystyna Dzierzbicka^{1*}, Grzegorz Cholewiński¹,
Dorota Iwaszkiewicz-Grześ¹, Piotr Trzonkowski²**

¹ *Katedra Chemii Organicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska,
ul. G. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk*

² *Zakład Immunologii Klinicznej i Transplantologii,
Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Dębinki 7, 80-952 Gdańsk*

**e-mail:kd@chem.pg.gda.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Leki immunosupresyjne stosowane w medycynie
 - 1.1. Leki hamujące produkcję cytokin biorących udział w aktywacji komórek i ich klonalnej proliferacji
 - 1.2. Leki antyproliferacyjne (leki hamujące podziały komórkowe)
 - 1.3. Przeciwciała poliklonalne i monoklonalne
2. Nowe potencjalne leki immunosupresyjne
 - 2.1. Bakuchiol i jego pochodne
 - 2.2. Sotrastauryna (AEB071)
 - 2.3. Lipofilowe aminoalkohole i diaminy
 - 2.4. Cyklolinopeptyd A – inhibitor IL-1 i IL-2
 - 2.5. Pochodne 5,6-dihydroindolo[2,1-a]izochinoliny
 - 2.6. Pochodne chinoliny
 - 2.7. Pochodne iminocukrów
 - 2.8. Pochodne witaminy D₃
 - 2.9. *N*-Podstawione imidazolidin-2-ony oraz *N*-tetrahydropirymidin-2(1*H*)-ony
 - 2.10. Pochodne 3-metyloizoksazolo[5,4-*e*][1,2,4]triazepin-4-ony
 - 2.11. Alemtuzumab
 - 2.12. Depsipeptydy

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

dr hab. inż. Krystyna Dzierzbicka w roku 1985 ukończyła studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej w specjalności Chemia i Technologia Organiczna. W tym samym roku podjęła pracę w Katedrze Chemii Organicznej PG, gdzie pracuje do chwili obecnej. W 1994 roku obroniła pracę doktorską, a w 2005 r. otrzymała tytuł doktora habilitowanego nauk chemicznych. Jest współautorem kilkunastu prac dotyczących syntezy i projektowania koniugatów muramylopeptydów i desmuramylopeptydów ze związkami o stwierdzonej lub domniemanej aktywności biologicznej, pochodnych akrydyny, akrydonu, batracyliny, antrachinonów czy tuft-syny. Obecnie zajmuje się syntezą związków immunosupresyjnych oraz syntezą niskocząsteczkowych peptydów o potencjalnym zastosowaniu w kosmetykach.

dr inż. Grzegorz Cholewiński w roku 2000 ukończył studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej na kierunku Technologia Chemiczna o specjalności Lekka Synteza Organiczna. W 2006 roku obronił pracę doktorską, w latach 2007/2008 odbył staż doktorski na Uniwersytecie w Leuven (Belgia) w zespole naukowym profesora Wima Dehaena. Obecnie pracuje w Katedrze Chemii Organicznej PG nad syntezą związków o potencjalnym działaniu immunosupresyjnym.

mgr inż. Dorota Iwaszkiewicz-Grześ w roku 2010 ukończyła studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej na kierunku Biotechnologia o specjalności Biotechnologia Żywności. W październiku 2010 roku rozpoczęła studia doktoranckie na Wydziale Chemicznym PG w Katedrze Chemii Organicznej pod kierunkiem dr hab. inż. Krystyny Dzierzbickiej gdzie zajmuje się syntezą związków immunosupresyjnych.

dr hab. med. Piotr Trzonkowski – aktywnie zajmuje się immunologią od 1997 roku. Specjalizacja: (i) główna – immunologia (ii) dodatkowe – histologia, transplantologia (iii). Obecne zainteresowania naukowe dotyczą roli komórek regulatorowych w odporności i możliwości ich zastosowania w terapii immuno-supresyjnej po przeszczepach allogenicznych i w chorobach autoimmunologicznych. Prowadzi badania nad wykorzystaniem nowych związków immunosupresyjnych w terapii po przeszczepach narządowych. Zajmuje się też opisem funkcjonowania układu immunologicznego osób przewlekle hemodializowanych oraz po przeszczepie allogenicznym nerki oraz zaburzeń działania układu immunologicznego osób starszych.

ABSTRACT

Transplantology is getting more and more important in medicine. Development of surgical techniques and immunosuppressive treatment enabled to establish successful transplantations with various organs and tissues. However, allografts are recognized as foreign tissues and stimulate rejection, i.e. a strong immunological response which, if not stopped, results in complete destruction of the transplanted tissue. In order to prevent the rejection patients have to be treated with immunosuppressive drugs after transplantation. Unfortunately, such a damping of immune system poses a risk of cancer or severe infections. The treatment itself is also toxic, notably when applied in a long-term maintenance therapy. Currently, adverse effects of immunosuppressive drugs are recognized as the ones to be involved significantly in chronic rejection and limitation of long survival of grafted tissues. Whereas prevention of acute rejection is mostly successful, there is still no efficient treatment for chronic graft rejection. Reduction of a dose of immunosuppressive drugs or an invention of new active substances is considered the most promising solution.

Nowadays, immunosuppressive drugs can be divided into the three main groups: agents which inhibit production of cytokines taking part in cells' activation (glucocorticosteroids, calcineurine inhibitors, mTOR inhibitors), antiproliferative compounds (azathiopirin, mycophenolate mofetil, mycophenolic acid sodium salt), and antibodies.

In this article we present new investigations towards immunosuppressive drugs, their structures and synthetic methods.

Keywords: immunosuppressive activity, immunosuppressive drugs, glucocorticosteroids, CsA, FK506, tacrolimus, MPA, MMF, MPS

Słowa kluczowe: aktywność immunosupresyjna, leki immunosupresyjne, glikokortykosteroidy, CsA, FK506, takrolimus, MPA, MMF, MPS

WYKAZ STOSOWANYCH SKÓTÓW

ATG	– globulina antylimfocytarna
<i>t</i> -BuOK	– <i>tert</i> -butanolan potasu
CbzCl	– chloromrówczan benzylu
DIC	– <i>N,N'</i> -diizopropylkarbodiimid
DMF	– <i>N,N</i> -dimetyloformamid
DTH	– reakcja nadwrażliwości typu późnego (ang. <i>delayed type hypersensitivity</i>)
DMAP	– 4-(<i>N,N</i> -dimetyloamino)-pirydyna
DMSO	– dimetylosulfotlenek
EDCI	– chlorowodorek 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu
FK506	– takrolimus
GM-GSF	– czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów
GVDH	– reakcja przeszczep przeciwko biorcy (ang. <i>graft-versus-host-disease</i>)
HOSU	– <i>N</i> -hydroksyimid kwasu bursztynowego
IL	– interleukina
ICAM	– białka adhezyjne, białka uczestniczące w przyleganiu komórek do siebie (ang. <i>intracellular adhesion molecule</i>)
IC ₅₀	– stężenie hamujące proliferację komórek w 50% w stosunku do komórek kontrolnych
Ile	– izoleucyna
IMPDH	– dehydrogenaza inozyno-5'-monofosforanu
INF γ	– interferon γ
LDA	– diizopropylamidek litu
Leu	– leucyna
LiHMDS	– heksametylosilan litu
LiTMP	– tetrametylopirydyna litu
MHC	– układ zgodności tkankowej
MLR	– mieszana reakcja limfocytów (ang. <i>mixed lymphocyte reaction</i>)
MPA	– kwas mykofenolowy
MTT	– bromek [3-(4,5,-dimetylo-2-ilo)-2,5-difenylotetrazolu]
NBS	– <i>N</i> -bromosukcynoimid
NK	– naturalne komórki „zabójcze” (ang. <i>natural killer</i>)
OVA	– albumina jaja kurzego (ang. <i>ovalbumin</i>)
PCC	– chlorochromian pirydyny
Phe	– fenyloalanina
β -Phe	– β -fenyloalanina

PHA	– fitohemaglutynina
PI3-K	– rodzina lipidowych kinaz, mających zdolność fosforylowania grupy hydroksylowej w pozycji 3 pierścienia fosfotydyloinozytolu
Pro	– prolina
Py	– pirydyna
TBDMS	– <i>tert</i> -butyloдимetylosilil
TBDMS-Cl	– chlorek <i>tert</i> -butyloдимetylosililu
TNF- α	– czynnik martwicy nowotworu α
Val	– walina

WPROWADZENIE

Transplantologia jako metoda leczenia nieuleczalnych chorób nabiera obecnie coraz większego znaczenia. Rozwój technik chirurgicznych i leczenia immunosupresyjnego umożliwił allotransplantacje różnych organów i tkanek. Przeszczep allogeniczny wywołuje silną reakcję odpornościową – odrzucanie – w wyniku której przeszczepiony organ jest niszczone. Dlatego też pacjenci po przeszczepie są zmuszeni do przyjmowania leków immunosupresyjnych tłumiących odpowiedź immunologiczną. Nie jest to jednak najskuteczniejsze leczenie ze względu na zwiększone ryzyko infekcji i nowotworzenia. Takie leczenie jest też toksyczne. Uboczne działanie leków immunosupresyjnych ma między innymi duży udział w odrzucaniu przewlekłym. Podczas, gdy przy użyciu leków immunosupresyjnych udało się ograniczyć występowanie odrzutów ostrych, wciąż nie ma skutecznego leczenia zapobiegającego i hamującego odrzucanie przewlekłe.

W latach siedemdziesiątych i osiemdziesiątych ubiegłego wieku udowodniono, że za odrzucanie przeszczepów odpowiadają głównie limfocyty efektorowe, zarówno T, jak i B oraz NK. Z kolei za indukcję tolerancji immunologicznej na przeszczepione tkanki odpowiadają głównie limfocyty regulatorowe. W 1995 roku opisano po raz pierwszy fenotyp regulatorowych limfocytów T jako $CD4^+CD25^+$ (T_{reg}) [1].

Immunologiczne odrzucanie przeszczepu jest mediowane przez limfocyty dwiema odrębnymi drogami: tzw. bezpośrednią i pośrednią prezentacją antygeny. Drogi te zostały odkryte i zdefiniowane po raz pierwszy przez Lechler'a i Batchelor'a [2]. Podczas bezpośredniej prezentacji antygeny, cząsteczki MHC dawcy występujące na jego komórkach prezentujących antygen (APC) są bezpośrednio rozpoznawane przez limfocyty T biorcy. Szybkość działania tego mechanizmu świadczy o jego udziale w pierwszych etapach ostrego odrzutu przeszczepionej tkanki. Ten rodzaj odpowiedzi jest wysoce wrażliwy na immunosupresję (np. na cyklosporynę A) [2]. Z czasem pula komórek APC dawcy ulega wyczerpaniu. Wtedy rozpoczyna swoje działanie drugi mechanizm prezentacji antygenów – pośredni, prowadzący nieuchronnie do stanu przewlekłego odrzucenia przeszczepu. Ten rodzaj alloreaktywności charakteryzuje się przetwarzaniem cząsteczek MHC dawcy i prezentacją ich fragmentów przez komórki prezentujące antygen biorcy, wywołując w ten sposób reakcję limfocytów T. W odróżnieniu od prezentacji bezpośredniej, pośrednia nie wykazuje zbyt dużej wrażliwości na cyklosporynę [2].

W ostatnim czasie został opisany jeszcze jeden mechanizm biorący udział w procesie odrzucania przeszczepianych tkanek i komórek, w którym dochodzi do aktywacji alloreaktywnych limfocytów T biorcy. Komórki dendrytyczne biorcy mogą nabyć obce cząsteczki MHC poprzez bezpośredni kontakt komórka-komórka. Nabyte w ten sposób MHC dawcy mogą stymulować odpowiedź limfocytów T. Drogę tę nazwano „semidirect”. Zdolność komórek dendrytycznych do przyswajania nietkniętych cząsteczek MHC obserwowano zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo*. Dodatkowo komórki dendrytyczne wykazują tę umiejętność niezależnie od stopnia dojrzałości. Niezbyt istotne jest również źródło obcych MHC, mianowicie przyswa-

jalne są receptory z powierzchni obcych komórek dendrytycznych, komórek śródbłonna, jak również rozpuszczalne białka MHC. Wydaje się, że droga ta stanowi pomost pomiędzy alloreaktywnością bezpośrednią i pośrednią, które samodzielnie nie wykazują zdolności do wzajemnej regulacji [3]. Zdolność limfocytów T do rozpoznawania alloantygenów odgrywa kluczową rolę we wczesnej fazie odrzutu poprzez uwrażliwienie biorcy na antygeny dawcy. Niemniej jednak to prawdopodobnie droga pośrednia jest główną siłą doprowadzającą do destrukcji przeszczepionego narządu [4, 5]. Proponowanym obecnie rozwiązaniem jest ograniczanie dawek leków immunosupresyjnych i opracowywanie nowych mniej toksycznych leków.

Obecnie stosowane leki immunosupresyjne możemy podzielić na 3 główne grupy: do pierwszej zaliczamy leki hamujące produkcję cytokin biorących udział w aktywacji komórek (glikokortykosteroidy, inhibitory kalcyneuryny, inhibitory TOR), do drugiej grupy należą leki antyproliferacyjne hamujące podziały komórkowe (azatiopryna, mykofenolan mofetylu, sól sodowa kwasu mykofenolowego), a trzecią stanowią przeciwciała poliklonalne i monoklonalne.

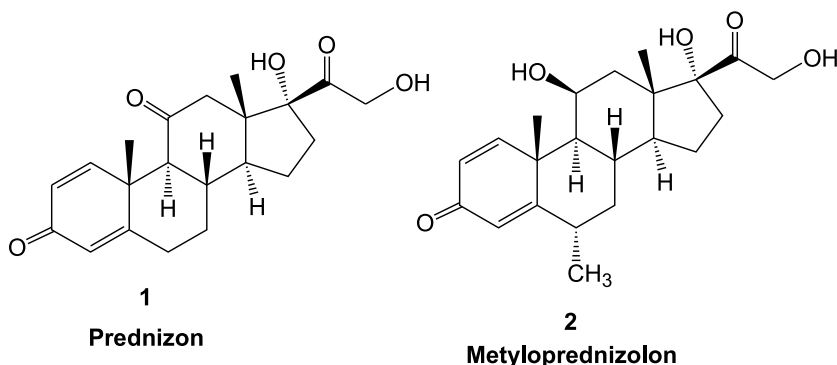
W artykule przedstawiono najnowsze kierunki poszukiwań leków immunosupresyjnych, ich struktury oraz metody otrzymywania.

1. LEKI IMMUNOSUPRESYJNE STOSOWANE W MEDYCYNIE

1.1. LEKI HAMUJĄCE PRODUKCJĘ CYTOKIN BIORĄCYCH UDZIAŁ W AKTYWACJI KOMÓREK I ICH KLONALNEJ PROLIFERACJI

- **Glikokortykosteroidy (GS) 1, 2** (Rys. 1) – najstarsza grupa leków immunosupresyjnych [6–10]:
 - wiążą się one ze swoistymi receptorami cytoplazmatycznymi znajdującymi się prawie we wszystkich komórkach organizmu, również w komórkach układu odpornościowego;
 - hamują syntezę wielu cytokin: IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, TNF α , GM-CSF;
 - blokują indukowaną formę tlenku azotu (iNOS), a także cyklooksygenazę 2;
 - uczestniczą w szlaku powstawania prostaglandyn z kwasu arachidonowego;
 - pobudzają syntezę lipokortyn (receptory dla lipokortyn zostały wykryte na monocytach i neutrofilach), które będąc specyficznymi inhibitorami fosfolipazy A2, pośrednio hamują tworzenie leukotrienów przy udziale lipooksygenazy. W obecności lipokortyn zmniejsza się zdolność monocytów i neutrofilów do chemotaksji i fagocytozy;
 - zmniejszają ekspresję na powierzchni komórek cząsteczek MHC oraz cząsteczek adhezyjnych, np. ICAM czy selektyna E;

- w klinice są wykorzystywane w leczeniu chorób autoimmunologicznych i w zapobieganiu odrzucania przeszczepów narządowych;
- objawy uboczne GS wiążą się z ich oddziaływaniem na metabolizm białek, węglowodanów i tłuszczów, powoduje, np. osteoporozę, cukrzycę, choroby układu krążenia, jaskrę, zwiększoną podatność na infekcje.



Rysunek 1. Stosowane glikokortykosteroidy [7]

Figure 1. Glicocorticosteroids used in clinic [7]

- **Inhibitory kalcyneuryny – hamują działanie fosfatazy kalcyneuryny powodując obniżenie produkcji IL-2 i innych cytokin**

- **Cyklosporyna A (CsA) 3 (Rys. 2) [11, 12]:**

- cykliczny undekapeptyd wytwarzany przez grzyb *Tolypocladium inflatum*;
- CsA jest lekiem z wyboru w transplantologii;
- CsA hamuje komórkowe i humoralne reakcje immunologiczne i modyfikuje reakcje zapalne;
- posiada ona zdolność do wybiórczego i odwracalnego hamowania odpowiedzi komórkowej przez zablokowanie aktywacji limfocytów T-pomocniczych;
- hamuje produkcję IL-2, IL-3, IL-4, INF- γ , GM-CSF, proliferację limfocytów T w odpowiedzi na mitogeny takie jak: PHA, MLR i DTH;
- CsA hamuje aktywację limfocytów T cytotoksycznych; w obecności IL-4 limfocyty te stają się jednak odporne na immunosupresyjne działanie CsA;
- opisano również bezpośrednie działanie CsA na komórki prezentujące antygen, bazofile, limfocyty B, jak również na różnicowanie limfocytów T w grasicy;
- istnieją doniesienia o spadku aktywności komórek NK pod wpływem CsA [13];
- CsA jest niezbędna we wczesnym etapie aktywacji limfocytów T (G_0 , wczesna G_1) dla wywołania efektu hamującego; etap aktywacji komórki wrażliwy na działanie CsA jest późniejszy niż wzrost wewnątrzkomórko-

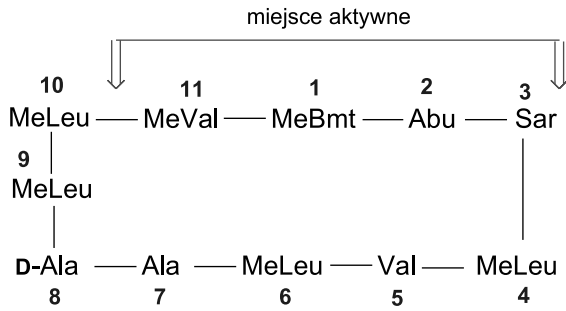
wego stężenia Ca^{+2} ; CsA nie jest lekiem, który w sposób znaczący hamuje wczesne etapy aktywacji limfocytów, a jej efekty nie są widoczne tuż po podaniu. Ze względu na hamowanie ścieżki sygnałowej zależnej od kalcyneuryny działanie CsA rozwija się w ciągu dni-tygodni, a dla utrzymania aktywności supresyjnej jej poziom musi być w sposób ciągły monitorowany w surowicy biorcy przeszczepów;

- CsA wiąże się z cyklofiliną, białkiem cytoplazmatycznym limfocytów T; kompleks CsA-cyklofilina wiąże kalcyneurynę, uniemożliwiając jej aktywację czynnika transkrypcyjnego pobudzającego transkrypcję IL-2;
- użycie wysokich dawek CsA jest w dużym stopniu limitowane przez jej nefrotoksyczność i działanie hipertensyjne; istnieją doniesienia o zwiększonym ryzyku zakrzepicy oraz tendencjach do krwawienia w wyniku toksycznego działania na śródbłonek; opisano również częstsze występowanie chłoniaków u pacjentów po terapii CsA;
- CsA była testowana także w terapii chorób autoimmunologicznych: reumatoidalnego zapalenia stawów (rzadko stosowana i raczej w ciężkich postaciach) [14], cukrzycy typu I (nie jest używana, brak poprawy i skutki uboczne), astmy (nie jest używana, brak poprawy i skutki uboczne), łuszczycy (stosowana w ciężkich postaciach) [15], zapalenia jagodówki (jest stosowana) [16];
- CsA posiada również aktywność przeciwgrzybiczą i przeciw pasożytniczą, które są niezależne od aktywności immunosupresyjnych.

Opisano także, że CsA okazała się inhibitorem oporności wielolekowej MDR zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo* [17, 18].

Wśród syntetycznych pochodnych CsA na uwagę zasługuje (Val²)-dihydrocyklosporyna, która jest nieskuteczną w zapobieganiu odrzucania przeszczepu, efektywna natomiast w leczeniu przewlekłych stanów zapalnych, jednak jej silna hepatotoksyczność i działanie hipertensyjne spowodowały przerwanie badań klinicznych.

Za aktywność immunosupresyjną CsA odpowiada pierwszy dziewięcio-węglowy aminokwas – butenylometylo-L-treonina [*N*-4-dimetylo-4(*R*)-(2(*E*)-butenyl)-L-treonina, MeBmt]. Obecność *trans* podwójnego wiązania C=C i podstawnika hydroksylowego w łańcuchu bocznym MeBmt są korzystnymi miejscami do modyfikacji cząsteczki. Dlatego większość projektowanych analogów CsA polega właśnie na modyfikowaniu łańcucha bocznego tego aminokwasu. W 2009 roku Yang i in. [19] opublikowali otrzymanie ketonu metylo-winyłowego cyklosporyny (Cs-MVK) **34** (Schemat 1).



MeBmt - *N*-4-dimetylo-4(*R*)-[2(*E*)-butenylo]-*L*-treonina

Abu - kwas *L*-2-aminobutanowy

Sar - sarkozyna (*N*-metyloglicyna)

MeLeu - *N*-metylo-*L*-leucyna

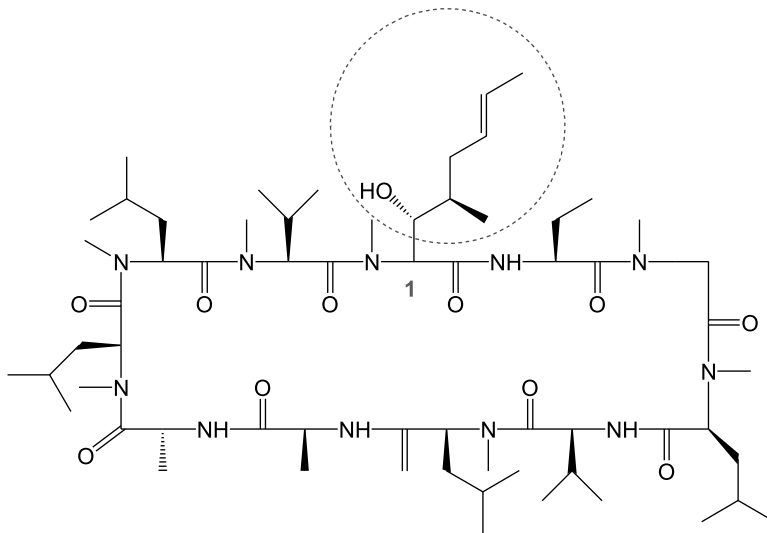
Val - *L*-walina

Ala - *L*-alanina

D-Ala - *D*-alanina

MeVal - *N*-metylo-*L*-walina

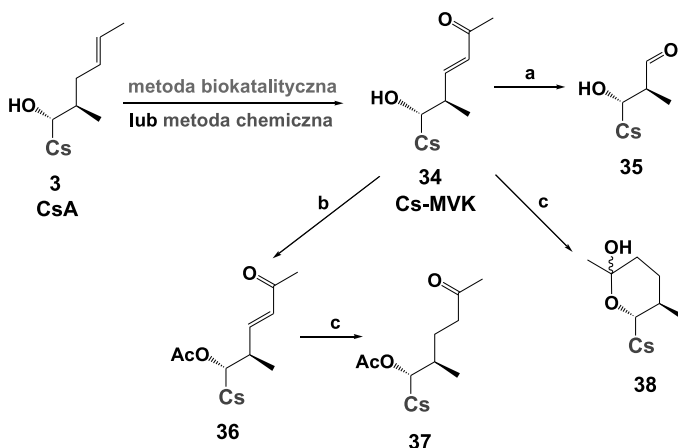
3



Cyklosporyna A (CsA)

Rysunek 2. Struktura cyklosporyny A (CsA) [19]

Figure 2. Structure of cyclosporine A (CsA) [19]



metoda biokatalityczna: lakaza, HOBt, eter *t*-butylowo-metylowy, bufor pH 5.6

metoda chemiczna: 70% wodoronadtlenek *t*-butylowy, KIO₄, eter koronowy (18-crown-6), aceton, benzen, woda, temp.pok.

a: O₃, CH₂Cl₂, -78°C, 20 min; Me₂S, -78°C do temp. pok.

b: Ac₂O, pirydyna, DMAP, CH₂Cl₂, temp. pok.

c: H₂, 10% Pd/C, MeOH, temp. pok.

Schemat 1. Otrzymywanie ketonu metylowo-winylowego CsA [19]

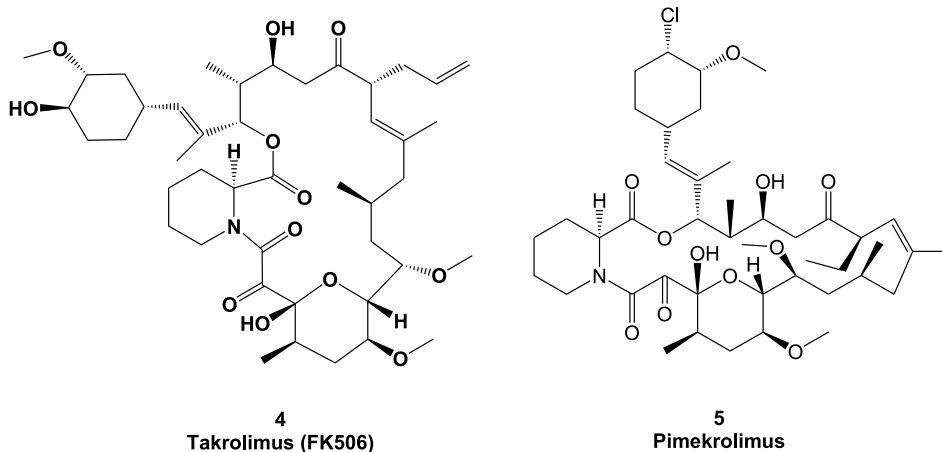
Scheme 1. Synthesis of methyl-vinyl ketone CsA [19]

Zaproponowano drogę syntezy metodą biokatalityczną wykorzystującą enzym lakazę w obecności mediatora HOBt otrzymując produkt z dobrą wydajnością, który potwierdzono metodą chemicznego utlenianie z zastosowaniem wodoronadtlenku *t*-butylowego (*t*-BuOOH) i nadjodanu potasu (KIO₄) (Schemat 1). Cs-MVK jest uniwersalnym intermedialem, który może być wykorzystany do otrzymywania nowych analogów cyklosporyny o potencjalnej aktywności immunosupresyjnej **35–38**.

Takrolimus (FK506) 4 (Rys. 3) [20]:

- makrolid wyizolowany w 1984 roku z grzyba *Streptomyces tsukabaensis*;
- mechanizm działania polega na hamowaniu aktywności kalcyneuryny, a przez to również transkrypcji genów dla cytokin (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, INF- γ , TNF- α , GM-CSF);
- aktywny immunosupresyjnie w stężeniach znacznie niższych niż CsA;
- podobnie jak CsA hamuje jedynie te systemy przekaźnikowe, które są związane ze wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia Ca⁺²;
- wykazuje silne działanie synergistyczne z niskimi dawkami CsA;
- takrolimus podobnie jak pimekrolimus **5** (Rys. 3) (pochodna askomycyny
- selektywny inhibitor cytokin prozapalnych wytwarzanych przez aktywowane limfocyty T i komórki tuczne) są niesteroidowymi lekami immunosupresyjnymi do miejscowego stosowania w stanach zapalnych skóry, m.in. w zespole atopowego zapalenia skóry (ZAZS), w alergicznym kontaktowym zapaleniu skóry oraz w przewlekłym kontaktowym zapaleniu

skóry rąk. Leki te w 2003 roku zostały zarejestrowane w Polsce pod nazwami Elidel (pimekrolimus) i Protopic (takrolimus) [21].



Rysunek 3. Struktura takrolimusu 4 i pimekrolimusu 5 [20, 21]

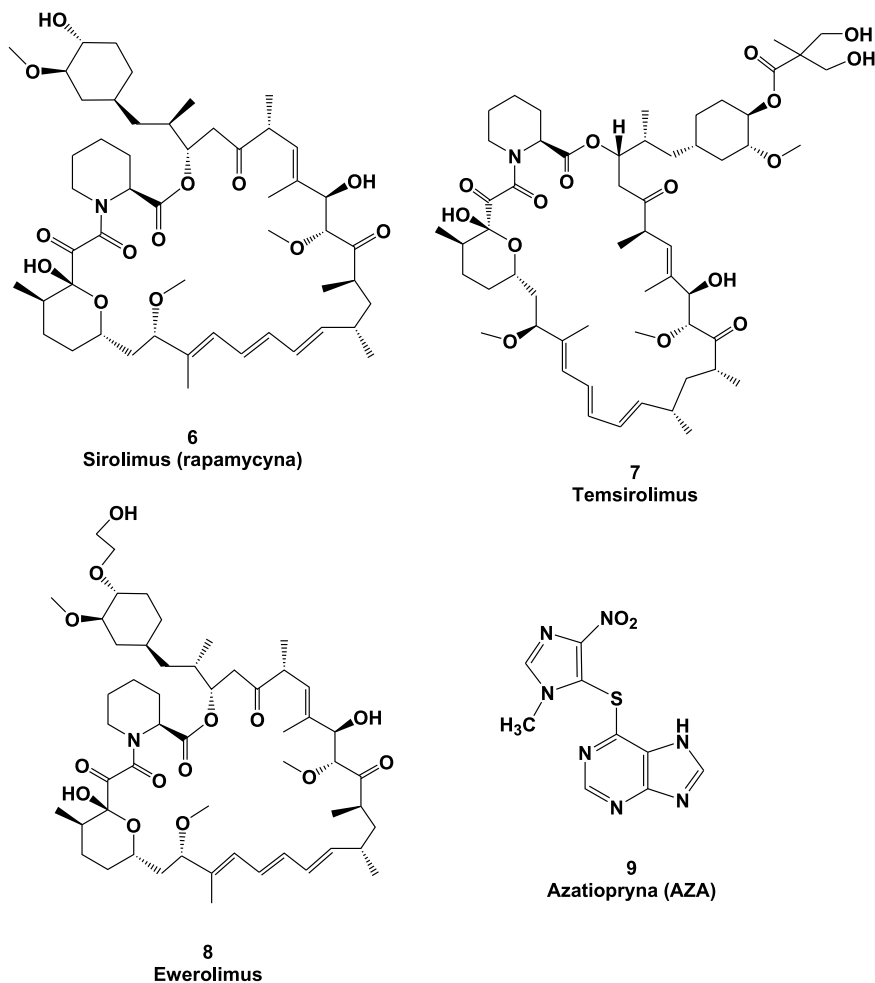
Figure 3. Structures of tacrolimus 4 and pimecrolimus 5 [20, 21]

- **Inhibitory TOR** – inhibitory szlaku PI3-K/Akt (inhibitory m-TOR)
 - rapamycyna, temsirolimus, everolimus – inhibitory kinazy serynowo-treoninowej m-TOR (ang. *mammalian target of rapamycin*), należącej do szlaku PI3-K, mającego wpływ na kontrolę wzrostu i przeżywalności komórek. Kinaza m-TOR bierze udział w regulacji inicjacji translacji, transkrypcji i procesu degradacji białek. Zablokowanie m-TOR uniemożliwia komórce przejście z fazy G_1 do S.

Sirolimus (Rapamycyna) 6 (Rys. 4) [22, 23]:

- naturalny antybiotyk makrolidowy produkowany przez szczep bakterii z gatunku *Streptomyces higroscopicus*;
- nie hamuje ona produkcji IL-2, lecz blokuje odpowiedź limfocytów T na egzogenną IL-2 lub IL-4 (etap niewrażliwy na FK506 i CsA);
- w odróżnieniu od FK506 i CsA, działających na granicy faz G_0 i G_1 , blokuje ona progresję komórki w cyklu komórkowym w fazie G_1 ;
- CsA wzmacnia efekt immunosupresyjny rapamycyny.

Obecnie prowadzonych jest wiele badań dotyczących zastosowania rapamycyny w leczeniu nowotworów, np. w terapii raka nerki badano rozpuszczalną w wodzie pochodną – CCI-779 (temsirolimus) 7 (Rys. 4).



Rysunek 4. Inhibitory TOR **6-8** oraz lek antyproliferacyjny – AZA **9**

Figure 4. TOR inhibitors **6-8** and antiproliferative drug – AZA **9**

Ewerolimus (everolimus, pochodna rapamycyny) 8 (Rys. 4) [24]:

- stosowany w transplantologii w zapobieganiu odrzucania przeszczepu;
- działając na limfocyty prowadzi do zahamowania ich proliferacji i ekspansji klonalnej;
- mechanizm działania opiera się na inhibicji białka kinazy m-TOR (FRAP), mającego wpływ na procesy wzrostu i proliferacji komórek;
- działa na proliferację komórek stymulowaną czynnikami wzrostu, w tym miocytów gładkich ściany naczyń krwionośnych;
- w porównaniu z rapamycyną ma większą biodostępność i krótszy okres półtrwania; działa synergistycznie z CsA (pozwala to na zmniejszenie

dawki CsA przy zachowanej skuteczności, np. w zapobieganiu ostremu odrzucaniu przeszczepu nerki).

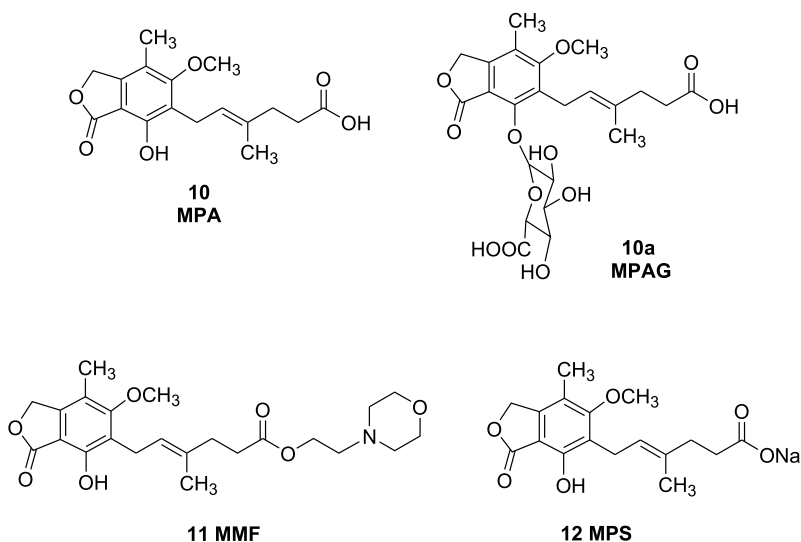
1.2. LEKI ANTYPROLIFERACYJNE (LEKI HAMUJĄCE PODZIAŁY KOMÓRKOWE)

Azatiopryna (AZA) 9 (Rys. 4) [25]:

- imidazolowa pochodna 6-merkaptopuryny (jeden z pierwszych leków immunosupresyjnych stosowanych w klinice, przez wiele lat w połączeniu z GS był standardem w zapobieganiu odrzucania przeszczepu, w 1978 roku została zastąpiona CsA);
- w organizmie ulega przemianie do kwasu 6-tioinozynowego, który zastępuje cząsteczki zasad purynowych prowadząc do zahamowania syntezy kwasów nukleinowych w limfocytach stymulowanych antygenem;
- działa głównie na komórki dzielące się, hamuje proliferację limfocytów T oraz w mniejszym stopniu także limfocytów B;
- stosowany przede wszystkim w profilaktyce odrzucania przeszczepów, znajduje także zastosowanie w leczeniu niektórych chorób autoimmunizacyjnych;
- poważnym efektem ubocznym jest hamowanie funkcji szpiku, a także jego hepatotoksyczność.

Mykofenolan mofetylu 11 i sól sodowa kwasu mykofenolowego 12 (Rys. 5) [26–30]:

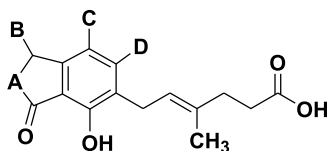
Kwas mykofenolowy (MPA) 10 – inhibitor IMPDH, blokuje syntezę puryn *de novo*, a w rezultacie nukleotydów guanozynowych i powoduje obumieranie limfocytów T. W 1995 roku ester morfolinowy kwasu mykofenolowego – mykofenolan mofetylu (MMF) **11** został zatwierdzony przez Amerykańską Agencję ds. Żywności 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 **12** (MPS, Myfortic[®], Novartis Farma AG). Zarówno MMF jak i MPS stosuje się w połączeniu z innymi immunosupresantami, takimi jak kortykosteroidy, cyklosporyna, czy takrolimus. Nie udało się jednak całkowicie wyeliminować ryzyka odrzucania przeszczepu oraz efektów ubocznych takich jak: biegunka, wymioty, nudności, łysienie, podwyższone ryzyko infekcji.



Rysunek 5. Struktura kwasu mykofenolowego **10**, koniugatu z kwasem glukuronowym **10a**, mykofenolanu mofetylu **11** oraz soli sodowej MPA **12** [26]

Figure 5. Structures of mycophenolic acid **10**, conjugate with glucuronic acid **10a**, mycophenolate mofetil **11** and sodium salt of mycophenolic acid **12** [26]

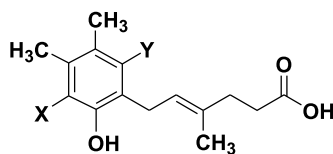
Wykazano, że dla zachowania biologicznej aktywności MPA niezbędna jest obecność w cząsteczce fenolowej grupy hydroksylowej oraz grupy metylowej związanej z pierścieniem aromatycznym. Zsyntetyzowano szereg analogów MPA, np. **13–16** (Rys. 6) w celu wyeliminowania szkodliwych efektów ubocznych terapii z jego udziałem [31–34]. Otrzymane dotychczas analogi m.in. zawierające różne cykliczne ugrupowania **13**, monocykliczne fenole **14** i niefenolowe analogi **15** oraz monocykliczne aminy **16**, poza nielicznymi wyjątkami, odznaczają się gorszymi właściwościami farmakologicznymi niż sam kwas mykofenolowy. Zastąpienie w pierścieniu aromatycznym grupy metoksylovej etylową lub winylową prowadzi do silniejszych inhibitorów IMPDH w porównaniu z MPA, a zastąpienie laktonowego pierścienia innym cyklicznym fragmentem powoduje utratę aktywności. Pochodne, w których wiązanie podwójne o konfiguracji *trans* zostało zastąpione różnymi grupami czy wprowadzenie do łańcucha bocznego heteroatomu prowadziły do znaczącego spadku aktywności albo całkowitej jej utraty.



13

zawierające różne cykliczne ugrupowania

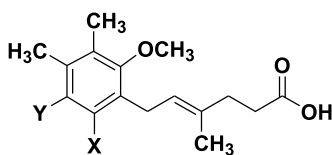
- np. a. A = S; B = H; C = CH₃; D = OCH₃
 b. A = NH; B = H; C = CH₃; D = OCH₃
 c. A = CH₂; B = H; C = CH₃; D = OCH₃
 d. A = O; B = H; C = CH₃; D = OH



14

monocykliczne fenole

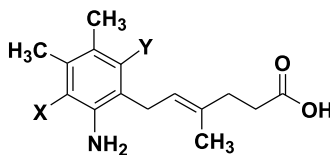
- np. a. X = H; Y = OCH₃
 b. X = CH₃; Y = OCH₃
 c. X = F; Y = OCH₃
 d. X = Cl; Y = OCH₃



15

niefenolowe analogi

- np. a. X = H; Y = Cl
 b. X = H; Y = Br
 c. X = H; Y = NO₂
 d. X = H; Y = NH₂



16

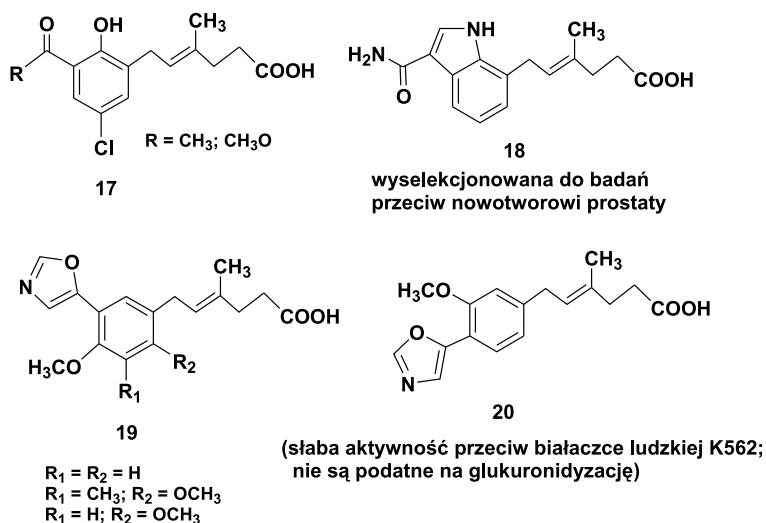
monocykliczne aminy

- np. a. X = H; Y = CH₃
 b. X = Br; Y = CH₃
 c. X = Br; Y = OCH₃
 d. X = CN; Y = OCH₃

Rysunek 6. Przykładowe analogi MPA [26]

Figure 6. Examples of MPA analogs [26]

MPA i jego pochodne, np. **17–20** (Rys. 7) były również testowane klinicznie w różnych typach nowotworów jednak bez znaczących sukcesów. Główną przyczyną niepowodzeń było tworzenie się koniugatów z kwasem glukuronowym **10a** (Rys. 5) co utrudniało utrzymanie odpowiedniego stężenia leku dla wykazania aktywności przeciwnowotworowej.



Rysunek 7. Analogi MPA o aktywności przeciwnowotworowej [26]

Figure 7. MPA analogs with anticancer activity [26]

1.3. PRZECIWCIAŁA POLIKLONALNE, MONOKLONALNE PRZECIWCIAŁA SKIEROWANE WOBEC RECEPTORÓW IL-2 (ANTY CD25) ORAZ PRZECIWCIAŁA SKIEROWANE PRZECIWM LIMFOCYTOM CD52 I CD20

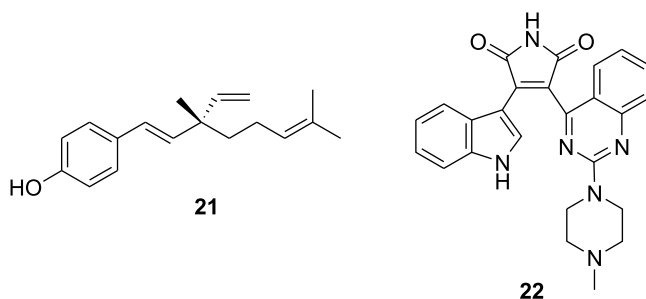
Najważniejsze stosowane przeciwciała monoklonalne: daklizumab (humanizowane przeciwciało monoklonalne przeciwko receptorowi IL-2), bazyliksymab (chimeryczne ludzko-mysie przeciwciało przeciwko łańcuchowi alfa receptora dla IL-2) to przeciwciała hamujące działanie szlaków sygnałowych zależnych od IL-2. Druga grupa to przeciwciała lityczne, których funkcja polega na zabijaniu limfocytów. Do tej grupy należą muromonab-CD3 (mysie przeciwciało monoklonalne przeciwko antygenowi CD3 limfocyta T), rituximab (chimeryczne przeciwciało przeciw antygenowi CD20 limfocytów B), alemtuzumab (CAMPATH – humanizowane przeciwciało monoklonalne przeciw antygenowi CD52 obecnemu na wszystkich limfocytach) oraz poliklonalne królicze lub końskie surowice antylimfocytarne (tymoglobulina i ATG) [35].

2. NOWE POTENCJALNE LEKI IMMUNOSUPRESYJNE

Ze względu na liczne efekty uboczne (nefrotoksyczność, neurotoksyczność, zwiększenie ryzyka infekcji, cukrzyca będąca efektem leczenia po transplantacji, nadciśnienie, hiperlipidemia) poszukuje się nowych leków immunosupresyjnych.

2.1. BAKUCHIOL I JEGO POCHODNE

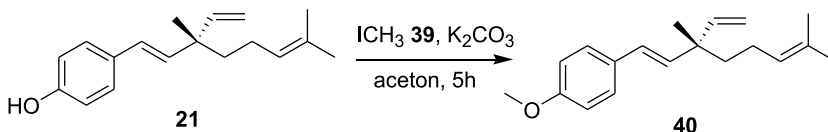
Bakuchiol **21** (Rys. 8) jest terpenem izolowanym z nasion *Psoralea corylifolia* L [36]. Lecznicze działanie tego związku jest wykorzystywane w indyjskiej oraz chińskiej medycynie ludowej i wiąże się z jego aktywnością antybakteryjną, antyoksydacyjną. Ostatnio badano również właściwości immunosupresyjne bakuchiolu i jego pochodnych.



Rysunek 8. Struktura bakuchiolu **21** [36] i sotrastauryny **22** [37]
Figure 8. Structures of bakuchiol **21** [36] and sotrastaurine **22** [37]

Nie stwierdzono znaczącego wpływu konfiguracji na chiralnym atomie węgla oraz geometrii wiązania podwójnego w części alifatycznej na aktywność immunosupresyjną. Niektóre modyfikacje struktury bakuchiolu mają wyraźny wpływ na inhibicję limfocytów w testach *in vitro*. Okazało się, że:

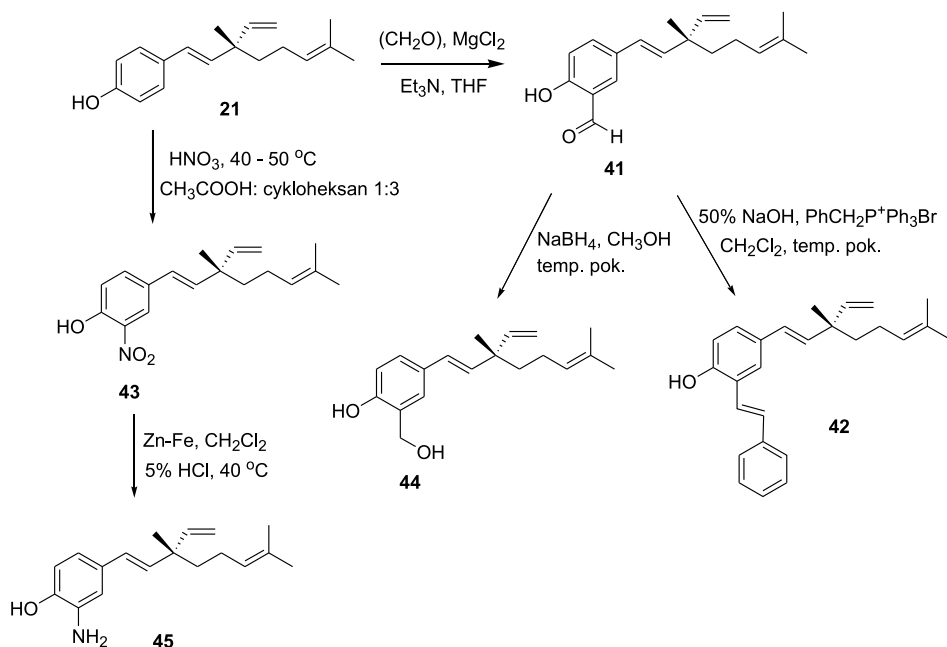
1. zastąpienie grupy hydroksylowej w pierścieniu fenylovym grupą metoksyłową (**40**) zwiększa właściwości immunosupresyjne. *O*-Alkilowanie bakuchiolu **21** przeprowadzono jodkiem metylu **39** w obecności zasady (Schemat 2);



Schemat 2. *O*-Metylowanie bakuchiolu [36]
Scheme 2. *O*-Methylation of bakuchiol [36]

2. wprowadzenie w pozycji *orto* grupy sprzęgającej się z elektronami π pierścienia aromatycznego (**41**, **42**) zwiększa działanie immunosupresyjne, z wyjątkiem pochodnej nitrowej **43** (Schemat 3). Przekształcenia syntetyczne polegały na formylowaniu pierścienia fenolowego **21** w obecności chlorku magnezu (**41**), reakcji Wittiga (**42**) oraz mononitrowania (**43**);

3. wprowadzenie grupy elektronodonorowej (**44**, **45**) nie wpływa znacząco na działanie immunosupresyjne (Schemat 3). Synteza związków **44**, **45** obejmuje redukcję aldehydu **41** oraz pochodnej nitrowej **43**.



Schemat 3. Modyfikacje syntetyczne bakuchiolu [36]

Scheme 3. Synthetic modifications of bakuchiol [36]

2.2. SOTRASTAURYNA (AEB071)

Sotrastauryna **22** (Rys. 8) jest selektywnym inhibitorem kinazy białkowej C [37–39]. Kinazy białkowe C należą do rodziny kinaz serynowo-treoninowych (fosforylujących reszty serynowe i treoninowe). Pełnią one istotną rolę w regulacji układu immunologicznego i aktywacji komórek T.

Badania aktywności biologicznej wykazały, że mechanizm jest inny aniżeli w przypadku cyklosporyny A i sugerują inhibicję wczesnej aktywacji komórek T.

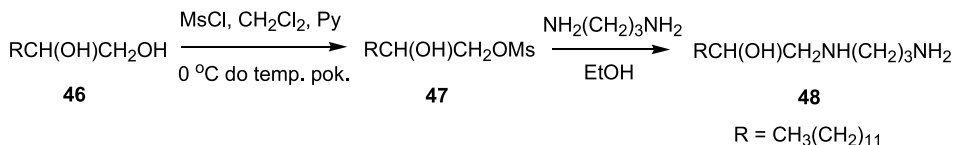
Lek immunosupresyjny oparty na sotrastauryinie jest obecnie opracowywany przez firmę Novartis. Przeprowadzono II fazę badań klinicznych na zdrowych ochotnikach i po przeszczepie nerki, w połączeniu z takrolimusem i solą sodową kwasu mykofenolowego. Próby te zostały przerwane ze względu na pojawianie się ostrego odrzucania przeszczepu. Planuje się badania kliniczne sotrastauryiny w połączeniu z ewerolimusem.

Przy pomocy sotrastauryiny uzyskano obiecujące wyniki w leczeniu łuszczycy. Lek był dobrze tolerowany podczas 2 tygodni doustnego podawania. Odnotowano jednak efekty uboczne, takie jak: ból głowy, wymioty, biegunka. Badania nad stosowaniem sotrastauryiny jako leku immunosupresyjnego wciąż trwają.

2.3. LIPOFILOWE AMINOALKOHOLE I DIAMINY

Lipofilowe aminoalkohole i diaminy opisano w literaturze jako związki o działaniu przeciwpasożytniczym, przeciwbakteryjnym oraz immunomodulacyjnym [40].

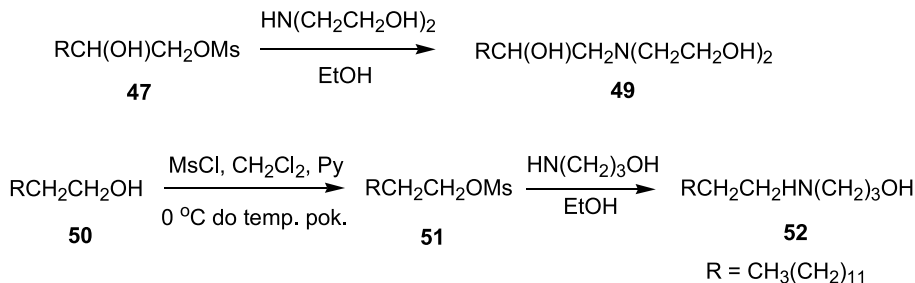
Niżej przedstawiona pochodna **48** (Schemat 4) jest przykładem substancji wykazującej działanie immunosupresyjne w testach *in vitro*. Związek ten otrzymano z diolu **46**, którego pierwszorzędową grupę hydroksylową selektywnie sulfonowano za pomocą chlorku metylosulfonowego [40]. Następnie grupa metylosulfonowa związku **47** ulega podstawieniu w reakcji z odpowiednią diaminą do produktu **48**.



Schemat 4. Synteza lipofilowych diamin [40]

Scheme 4. Preparation of lipophilic diamines [40]

Otrzymano również aminoalkohole **49**, **52** (Schemat 5), które okazały się obiecującymi immunosupresantami w testach DTH względem OVA, czyli hamujących nadwrażliwość typu późnego. Warto zwrócić uwagę na fakt, iż takie pochodne mogą okazać się bardzo obiecujące, gdyż przykładem nadwrażliwości typu późnego jest reakcja odrzucania gospodarza (GVDH), która to stanowi poważny problem w transplantologii. Aminoalkohol **49** otrzymano działając na substrat **47** etanoloaminą, z kolei produkt **52** uzyskano z alkoholu **50** poprzez reakcję podstawienia estru kwasu metylosulfonowego **51** 3-aminopropanolem [40].



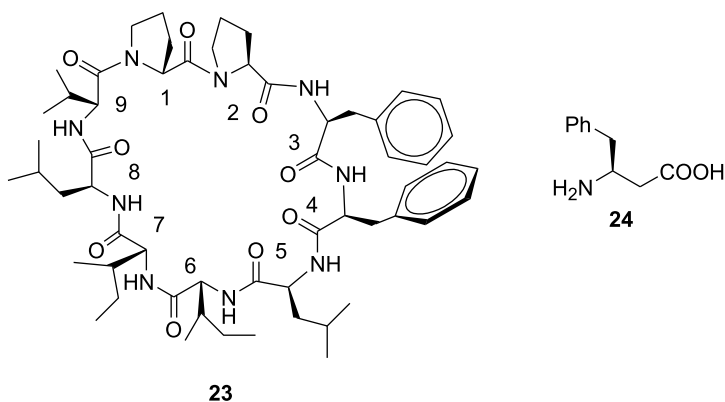
Schemat 5. Synteza lipofilowych aminoalkoholi [40]

Scheme 5. Preparation of lipophilic aminoalcohols [40]

2.4. CYKLOLINOPEPTYD A – INHIBITOR IL-1 I IL-2

Cyklolinopeptyd A **23** (Rys. 9) jest cyklicznym nonapeptydem wyizolowanym z oleju lnianego. Związek ten posiada silne właściwości immunosupresyjne. Badania aktywności biologicznej pochodnych cyklolinopeptydu A wykazały, że dla zachowania działania immunosupresyjnego istotne są następujące elementy strukturalne: obecność sekwencji Pro¹-Pro²-Phe³-Phe⁴, geometria *cis* wokół wiązania amidowego Pro¹-Pro² oraz oddziaływania typu krawędź–powierzchnia pomiędzy pierścieniami aromatycznymi reszt Phe.

Najnowsze badania wykazały, że aktywność immunosupresyjną porównywalną do cyklosporyny A posiadają także liniowe analogi nonapeptydu, jak również pochodne zawierające jednostki β-feniloalaniny **24** (Rys. 9) zamiast fenyloalaniny [41]. Dodatkowa grupa metylenowa powoduje znaczące zmiany w konformacji cząsteczki i nie wykazuje ona oddziaływania typu krawędź–powierzchnia pomiędzy pierścieniami aromatycznymi. Natomiast geometria *cis* wokół wiązania amidowego Pro¹-Pro² pozostaje zachowana w *c*(Ile⁶-Ile⁷Leu⁸-Val⁹-Pro¹-Pro²-β³Phe³-Phe⁴-Leu⁵) [41].



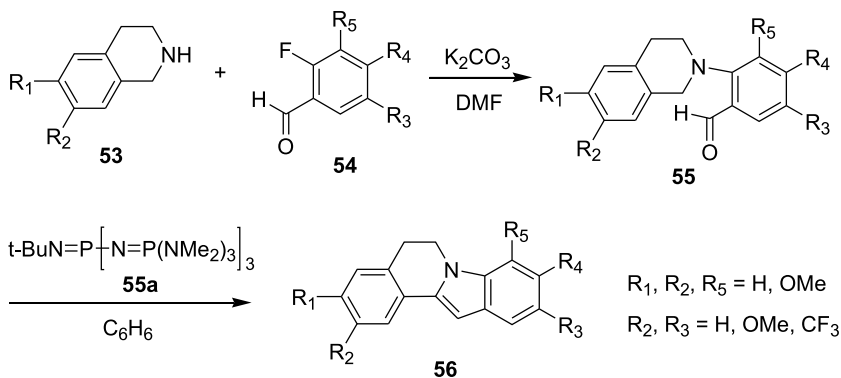
Rysunek 9. Struktura cyklolinopeptydu A **23** i β-feniloalaniny **24** [41]

Figure 9. Structures of cyclolinopeptide A **23** and β-phenylalanine **24** [41]

2.5. POCHODNE 5,6-DIHYDROINDOLO[2,1-α]IZOCHINOLINY

Pochodne typu **56** (Schemat 6) są inhibitorami IL-2, IL-10 oraz IFN-γ. Badania wykonano na komórkach mysiej śledziony zainfekowanych wirusem grypy. IL-2 jest produkowana głównie przez komórki pomocnicze T i podczas infekcji grypowej pełni istotną rolę w aktywacji komórek T. Wszystkie z otrzymanych pochodnych wykazały znaczące działanie immunosupresyjne, a także obniżenie żywotności komórek, co może wiązać się z hamowaniem produkcji cytokin. Testy żywotności prowadzono w hodowlach komórek śledziony niezainfekowanych myszy [42].

Substratem w syntezie **56** są pochodne 1,2,3,4-tetrahydroizochinoliny **53**, które reagują z fluorkami aromatycznymi **54** dając aldehyd **55**. Następnie związek **55** w obecności fosfazyny **55a** (zasada o bardzo dużym zatłoczeniu sterycznym) ulega cyklizacji do **56**. Na uwagę zasługuje fakt, iż zastosowanie takich zasad jak: *t*-BuOK, LDA, Li-TMP, KH nie dawało produktu cyklizacji [42].



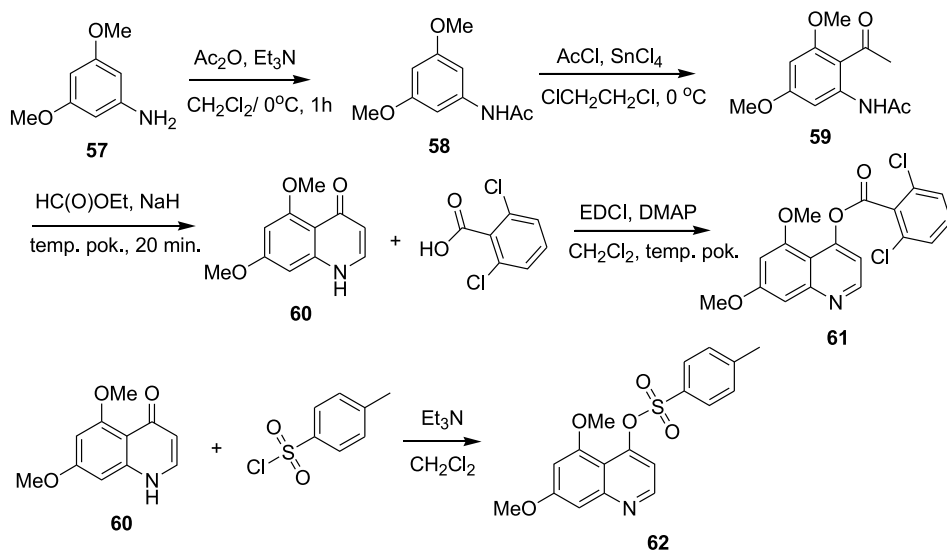
Schemat 6. Otrzymywanie pochodnych 5,6-dihydroindolo[2,1-a] izochinoliny [42]

Scheme 6. Synthesis of derivatives of 5,6-dihydroindolo[2,1-a] isoquinolines [42]

2.6. POCHODNE CHINOLINY

Znane są liczne przykłady naturalnych związków heterocyklicznych zawierających w swojej strukturze szkielet chinoliny, a posiadające właściwości przeciwmalaryczne, przeciwzapalne, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwnowotworowe. Pochodne **61**, **63** (Schemat 7) wykazują działanie immunosupresyjne w stopniu porównywalnym z cyklosporyną A [43].

Badania wykonano metodą testu kolorymetrycznego MTT, gdzie proliferację limfocytów T indukowano konkanawaliną A. Związki te otrzymywano z 3,5-dimetoksyaniliny **57**, którą w pierwszym etapie poddano *N*-acylowaniu do **58**, a następnie acylowaniu w pierścieniu aromatycznym. Kolejny etap polega na formylowaniu ketonu **59** przy użyciu mrówczanu etylu i cyklizacji do 5,7-dimetoksychinolin-4(1*H*)-onu **60**. 2,6-Dichlorobenzoesan 5,7-dimetoksychinolin-4-ylu **61** otrzymano w reakcji sprzęgania pochodnej **60** z kwasem 2,6-dichlorobenzoesowym. Z kolei traktowanie **60** chlorkiem *p*-toluenosulfonowym prowadzi do *p*-toluenosulfonianu 5,7-dimetoksychinolin-4-ylu **62** [43].

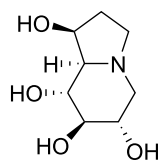


Schemat 7. Synteza pochodnych chinoliny [43]

Scheme 7. Synthesis of quinoline derivatives [43]

2.7. POCHODNE IMINOCUKRÓW

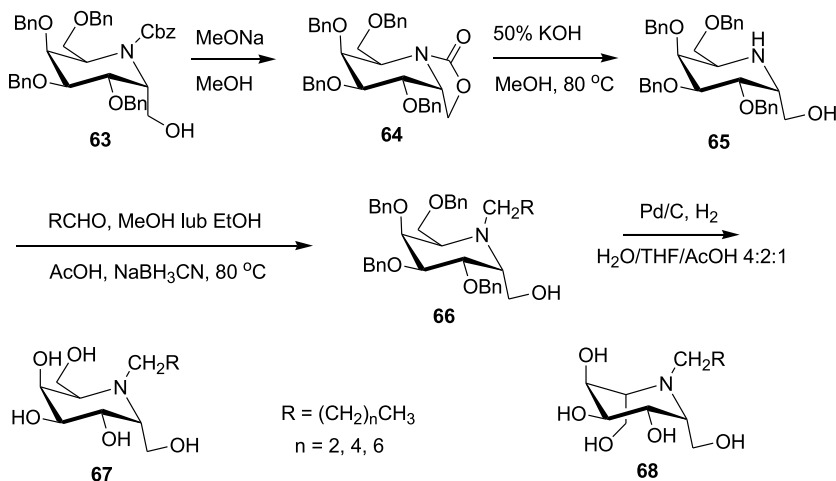
Iminocukrowe pochodne uważane są niekiedy za „cukrowe alkaloidy”. Niektóre z tych związków są inhibitorami enzymów regulujących metabolizm węglowodanów (glikozydazy, glikozylotransferazy). Z uwagi na fakt, iż takie enzymy biorą udział w ważnych procesach biologicznych, pochodne iminocukrów są związkami o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym, przeciwwirusowym, przeciwcukrzycowym. W literaturze naukowej niewiele jest danych na temat właściwości immunosupresyjnych tego typu pochodnych. Kastanospermina **25** (Rys. 10) jest jednym z niewielu zbadanych cukrowych alkaloidów, który wykazuje właściwości immunosupresyjne [44].


25

Rysunek 10. Struktura kastanosperminy [44]

Figure 10. Structure of castanospermine [44]

Jak dotąd otrzymano i zbadano m.in. iminowe pochodne D-galaktozy **67** (Schemat 8). Spośród tej grupy związków aktywność immunosupresyjną najbardziej zbliżoną do cyklosporyny A wykazała pochodna zawierająca 6 atomów węgla w łańcuchu R ($n = 4$). Stwierdzono, że aktywność analogicznych pochodnych L-altozy **68** okazała się niższa aniżeli **67**, co wskazuje, że konfiguracja na węglu C6 ma istotne znaczenie. Ponadto wyniki tych eksperymentów sugerują, że hydrofobowy łańcuch alkilowy na atomie azotu jest istotny dla właściwości immunosupresyjnych tych pochodnych. Jednak dokładny mechanizm ich działania nie został do tej pory poznany. Badania przeprowadzono metodą MTT, polegały one na oznaczeniu proliferacji splenocytów u myszy wywoływanej konkanawaliną A, w obecności badanego związku.



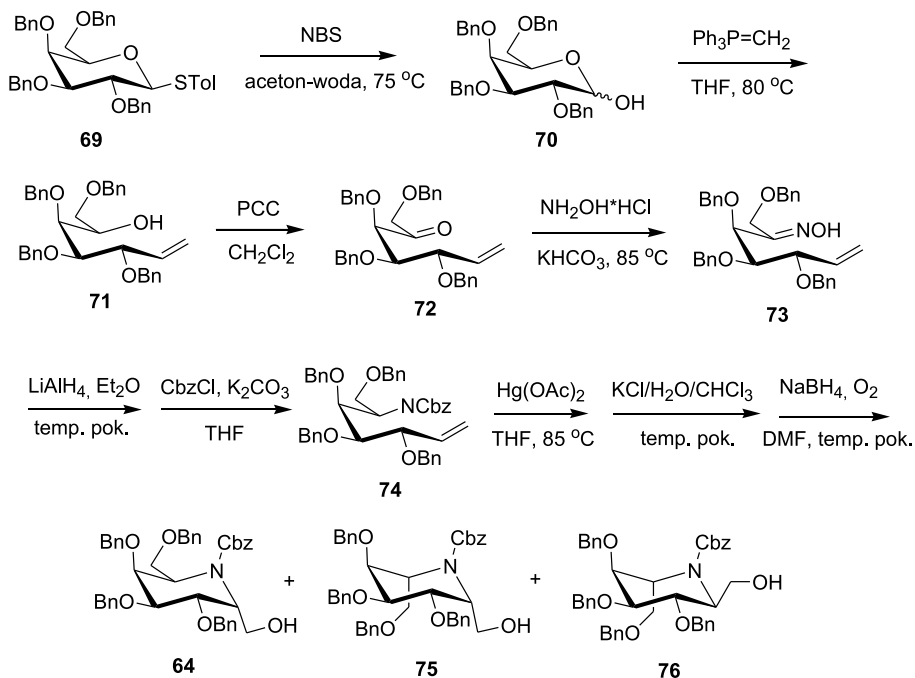
Schemat 8. Otrzymywanie iminowej pochodnej D-galaktozy **68** [45]

Scheme 8. Synthesis of the iminosugar derivative of D-galactose **68** [45]

Do syntezy iminowej pochodnej D-galaktozy **67** użyto alkoholu **63** posiadającego chronioną grupę aminową. Reakcja z metanolanem sodu powoduje podstawienie grupy benzyloksylowej w reszcie karboksybenzylowej przez metoksyl i cyklizację do laktonu **64**. Następnie hydroliza estru **64** daje alkohol **65** z niechronioną grupą aminową. Z kolei redukcyjna aminacja związku **65** prowadzi do trzeciorzędowej aminy **66**. Ostatnim etapem jest deprotekcja reszt alkoksylowych do związku **67** [45].

Wyjściowy alkohol **63** otrzymano w mieszaninie z dwoma innymi cyklicznymi izomerami **75**, **76** z odpowiedniego tioglikozydu **69** (Schemat 9). Grupę tiolową usuwa się w reakcji rodnikowej z NBS. Otrzymany w ten sposób hemiacetal **70** przeprowadzono z wykorzystaniem reakcji Wittiga w alken **71**, który to został utleniony do ketonu **72**. Związek ten traktowano hydroksyloaminą, a uzyskany w ten sposób oksym **73** redukowano glinowodorkiem litu a produkt redukcji traktowano chloromrówczanem benzyłu. Cyklizacja **74** zachodzi na skutek aminortęciowania,

następnie reakcji z NaBH_4 w obecności tlenu, co pozwoliło na otrzymanie trzech izomerycznych, dających się wyizolować alkoholi **63**, **75**, **76** z wydajnościami odpowiednio 26 %, 29 % i 10 %. Autorzy wyjaśnili brak czwartego możliwego izomeru stereoselektywnością reakcji aminortęciowania pochodnej **74** [46].

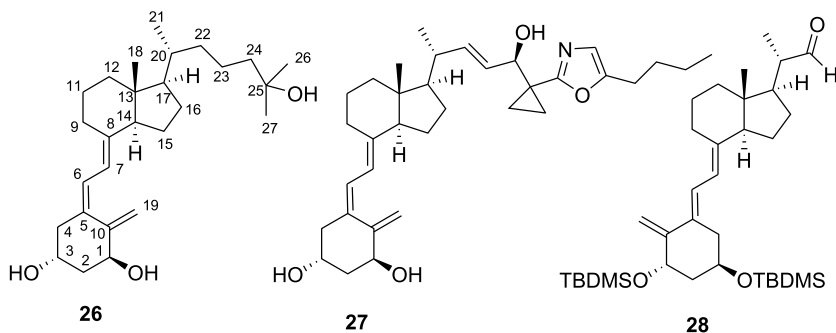


Schemat 9. Droga syntezy hydroksylowej pochodnej D-galaktozy **64** [46]

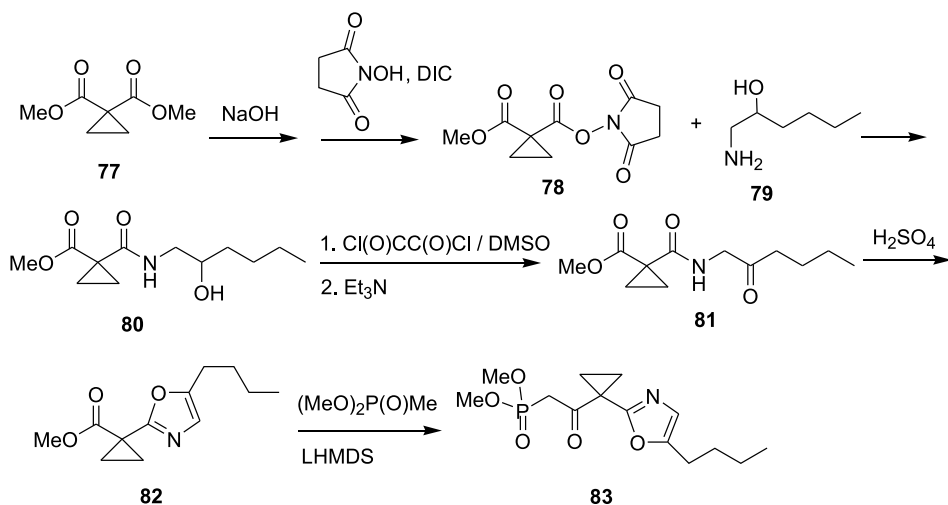
Scheme 9. Synthetic pathway to the hydroxyl derivative of D-galactose **64** [46]

2.8. POCHODNE WITAMINY D_3

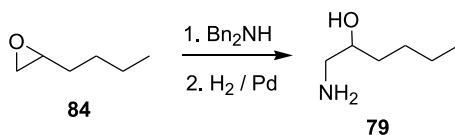
1,25-Dihydroksywitamina D_3 (kalcytriol) **26** (Rys. 11) jest związkiem charakteryzującym się znaczącą aktywnością immunosupresyjną zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo*. Jednak istotnym efektem ubocznym podczas stosowania kalcytriolu **26** jest hiperkalcemia, stąd przeprowadzono liczne jego modyfikacje strukturalne, w tym dotyczące budowy łańcucha bocznego. Pochodna **27** (ZK 191784) nie powoduje hiperkalcemii, ponadto związek ten jest obiecujący jako potencjalny lek przeciwko łuszczycy. Cząsteczka **27** zawiera w swojej strukturze łańcuch boczny z fragmentem 1,3-oksazolu.

Rysunek 11. Witamina D₃ i jej pochodne [47–49]Figure 11. Vitamin D₃ and its derivatives [47–49]

Substratem wyjściowym w syntezie ZK 191784 **27** była pochodna **28**, z kolei łańcuch boczny związku **27** otrzymano w następującej sekwencji reakcji (Schemat 10) [47–49].

Schemat 10. Synteza łańcucha bocznego pochodnej **83** (ZK 191784) [47]Scheme 10. Synthesis of side-chain of the derivative **83** (ZK 191784) [47]

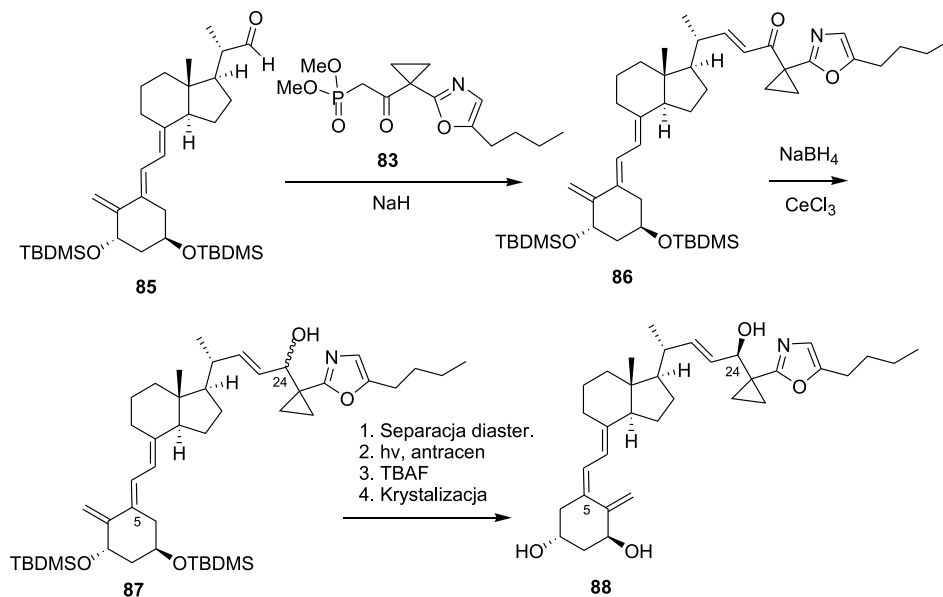
Cyklopropylowy analog malonianu dietylu **77** poddano selektywnej hydrolizie i sprzężeniu z HOSU w obecności DIC do aktywnego estru **78**. W kolejnym etapie **78** reaguje z 2-hydrokso(*n*-heksyloaminą) dając alkohol **80**, który to poddano utlenianiu Swerna. Tak otrzymany keton **81** cyklizuje pod wpływem kwasu do pochodnej oksazolu **82**. Następnie reakcja z estrem dimetylowym kwasu metanofosfonowego w obecności zasady prowadzi do produktu **83**. użytą w syntezie 2-hydrokso(*n*-heksyloaminę) **79** otrzymano w reakcji 1,2-epoksyheksanu **84** z dibenzylaminą, a następnie uwodornieniu w obecności katalizatora (Schemat 11).



Schemat 11. Otrzymywanie 2-hydroksy(*n*-heksyloaminy) [47]

Scheme 11. Preparation of 2-hydroxy(*n*-hexylamine) [47]

Tak otrzymaną pochodną oksazolu **83** połączono z **28** reakcji w warunkach reakcji Wittiga–Hornera (Schemat 12). Następnie keton **86** zredukowano do alkoholu, który to rozseparowano na dwa optycznie czyste diastereoizomery za pomocą chromatografii, uzyskując alkohol **87** o konfiguracji *S* na węglu 24. Drugi diastereoizomer (konfiguracja *R* na węglu 24) daje się utlenić do ketonu **86** za pomocą MnO_2 i ponownie przetwarzać w żądany alkohol **87** (S24). Fotochemiczna izomeryzacja **87** (S24) do *5Z* oraz deprotekcja obydwu grup hydroksylowych daje końcowy produkt **88**.

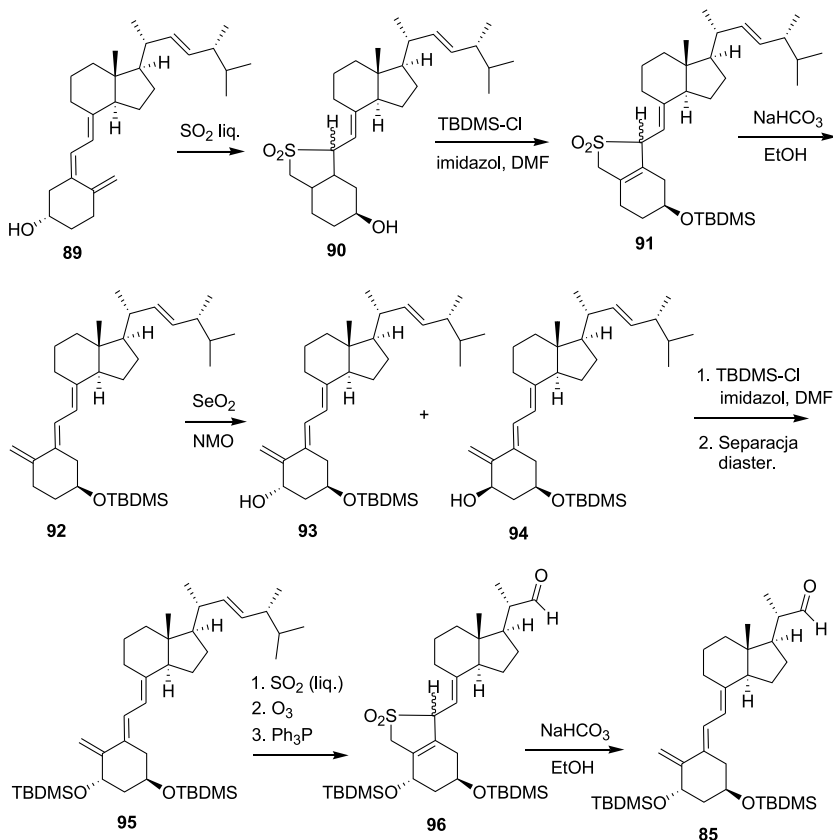


Schemat 12. Synteza pochodnej **88** (ZK 191784) [47, 49]

Scheme 12. Synthesis of the derivative **88** (ZK 191784) [47, 49]

Otrzymanie aldehydu **85** było również interesującym wyzwaniem syntetycznym (Schemat 13). W pierwszym etapie, witaminę D_2 **89** traktowano ciekłym ditlenkiem siarki. Powstały w tej reakcji cykliczny sulfon **90** posiada właściwie zorientowany pierścień cykloheksylowy. Grupę hydroksylową przekształcono w ester *tert*-butylo-dimetylosililowy, po czym grupę sulfonową zdjęto poprzez ogrzewanie **91** z $NaHCO_3$ we wrzącym etanolu. W celu wprowadzenia drugiego podstawnika hydroksylowego, pochodną **92** utleniało ditlenkiem selenu w obecności *N*-tlenku *N*-metylomorfoliny.

W tej reakcji powstają dwa diastereoizomeryczne produkty **93** i **94** w stosunku 6:1, które udało się rozseparować w postaci pochodnych *tert*-butylodimetylosililowych. Uzyskaną w ten sposób pochodną **95** przekształcono w odpowiedni sulfon i poddano ozonolizie otrzymując aldehyd **96**. Następnie addukt **96** ogrzewano z NaHCO_3 we wrzącym etanolu.



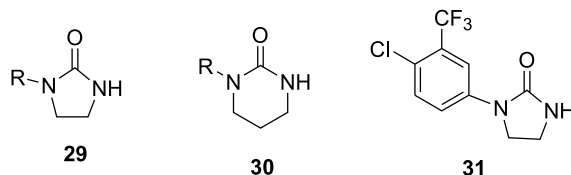
Schemat 13. Synteza aldehydu **97** – substratu do otrzymywania pochodnej **88** [49]

Scheme 13. Synthesis of aldehyde **97** – the substrate for preparation of compound **88** [49]

2.9. *N*-PODSTAWIONE IMIDAZOLIDIN-2-ONY ORAZ *N*-TETRAHYDROPIRYMIDIN-2(1*H*)-ONY

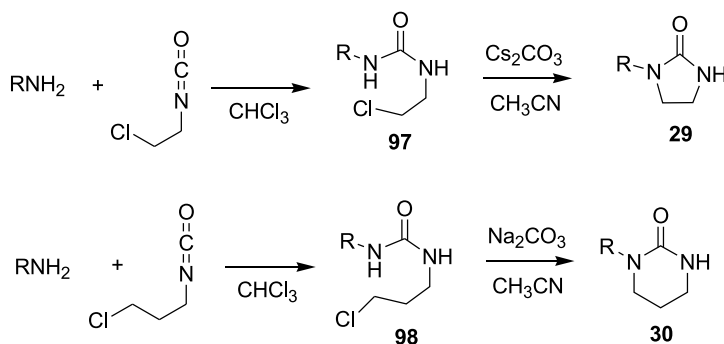
W ostatnich latach otrzymano i zbadano heterocykliczne pochodne: *N*-alkilo imidazolidin-2-ony **29** oraz *N*-alkilo tetrahydropyrimidin-2(1*H*)-ony **30** (Rys. 12) [50]. Właściwości immunosupresyjne badano na podstawie pomiaru inhibicji splenocytów myszy indukowanych konkanawaliną A w obecności danego związku. Na podstawie testów aktywności biologicznej ustalono, że pochodne **29** zawierające

pierścień 5-członowy posiadają lepsze właściwości immunosupresyjne, aniżeli *N*-tetrahydropyrimidin-2(1*H*)-ony **30**. Ponadto obecność atomu halogenu w pierścieniu aromatycznym wyraźnie zwiększa inhibicję splenocytów, a najbardziej aktywnym związkiem w przebadanej serii okazał się analog **31**.



Rysunek 12. *N*-Imidazolidin-2-ony **29**, **31** oraz *N*-tetrahydropyrimidin-2(1*H*)-ony **30** [50]
 Figure 12. *N*-Imidazolidin-2-ones **29**, **31** and *N*-tetrahydropyrimidin-2(1*H*)-ones **30** [50]

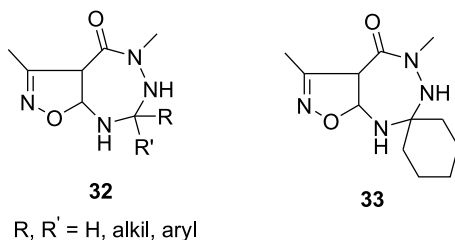
Synteza tych związków obejmuje reakcje odpowiednich amin z izocyjanianem 2-chloroetylu bądź izocyjanianem 3-chloropropylu, w zależności od docelowej wielkości pierścienia (Schemat 14). Następnie *N,N'*-dipodstawione moczniki **97**, **98** ulegają cyklizacji do produktów **29**, **30**.



Schemat 14. Synteza *N*-imidazolidin-2-onów **29** oraz *N*-tetrahydropyrimidin-2(1*H*)onów **30** [50]
 Scheme 14. Synthesis of *N*-imidazolidin-2-ones **29** and *N*-tetrahydropyrimidin-2(1*H*)-ones **30** [50]

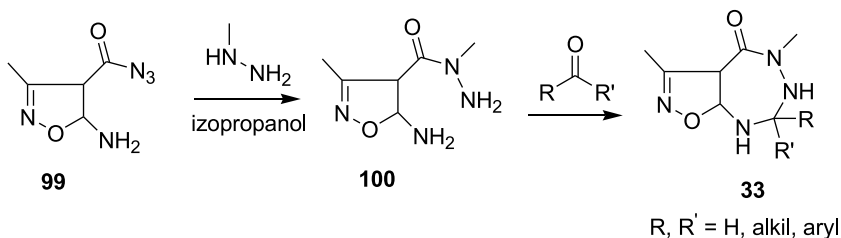
2.10. POCHODNE 3-METYLOIZOKSAZOLO[5,4-e][1,2,4]TRIAZEPIN-4-ONU

3-Metyloizoksazolo[5,4-e][1,2,4]triazepin-4-ony **32** (Rys. 13) składają się z dwóch skondensowanych pierścieni: 5-członowego pierścienia izoksazolu oraz 7-członowego fragmentu triazepinowego. Spośród otrzymanych analogów **32** wyodrębniono kilka o znacznej aktywności immunosupresyjnej w testach *in vivo*, porównywalnej z CsA, np. pochodna spirocykloheksylova **33**.



Rysunek 13. Struktura pochodnych 3-metyloizoksazolo[5,4-e][1,2,4]triazepin-4-onu [51]
 Figure 13. Structure of derivatives of 3-methylisoxazolo[5,4-e] [1,2,4]triazepin-4-one [51]

3-Metyloizoksazolo[5,4-e][1,2,4]triazepin-4-ony **32** otrzymano z wykorzystaniem azydku kwasu 5-amino-3-metylo-4-izoksazolokarboksylowego **99** (Schemat 15). W reakcji z pochodnymi hydrazyny zachodzi podstawienie anionu azydkowego na węgiel acylowym. Nie obserwowano natomiast charakterystycznego dla azydków acylowych przegrupowania Curtiusa. W kolejnym etapie hydrazyd **100** traktowano odpowiednim reagentem karbonylowym [51, 52].



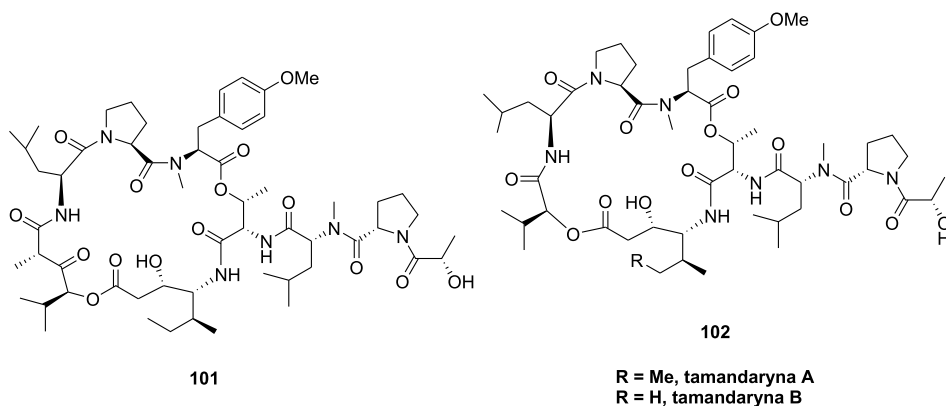
Schemat 15. Otrzymywanie 3-metyloizoksazolo[5,4-e][1,2,4]triazepin-4-onów [51, 52]
 Scheme 15. Preparation of 3-methylisoxazolo[5,4-e] [1,2,4]triazepin-4-ones [51, 52]

2.11. ALEMTUZUMAB

Alemtuzumab jest litycznym ciałem monoklonalnym, antygenem glikoproteiny CD52 znajdującej się na powierzchni limfocytów. Preparat ten powoduje rozpad limfocytów B oraz T i używa się go przede wszystkim w leczeniu nowotworów hematologicznych. Zastosowanie tego leku podczas przeszczepu wątroby z innymi immunosupresantami (sterydy, inhibitory kalcyneuryny) pozwoliło na obniżenie ryzyka ostrego odrzutu bądź wydłużenia czasu do jego wystąpienia. Dotyczyło to zwłaszcza grupy dzieci, u których leczenie alemtuzumabem łączono z takrolimusem. Podobny efekt zaobserwowano po przeszczepie nerki, gdzie dodatkowo możliwa była redukcja immunosupresji podtrzymującej do jednego leku – sirolimusu. Najnowszym zastosowaniem alemtuzumabu (III faza badania klinicznego) jest immunosupresyjne leczenie stwardnienia rozsianego [53–55].

2.12. DEPSIPEPTYDY

Didemmina B **101** i tamandaryna A i B **102** (Rys. 14) stanowią grupę naturalnych depsipeptydów izolowanych z organizmów morskich (odpowiednio z *Trididemnum solidum* – osłonicy karaibskiej oraz z zachwy brazylijskiej). Związki te wykazują interesujące właściwości biologiczne, w tym przeciwnowotworowe i immunosupresyjne. Obecnie w USA prowadzone są badania kliniczne didemminy B **101** w leczeniu chorób nowotworowych, a jej mechanizm działania jest wciąż badany [56].



Rysunek 14. Budowa didemminy B i tamandaryny A i B [56]

Figure 14. Structures of didemnin-B and tamandarin A and B [56]

PODSUMOWANIE

Badania z zakresu transplantologii doświadczalnej koncentrują się od wielu lat na możliwościach wyidukowania stanu tolerancji immunologicznej na przeszczepiony narząd (czyli braku odpowiedzi immunologicznej na ściśle zdefiniowany antygen bądź antygeny bez potrzeby stosowania leków immunosupresyjnych), a przynajmniej zahamowania procesu odrzucania. Stąd, działanie projektowanych leków immunosupresyjnych opiera się o regulację węzłowych elementów procesu odrzucania alloprzeszczepu.

Przez wiele lat ostre epizody komórkowego odrzucenia przeszczepu stanowiły główny problem w utrzymaniu transplantacji organów. W konsekwencji, projektowanie leczenia immunosupresyjnego i wykorzystywanych w nim czynników skupiło się na zapobieganiu ostrym odrzutom przeszczepionych narządów charakteryzujących się infiltracją organu przez komórki jednojądrzaste. Patofizjologiczna podstawa tej koncepcji opiera się o centralną rolę limfocytów T i ich aktywację przez komórki prezentujące antygen. W ostatnim czasie coraz większą rolę, szczególnie w odrzucaniu przewlekłym, przypisuje się także odrzucaniu humoralnemu, które mediowane jest przez alloprzeciwciała [57]. Staranne analizy szlaków zaangażowanych w stymu-

lację indukcji obu typów reakcji odrzucania doprowadziły do identyfikacji wielu kluczowych elementów, w tym sygnałów kostymulujących i reagujących na nie receptorów czy enzymów wymaganych do syntezy DNA w czasie aktywacji cyklu komórkowego limfocytów T [58]. Świadomość istnienia tych komórek oraz możliwość ich ilościowej oceny pozwoliły rzucić więcej światła na mechanizmy leżące u podstaw kontroli odpowiedzi immunologicznej i jej zmian po przeszczepie allogenicznym i ta wiedza jest źródłem inspiracji dla tworzenia nowych leków immunosupresyjnych, które nie tylko mają zapobiegać odrzucaniu przeszczepu, ale również pozbawionych niekorzystnych działań ubocznych.

PODZIĘKOWANIE

Praca powstała w ramach realizacji projektu badawczego finansowanego przez Politechnikę Gdańską (DS 014668 t.008).

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] S. Sakaguchi, N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, M. Toda, *J. Immunol.*, 1995, **155**, 1151.
- [2] R.I. Lechler, J.R. Batchelor, *J. Exp. Med.*, 1982, **155**, 31.
- [3] O.B. Herrera, D. Golshayan, R. Tibbott, et al., *J. Immunol.*, 2004, **173**, 4828.
- [4] G. Benichou, *Front Biosci.*, 1999, **4**, D476-80.
- [5] P. Hornick, *Methods Mol. Biol.*, 2006, **333**, 145.
- [6] A.C. Allison, *Immunopharmacology*, 2000, **47**, 63.
- [7] Dostępny w Internecie: <http://bioinfo.mol.uj.edu.pl/articles/Bechyne04?action=print>.
- [8] P.F. Halloran, *N. Engl. J. Med.*, 2004, **351**, 2715.
- [9] D. Dell'Olio, D.A. Kelly, *Curr. Opin. Organ. Transplant.*, 2010, **15**, 594.
- [10] J. Pascual, C. Galeano, A. Royuela, J. Zamora, *Transplantation*, 2010, **90**, 343.
- [11] P. Romanowski, K. Dzierzbicka, A. Myśliwski, A.M. Kołodziejczyk, *Post. Biochem.*, 1991, **37**, 159.
- [12] M.H. Dreyfuss, H. Hofmann, H. Kobel, H. Pache, W. Tschertter, *Eur. J. Appl. Microbiol.*, 1976, **3**, 125.
- [13] M. Inrona, P. Allavena, F. Spreafico, A. Mantovani, *Transplantation*, 1981, **31**, 113.
- [14] T. Rath, A. Rubbert, *Clin. Exp. Rheumatol.*, 2010, **28** (5 Suppl 61), S52.
- [15] A.P. Diamanti, M. Rosado, V. Germano, M. Scarsella, E. Giorda, E. Podestf, R. D'Amelio, R. Carsetti, B. Laganf, *Clin. Immunol.*, 2011, **138**, 9.
- [16] R.O. Kaçmaz, J.H. Kempen, C. Newcomb, E. Daniel, S. Gangaputra, R.B. Nussenblatt, J.T. Rosenbaum, E.B. Suhler, J.E. Thorne, D.A. Jabs, G.A. Levy-Clarke, C.S. Foster, *Ophthalmology*, 2010, **117**, 576.
- [17] C. Avendario, J.C. Menendez, *Curr. Med. Chem.*, 2002, **9**, 159.
- [18] N. Aouali, L. Eddabra, J. Macadre, H. Morjani, *Critical Rev., [w:] Oncology/Hematology*, 2005, **56**, 61.
- [19] Z. Yang, K. Pattamana, B.F. Molino, S.N. Haydar, Y. Cao, F. Bois, J-H. Maeng, M.S. Hemenway, J.O. Rich, Y.I. Khmelnsky, T.D. Friedrich, D. Peace, P.C. Michels, Synlett, 2009, **18**, 2935.
- [20] T. Ruzicka, T. Assmann, B. Horney, *Arch. Dermatol.*, 1999, **135**, 574.

- [21] W. Barańska-Rybak, R. Nowicki, *Alergia Astma Immunologia*, 2003, **8**, 69.
- [22] A.W. Thomson, *Immunol. Today*, 1989, **10**, 6.
- [23] S. Vitko, et al., *Am. J. Transplant.*, 2004, **4**, 626.
- [24] Dostępny w Internecie: <http://pl.wikipedia.org/wiki/Ewarolimus>
- [25] Dostępny w Internecie: <http://pl.wikipedia.org/wiki/Azatiopryna>
- [26] M. Małachowska, G. Cholewiński, K. Dzierzbicka, A. Wardowska, P. Trzonkowski, *Wiad. Chem.*, 2009, **63**, 309.
- [27] R. Bentley, *Chem. Rev.*, 2000, **100**, 3801.
- [28] B. Kaplan, *Curr. Med. Res. Opin.*, 2006, **22**, 2355.
- [29] L. Ghioa, M. Ferrarasso, G. Zacchello, L. Murerc, F. Ginevrid, M. Belingheria, L. Peruzzie, F. Zanonf, F. Perfumod, L. Berardinellib, S. Tirellig, L.D. Strologoh, I. Fontanai, U. Valentei, M. Cardilloj, A. Edefontia, *Clin. Transplant.*, 2009, **23**, 264.
- [30] J. Jablecki, L. Kaczmarzyk, D. Patrzalek, A. Domanasiewicz, Z. Boratynska, *Transplant. Proc.*, 2009, **41**, 549.
- [31] 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, *J. Med. Chem.*, 1996, **39**, 4181.
- [32] G. Lai, W.K. Anderson, *Tetrahedron*, 2000, **56**, 2583.
- [33] M.E. Meza-Aviña, M. Ordoñez, M. Fernández-Zertuche, L. Rodriguez-Fragoso, J. Reyes-Esparza, A.A.M. de los Rios-Corsino, *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, **13**, 6521.
- [34] L. Chen, D.J. Wilson, N.P. Labello, H.M. Jayaram, K.W. Pankiewicz, *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, **16**, 9340.
- [35] Dostępny w Internecie:
http://www.p-t-t.org/index.php?option=com_content&task=view&id=106&Itemid=105.
- [36] H. Chen, X. Du, W. Tang, Y. Zhou, J. Zuo, H. Feng, Y. Li, *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, **16**, 2403.
- [37] Dostępny w Internecie:
http://www.manufacturingchemist.com/new/article_page/Immunosuppressant_-_sotrastaurin/50543.
- [38] J.-P. Evenou, J. Wagner, G. Zenke, V. Brinkmann, K. Wagner, J. Kovarik, K.A. Welzenbach, G. Weitz-Schmidt, Ch. Guntermann, H. Towbin, S. Cottens, S. Kaminski, T. Letschka, Ch. Lutz-Nicoladoni, T. Gruber, N. Hermann-Kleiter, N. Thuille, G. Baier, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2009, **330**, 792.
- [39] C. Sommerer, M. Zeier, *Clin. Transplant.*, 2009, **23**, 15.
- [40] F.C.E. Reis, C.O.R. Júnior, L.L. Alves, A.P. Ferreira, M.V. de Almeida, *Chem. Biol. Drug Des.*, 2008, **72**, 596.
- [41] K. Kaczmarek, B. Farina, P. Zubrzak, S. Jankowski, M. Zimecki, P. Suder, E. Benedetti, R. Fattorusso, M. Savianio, J. Zabrocki, *J. Pept. Sci.*, 2008, **15**, 166.
- [42] A.G. Kraus, V. Gupta, M. Kohut, N. Singh, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009, **19**, 5539.
- [43] G.-B. Liu, J.-L. Xu, C.-C. He, G. Chen, Q. Xu, H.-X. Xu, J.-X. Li, *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, **17**, 5433.
- [44] H. Zhao, D.R. Mootoo, *J. Org. Chem.*, 1996, **61**, 6762.
- [45] G.-L. Zhang, Ch. Chen, Y. Xiong, L.-H. Zhang, J. Ye, X.-S. Ye, *Carbohydr. Res.*, 2010, **345**, 780.
- [46] X.-S. Ye, F. Sun, M. Liu, Q. Li, Y. Wang, G. Zhang, L.-H. Zhang, X.-L. Zhang, *J. Med. Chem.* 2005, **48**, 3688.
- [47] J. Westermann, M. Schneider, J. Platzek, O. Petrov, *Org. Process Res. Dev.*, 2007, **11**, 200.
- [48] K. Casteels, R. Bouillon, M. Waer, Ch. Mathieu, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 1995, **4**, 313.
- [49] M.J. Calverley, *Tetrahedron*, 1987, **43**, 4609.
- [50] C. Sabourin, J.-M. Robert, *J. Enz. Inhib. Med. Chem.*, 2008, **23**, 659.

- [51] S. Ryng, M. Zimecki, M. Mączyński, T. Głowiak, *Pol. J. Chem.*, 2009, **83**, 1967.
- [52] S. Ryng, T. Głowiak, *Synth. Commun.*, 1997, **27**, 1359.
- [53] S. Dhesi, B. Boland, S. Colquhoun, *Curr. Opin. Organ Trans.*, 2009, **14**, 245.
- [54] S.R. Mohan, M.J. Clemente, M. Afable, H.N. Cazzolli, N. Bejanyan, M.W. Wlodarski, A.E. Lichtin, J.P. Maciejewski, *Haematol.*, 2009, **94**, 1407.
- [55] P. Trzonkowski, M. Zilvetti, S. Chapman, J. Wieckiewicz, A. Sutherland, P. Friend, K.J. Wood, *Am. J. Transplant.*, 2008, **8**, 338.
- [56] J. Adrio, C. Cuevas, I. Manzanares, M. M. Joullié, *J. Org. Chem.*, 2007, **72**, 5129.
- [57] K. Solez, R.B. Colvin, L.C. Racusen, M. Haas, B. Sis, M. Mengel, P.F. Halloran, W. Baldwin, G. Banfi, A.B. Collins, F. Cosio, D.S. David, C. Drachenberg, G. Einecke, A.B. Fogo, I.W. Gibson, D. Glotz, S.S. Iskandar, E. Kraus, E. Lerut, R.B. Mannon, M. Mihatsch, B.J. Nankivell, V. Nickleit, J.C. Papadimitriou, P. Randhawa, H. Regele, K. Renaudin, I. Roberts, D. Seron, R.N. Smith, M. Valente, *Am. J. Transplant.*, 2008, **8**, 753.
- [58] M.D. Denton, C.C. Magee, M.H. Sayegh, *Lancet*, 1999, **353**, 1083.

Praca wpłynęła do Redakcji 13 grudnia 2010