

# Imunosupresivi - uloga i sinteza ciklosporina

---

Orlić, Daniel

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:985058>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijски odsjek

Daniel Orlić

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **Imunosupresivi - uloga i sinteza ciklosporina**

## **Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za Organsku kemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Željka Car

Zagreb, 2023. godina.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

30.lipnja.2023.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

14. srpnja.2023.

Mentor rada: [titula, ime i prezime mentora]

Potpis:



## Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VIII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. IMUNOLOŠKI SUSTAV.....	II
2.1. Tkiva i organi imunološkog sustava .....	ii
2.2. Stanice imunološkog sustava.....	iii
2.3. Prirođeni i stečeni imunološki sustav .....	v
§ 3. ADJUVANTI I IMUNOSUPRESIVI.....	VII
3.1. Mehanizmi djelovanja adjuvanata .....	viii
3.2. Imunosupresivi .....	ix
3.3. Imunosupresivi – podjela i mehanizmi djelovanja.....	x
3.3.2. <i>mTOR</i> inhibitori.....	xi
3.3.3. <i>Blokatori</i> <i>kostimulacije</i> .....	xii
3.3.4. <i>Antimetaboliti</i> .....	xiii
3.3.5. <i>Poliklonska</i> <i>antitijela</i> .....	xiv
3.3.6. <i>Monoklonska</i> <i>antitijela</i> .....	xiv
§ 4. CIKLOSPORIN A .....	XV
4.1. Povijest i uloga.....	xv
4.2. Struktura.....	xv
4.3. Fizikalno-kemijska svojstva .....	xvi
4.4. Mehanizam djelovanja .....	xvi
4.5. Totalna sinteza.....	xvii
§ 5. ZAKLJUČAK .....	XXV
§ 6. POPIS KRATICA.....	XXVI
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	XXVII







## § Sažetak

Iako imunološki sustav služi za obranu protiv bolesti i većinom je poželjno poticati njegovo djelovanje, u slučajevima poput transplantacije organa, autoimunih bolesti, alergija i drugih potrebno je smanjiti njegovu aktivnost, odnosno potaknuti imunosupresiju. Imunosupresivi su vrsta lijekova koja sudjeluje u smanjenju imunološkog odgovora na način da djeluju na pojedini antigen ili na imunološki sustav u cijelosti. Glukokortikoidi, citostatici, antimetaboliti, antitijela i lijekovi koji djeluju na imunofiline, receptore za imunosupresive, osim strukturno, razlikuju se i po mjestu te načinu djelovanja.

Ciklosporin A, ciklički je peptid i primjer lijeka koji djeluje na imunofiline te na taj način sprječava aktivaciju i proliferaciju limfocita T. Zbog ranog otkrivanja njegovog mehanizma djelovanja, te njegove učinkovitosti i široke primjene, bio je jedan od ključnih lijekova koji su promijenili tijek razvoja medicine. Njegova totalna sinteza predstavljena je desetak godina nakon njegovog otkrića u gljivicima *Tolypocladium inflatum* te je obuhvaćala preko 80 koraka. No, napretkom sintetske organske kemije omogućena je nova, brža i efikasnija totalna sinteza koja može poslužiti za sintezu njegovih modificiranih analoga s većom biološkom aktivnošću i manje nuspojava.

## § 1. UVOD

Transplantacija organa je procedura koja uključuje zamjenu otkazalog organa primatelja s novim, zdravim organom davatelja. No, imunološki sustav prepoznaje transplantirani organ kao stranu tvar te pokreće imunosni odgovor koji vodi ka odbacivanju organa. Odbacivanje se ponajviše događa zbog aktivacije primateljevih limfocita T, koji ne mogu raspoznati je li riječ o antigenima normalnih stanica davatelja ili su to antigeni nekih mikroba ili virusa, koji pokreću regulacijske i izvršne imunološke mehanizme kako bi uklonili strani organizam. Zbog ovakvih problema, pokrenuo se razvoj imunosupresiva, lijekova koja imaju ključnu ulogu u sprječavanju odbacivanja organa te liječenju sličnih imunoloških problema.

Imunosupresivi su temeljni lijekovi u području transplantacije koji su uvelike povećali uspješnost i smanjili posljedice prilikom transplantacije organa. Kontroliranjem imunološkog odgovora, imunosupresivi smanjuju aktivaciju i proliferaciju limfocita T, čime se smanjuje proces odbijanja. Osim u transplantaciji organa, imunosupresivi se koriste i u liječenju autoimunoloških bolesti, gdje imunološki sustav napada vlastite, zdrave stanice.

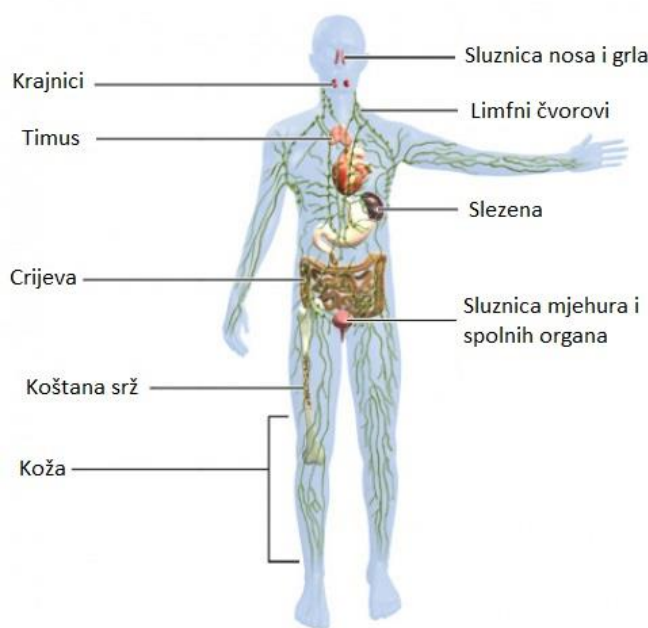
Jedan od najvažnijih imunosupresiva, zbog visoke djelotvornosti i raznolike primjene, je ciklosporin A. Ciklosporin A je ciklički polipeptid sastavljen od 11 aminokiselina, izoliran iz gljivica 70-ih godina prošlog stoljeća. Njegov imunosupresivni učinak bazira se na sprječavanju aktivacije i proliferacije limfocita T, primarno djelujući na protein kalcineurin. Zbog zahtjevne strukture, totalna sinteza ciklosporina je dugotrajan i nepraktičan proces na velikoj skali. Prva totalna sinteza ciklosporina obuhvaćala je više od 80 koraka, no napretkom sintetske organske kemije, osobito asimetrične organske sinteze, omogućena je njegova nova, brža i efikasnija priprava kao i priprava mnogih modificiranih analoga s poboljšanim imunosupresivnim svojstvima i smanjenim nuspojavama.

## § 2. IMUNOLOŠKI SUSTAV

### 2.1. Tkiva i organi imunološkog sustava

Imunološki sustav je kompleksni sustav stanica, tkiva, organa i tvari koji pomažu tijelu u borbi protiv infekcija i bolesti.<sup>1</sup> Organi koji grade imunološki sustav (slika 1) sastoje se od kože, sluznice i limfnih organa. Koža i sluznice djeluju kao fizikalna barijera te zajedno sa enzimima prisutnim u slini i dišnim putevima, te želučanom kiselinom čine prvu liniju obrane protiv stranih organizama.

Limfni organi i tkiva dijele se na primarne (središnje) i sekundarne (periferne). Timus i koštana srž čine primarne organe. Timus je limfoepitelni organ smješten u grudnom košu iznad srca i iza grudne kosti, a zaslužan je za sazrijevanje nezrelih limfocita T koji postaju sposobni za specifično prepoznavanje antigena. Koštana srž je mjesto stvaranja svih krvotvornih stanica, ali i mjesto primarnog sazrijevanja limfocita B. S obzirom da uz limfocite B sadrži i limfocite T i plazma stanice, koštana srž je i važan sekundarni limfni organ. Zreli limfociti T i B naseljavaju sekundarne limfne organe i tkiva koja se sastoje od slezene, limfnih čvorova i limfnih tkiva te tamo cirkuliraju i sudjeluju u pokretanju stečenog imunološkog odgovora.<sup>2</sup>



Slika 1. Organi i tkiva imunološkog sustava. Ilustracija je preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru.<sup>2</sup>

## 2.2. Stanice imunološkog sustava

Sve stanice imunološkog sustava potječu iz istih prekursorskih stanica - krvotvornih matičnih stanica iz koštane srži. S obzirom da iz njih mogu nastati različite vrste stanica još se nazivaju i pluripotentne krvotvorne matične stanice. Matične stanice imaju sposobnost samoobnavljanja i diferenciranja u limfoidne i mijeloidne stanice. Takve stanice nemaju sposobnost samoobnavljanja te one nadalje diferenciraju u stanice imunološkog sustava.

Tablica 1. Stanice imunološkog sustava<sup>3</sup>

Limfoidne			Mijeloidne					
Limfociti B	Limfociti T	Stanice NK	Fagociti			Posredničke		
			Granulociti		Monociti			
			Neutrofili	Eozinofili			Bazofili	Mastociti

Limfoidne prekursorske stanice stvaraju limfocite. Limfociti su jedine stanice koje proizvode receptore specifične za različite antigene čime čine ključnu komponentu stečenog imunološkog sustava. Dvije najvažnije skupine limfocita su limfociti T i limfociti B. Na površini limfocita

nalaze se brojni proteini - biljezi (markeri) na temelju kojih se mogu razlikovati različiti limfociti.

Limfociti T su nositelji stečene stanične imunosti koja se bazira na prepoznavanju proteinskih antigena. Biljeg karakterističan za limfocite T je njegov receptor za antigen (engl. *T cell antigen receptor, TCR*) koji prepoznaje samo peptidne fragmente proteinskih antigena koji su vezani za proteine glavnog sustava tkivne podudarnosti (engl. *major histocompatibility complex, MHC*). TCR je povezan s drugim biljegom, kompleksom CD3 koji je također karakterističan samo za limfocite. Limfociti T koji sadrže i CD4+ biljeg nazivaju se pomoćnički limfociti ili limfociti T<sub>H</sub>. Oni proizvode proteine citokine koji pomažu limfocitima B u proizvodnji antitijela. CD8+ limfociti nazivaju se citotoksični ili T<sub>C</sub> limfociti koji mogu napasti i uništiti vlastite maligne stanice i stanice zaražene virusom.

Limfociti B su nositelji stečene humoralne imunosti koja stvara specifična antitijela u borbi protiv antigena. B limfociti sintetiziraju proteine imunoglobuline (antitijela) koji se ugrađuju u staničnu membranu gdje djeluju kao specifični receptori za antigen (engl. *B-cell antigen receptor, BCR*).

Treća skupina limfocita su NK stanice (engl. *natural killer cells*) koje su nositelji prirodene stanične imunosti. Od T i B limfocita razlikuju se i funkcionalno i morfološki, stoga one na površini stanice ne posjeduju receptore za antigen, a njihova je uloga izravna citotoksičnost protiv virusom zaraženih i tumorskih stanica.

Mijeloidne prekursorske stanice proizvode fagocite u koje spadaju makrofagi, neutrofilni i eozinofilni granulociti i stanice za predočavanje antigena (engl. *antigen presenting cells, APC*), te posredničke stanice koje čine bazofili, mastociti i trombociti. Fagociti su dobili naziv po načinu na kojem djeluju protiv stranih organizama, fagocitozom. Makrofagi nastaju iz monocita, te osim fagocitoze imaju i ulogu predočavanja antigena te kontrole imunološkog odgovora. Granulociti su kratko živuće stanice čija je primarna uloga zaštita od mikroorganizama, a s obzirom na boju u krvnom razmazu razlikuju se neutrofilni i eozinofilni granulociti. APC stanice predočuju antigene limfocitima T i B. One prisutne u koži i sluznici nazivaju se Langerhansovim stanicama, dok su u limfnim čvorovima i slezeni prisutne kao dendritične stanice. Iako ih ne ubrajamo u skupinu antigen prezentirajućih stanica, tu ulogu posjeduju i limfociti B i makrofagi. Bazofili i mastociti su vrlo slične građe, te su prisutni u malim količinama u krvi.

Prepoznavanjem antigena, imunološke stanice proizvode i topljive posrednike imunosti. Topljive posrednike imunosti dijelimo na antitijela, citokine i ostale. Antitijela proizvedena od strane limfocita B ili imunoglobulini su specijalni glikoproteini koji mogu biti vezani na površinu limfocita B ili se nalaziti u topljivom obliku u citoplazmi. Sastoje se od dva identična teška lanca i dva identična laka lanca međusobno povezana disulfidnim vezama. Međusobno se razlikuju u veznom mjestu, odnosno svako antitijelo je specifično za pojedini antigen. Citokini su topljivi proteini ili glikoproteini koji nastaju iz različitih stanica poput makrofaga, limfocita T, mastocita. Djeluju kao posrednici u imunološkim i upalnim reakcijama te su odgovorni za međusobnu komunikaciju među imunološkim stanicama. Važan citokin je faktor tumorske nekroze alfa (TNF- $\alpha$ ) koji sudjeluje u regulacije upale i citotoksičnom djelovanju stanica imunološkog sustava. TNF- $\alpha$  je predmet istraživanja za djelovanje budućih imunosupresiva. U citokine se ubrajaju i interleukini koje luče limfociti i djelomično fagociti, a imaju ulogu u reguliranju rasta i sazrijevanja krvotvornih stanica.<sup>3</sup>

### 2.3. Prirođeni i stečeni imunološki sustav

Iako se obrana od bolesti može podijeliti u dvije kategorije: prirođeni i stečeni imunološki sustav, ta se dva sustava preklapaju i zajedno surađuju u održavanju tjelesne homeostaze.

Prirođeni imunološki sustav djeluje kao prva linija u obrani protiv bakterija, virusa, parazita i drugih mikroorganizama. Za razliku od stečenog imunološkog sustava prisutan je od samog rođenja i pruža brzu i djelotvornu obranu. Obrana se zbiva i na lokalnoj i na sustavnoj razini. Lokalnu imunost čine koža i sluznica, a otpornost se temelji na fizičkom uklanjanju mikroba s površine, lučenjem kiselina te bakterijskoj flori koja sprječava razvoj drugih mikroba. Dodatnoj obrani pridonosi i sustavna obrana koja se dijeli na: humoralnu i staničnu imunost. Humoralna imunost primarno uključuje djelovanje topljivih komplementnih proteina i proteina akutne faze, interferona, lizozima i drugih. Komplementni sustav je skup proteina koji se određenim slijedom međusobno aktiviraju proteolitičkom razgradnjom, a nakon aktivacije imaju nekoliko mogućnosti djelovanja. Osim što mogu sintetizirati komplekse kojima će uništavati strane organizme, mogu i opsonizirati mikrobe, odnosno obložiti ih tvarima koje olakšavaju fagocitozu, te ih time učiniti dostupnima djelovanju fagocita (makrofaga i neutrofila), a dodatno mogu signalizirati i aktivirati ostale stanice. Djeluju u sprječavanju ulaska virusa i ostalih mikroba u stanicu, no ukoliko oni uspiju prodrijeti u stanicu aktivira se

interferonski sustav. Interferoni su citokini koji čine interferonski sustav te osim antivirusnog, posjeduju antiproliferativno i imunoregulacijsko djelovanje. Antivirusno i antiproliferativno djelovanje bazira se na sintezi enzima koji sudjeluju u razgradnji RNA čime je onemogućeno razmnožavanje virusnih stanica. Interferoni, kao što im i samo ime nalaže, posjeduju svojstvo interferencije koje im omogućava da tijekom infekcije jednim virusom organizam istodobno može postati otporan na infekciju drugim virusom.<sup>4</sup>

Humoralna imunost djeluje zajedno sa staničnom imunosti koja se sastoji od profesionalnih fagocita i NK stanica. NK stanice igraju vrlo važnu ulogu u prirođenom imunološkom sustavu jer uzrokuju apoptozu stranih čestica tako što otpuštaju proteine koji aktiviraju enzime odgovorne za apoptozu u stanicama mikroba te također luče citokine koji aktiviraju profesionalne fagocite na razgradnju. Samo međusobnom interakcijom i kooperativnošću između komplementnog sustava, profesionalnih fagocita i NK stanica moguće je brzo i djelotvorno reagirati protiv stranih mikroorganizama.

Djelovanje prirođenog imunološkog sustava nekada nije dovoljno za obranu od stranih mikroorganizama, stoga se uključuje i stečeni imunološki sustav. Stečeni imunološki sustav zaslužan je za stvaranje stečene imunosti koja se zasniva na prepoznavanju antigena. Za proces prepoznavanja zaslužni su receptori za antigen na limfocitima B i T, a zatim se pokreće imunološki odgovor kojim se neutralizira ili uništava antigen. Receptori za antigen na limfocitima B i T osim što oboje imaju konstantne i varijabilne regije, razlikuju se po položaju u stanici te načinu prepoznavanja. Receptor za antigen na limfocitu T nalazi se isključivo vezan za staničnu membranu te prepoznaje antigene u kompleksu s molekulama MHC, dok se receptor za antigen na limfocitu B može nalaziti i vezan za staničnu membranu, ali i u obliku topljivih antitijela koji se otpuštaju s površine limfocita B.

Stečeni imunološki sustav ima također dva moguća mehanizma obrane: humoralna obrana posredovana antitijelima te stanična obrana posredovana stanicama. Humoralna imunost bitna je u obrani protiv izvanstaničnih mikroorganizama, dok je stanična obrana zaslužna za obranu protiv unutarstaničnih mikroorganizama i tumora.

Svaki limfocit B specifičan je za samo određeni antigen, a prepoznaje ih preko površinskih imunoglobulina. Humoralni odgovor započinje aktiviranjem limfocita B pomoću limfocita T na način da limfocit B predočava antigen vezan na površini receptora u kompleksu s MHC-om limfocitu T, što rezultira lučenjem citokina koji potiču proliferaciju, diferencijaciju i lučenje antitijela. To uzrokuje klonsku ekspanziju stanica od kojih će neke lučiti antitijela

odgovorna za prepoznavanje antigena koji je pokrenuo reakciju (plazma stanice), dok se drugi dio limfocita B transformira u stanice koje pamte i koje pri ponovnom susretu s antigenom pokreću sekundarni imunološki odgovor. Sekundarni odgovor podrazumijeva lučenje antitijela nakon ponovnog susreta s antigenom, a za razliku od primarnog, potrebna je puno manja količina antigena za prepoznavanje, a antitijela se luče brže. Humoralna imunost specifična je za izvanstaničnu obranu protiv patogena.

Stanična imunost ne bazira se na djelovanju antitijela već je ona posredovana limfocitima T. U aktivaciji limfocita T sudjeluju stanice za predočavanje antigena koje vežu antigen, a zatim ga uz pomoć proteolitičkih enzima razgrade na kraće peptidne lance koji se vežu na MHC komplekse koje prepoznaju limfociti T. Najučinkovitije stanice za predočavanje antigena su dendritičke stanice koje sadrže MHC-II komplekse koje prepoznaju limfociti T<sub>H</sub>. Oni obnašaju središnju ulogu u pokretanju i regulaciji staničnog imunološkog odgovora i određuju koji antigen će biti prepoznat od strane receptora te koji će se mehanizam koristiti u obrani protiv odabranog antigena. Jedan od glavnih mehanizama obrane je citotoksičnost posredovana CD8<sup>+</sup> limfocitima. Oni imaju mogućnost prepoznavanja antigena vezanog za kompleks MHC-I kojeg posjeduju gotovo sve tjelesne stanice s jezgrom što ga čini vrlo učinkovitim u uništavanju stanica zaraženim virusom. Ostali mehanizmi obuhvaćaju proizvodnju antitijela, aktivaciju mastocita, eozinofila, makrofaga te mehanizme odgođene preosjetljivosti.<sup>3,5</sup>

### § 3. ADJUVANTI I IMUNOSUPRESIVI

Bilo kakva manipulacija imunološkog sustava naziva se imunološka terapija. Imunološka terapija može se podijeliti na imunosupresiju čiji je cilj smanjiti utjecaj prekomjernog i/ili neželjenog imunološkog odgovora pri autoimunim bolestima, alergijama i presađivanju tkiva/organa te na imunostimulaciju u kojoj je cilj potaknuti dodatan imunološki odgovor kod osoba s imunodeficijencijom ili u borbi protiv zloćudnih tumora. Imunološka terapija može biti specifična, odnosno djeluje na točno određeni antigen ili nespecifična čije je djelovanje usmjereno na cjelokupni imunološki sustav. Specifična imunoterapija može se dodatno podijeliti na aktivnu u kojoj se potiče djelovanje vlastitih imunoloških mehanizama te na pasivnu u kojoj se dobivaju gotova antitijela.



Cijepljenje spada u aktivnu specifičnu imunostimulaciju te omogućuje stvaranje obrane protiv infekcija ili bolesti aktivnom imunizacijom antigeni aktivnim, umrtvljenim patogenom ili toksinom. Djelotvoran učinak cjepiva može biti poboljšan dodatkom adjuvanta. Adjuvanti su tvari koje korištenjem u kombinaciji sa specifičnim antigenom rezultiraju učinkovitijim imunološkim odgovorom nego djelovanje samog antigena.<sup>8</sup> Različiti kemijski spojevi poput anorganskih soli, ulja, citokina, polimera i drugih mogu djelovati kao adjuvanti. Osim poboljšanja imunološkog odgovora, adjuvanti omogućavaju korištenje manje koncentracije antigena po cjepivu te smanjenje broja doza cjepiva, dok u nekim slučajevima mogu i stabilizirati sam antigen i produžiti mu poluvrijeme eliminacije. Različiti patogeni imaju različite načine djelovanja stoga i imunološka obrana mora posjedovati različite načine odgovora na pojedini patogen te je za svako cjepivo potreban odgovarajući adjuvant, stoga je pri sintezi cjepiva vrlo bitno poznavati njihove mehanizme djelovanja. Prema mehanizmu djelovanja mogu se podijeliti na one koji utječu na dostavljanje cjepiva te na pojačivače imunološkog odgovora.<sup>3</sup>

### 3.1. Mehanizmi djelovanja adjuvanata

Najstariji poznati mehanizam djelovanja adjuvanata je stvaranje depoa u kojem se pomoću elektrostatskih interakcija, veže antigen. Na taj se način omogućava kontrolirano otpuštanje antigena u krvotok, čime se potiče konstantna stimulacija imunološkog sustava na proizvodnju antitijela. Stipsa je bio je prvi adjuvant s ovim mehanizmom koji se koristio, ali je potom zamijenjen s aluminijskim hidroksidom i aluminijskim fosfatom. Adjuvanti na bazi aluminija nalaze se u 1/3 svih prisutnih cjepiva. No, posljednja istraživanja pokazuju da stvaranje depoa nije ključno za aktivnost adjuvanta.<sup>6,7</sup>

Genskom analizom utvrđeno je da adjuvanti povećavaju ekspresiju gena koji kodiraju citokine, interleukine, kemokine i interferone, na mjestu ubrizgavanja. Uloga tih proteina je parakrino aktiviranje drugih stanica imunološkog sustava, ponajviše neutrofila koji također proizvode različite vrste citokina kako bi dodatno privukle monocite, eozinofile i dendritičke stanice i na taj način stvorile imuno-kompetentnu okolinu oko mjesta ubrizgavanja.

Stanice prirođenog imunološkog sustava na površini imaju receptore za prepoznavanje patogena pomoću kojih ih mogu prepoznati. Adjuvanti djeluju i kao mimetici patogena tako da se kao ligandi vežu na receptore i pokreću prirodni imunološki odgovor.

Za pokretanje stečenog imunološkog odgovora ključni su MHC kompleksi na APC stanicama koje predočavaju antigene limfocitima T. APC stanice čine ponajviše dendritičke stanice i makrofagi te one djeluju kao poveznica između prirodnog i stečenog imunološkog sustava. Adjuvanti djeluju na način da povećavaju količinu antigena koju razgrade enzimi dendritičkih stanica, dok kod makrofaga potiču fagocitozu. Također, produljuju i vrijeme izlaganja antigena u kompleksu s MHC. Dendritičke stanice potom odlaze do limfnih čvorova gdje limfociti T i B prepoznaju antigen te pokreću imunološki odgovor.

### 3.2. Imunosupresivi

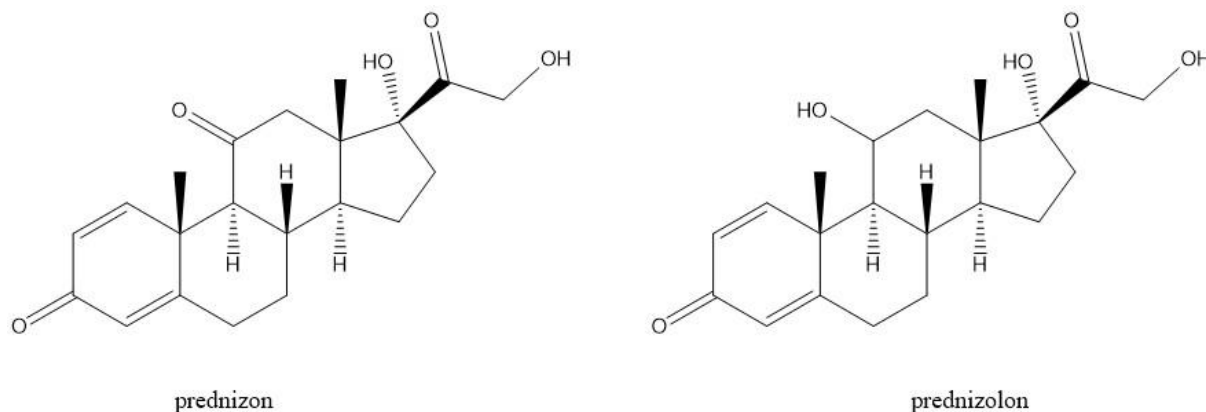
Dok se adjuvanti koriste kako bi potaknuo snažniji i brži imunološki odgovor, imunosupresivi sudjeluju u uklanjanju ili smanjenju jačine imunološkog odgovora, odnosno imunosupresiji. Kao što je rečeno, specifična imunosupresija može se podijeliti na aktivnu i pasivnu. Aktivna specifična imunosupresija potiče se kod alergija i autoimunih bolesti, ukoliko je poznat antigen odgovoran za bolest. Kod alergija posredovanim imunoglobulinima E (antitijela IgE), davanjem alergena moguće je postići djelomičnu toleranciju na antigen. Najvažniji specifični imunosupresiv je anti-Rh<sub>0</sub>(D)-humani imunoglobulin čija je uloga sprječavanje senzibilizacije Rh-negativne majke na antigen D iz Rh<sub>0</sub> pozitivnog djeteta.<sup>8</sup> Kod autoimunih bolesti to nije toliko jednostavno, s obzirom da je većinom nepoznat antigen koji je uzrokovao bolest, stoga se koriste druge metode (lijekovi, plazmafereza, zračenje). Pasivna specifična imunosupresija bazira se na plazmaferezi, procesu kojim se uklanjaju nepoželjna antitijela iz krvotoka čime se privremeno smanjuju simptomi bolesti.<sup>3</sup> Nespecifična imunosupresija bazira se na općem sprječavanju i smanjenju imunološkog odgovora. Većina imunosupresiva koja se danas primjenjuju, djeluju nespecifično, te se oni ponajviše koriste prilikom procesa transplantacije organa.

### 3.3. Imunosupresivi – podjela i mehanizmi djelovanja

#### 3.3.1. Kortikosteroidi

Kortikosteroidi su vrsta prirodnih steroidnih hormona koji nastaju u kori nadbubrežne žlijezde, a mogu biti pripremljeni i sintetski. Kortikosteroidi su oksidirani derivati sterola koji posjeduju steroidnu tetracikličku jezgru, u kojoj su prva tri prstena šesteročlana dok je posljednji peteročlan. Dijele se na glukokortikoide i mineralokortikoide. Glukokortikoidi su uključeni u metabolizam masti, proteina i ugljikohidrata te imaju imunosupresivni, protuupalni i vazodilatacijski učinak, dok mineralokortikoidi sudjeluju u prijenosu iona i regulaciji vode i elektrolita. Zbog svoje uloge, glukokortikoidi jedni su od prvih poznatih imunosupresiva, a trenutno su poznata dva mehanizma njihova djelovanja ovisna o koncentraciji doze. Pri niskim dozama (<30 mg) glukokortikoid se veže na citoplazmatske glukokortikoidne receptore te uzrokuje njihovu hiperfosforilaciju koja im omogućava ulazak u jezgru gdje sudjeluju u ekspresiji gena tako što interagiraju s transkripcijskim faktorima. Jedni od najvažnijih transkripcijskih faktora su NF- $\kappa$ B i AP-1 proteinski kompleksi koji su uključeni u regulaciju sinteze interleukina, od kojih je najvažniji interleukin IL-2. Glukokortikoidi uzrokuju inhibiciju transkripcijskih faktora što se odražava supresijom sinteze interleukina, a smanjena koncentracija interleukina uzrokuje i smanjenje proizvodnje T limfocita. A s obzirom da interleukini uzrokuju proliferaciju i klonsku ekspanziju limfocita B, glukokortikoidi uzrokuju i supresiju humoralne imunosti. Pri višim dozama, učinak ne postižu djelovanjem na regulaciju gena već direktnim utjecajem na fluidnost membrane. S obzirom da su građeni od većeg broja cikličkih prstena, glukokortikoidi su nepolarne, lipofilne molekule koje utječu na unutarstaničnu koncentraciju kalcijevih iona, MAPK kinaza signalni put te induciranu apoptozu timocita, stanica iz kojih nastaju T limfociti u timusu. Glukokortikoidi imaju i protuupalnu ulogu s obzirom da potiču sintezu aneksina A1 koji uzrokuje supresiju fosfolipaze A2 čime nastaju dva krajnja produkta upale, prostaglandini i leukotrieni.<sup>9</sup>

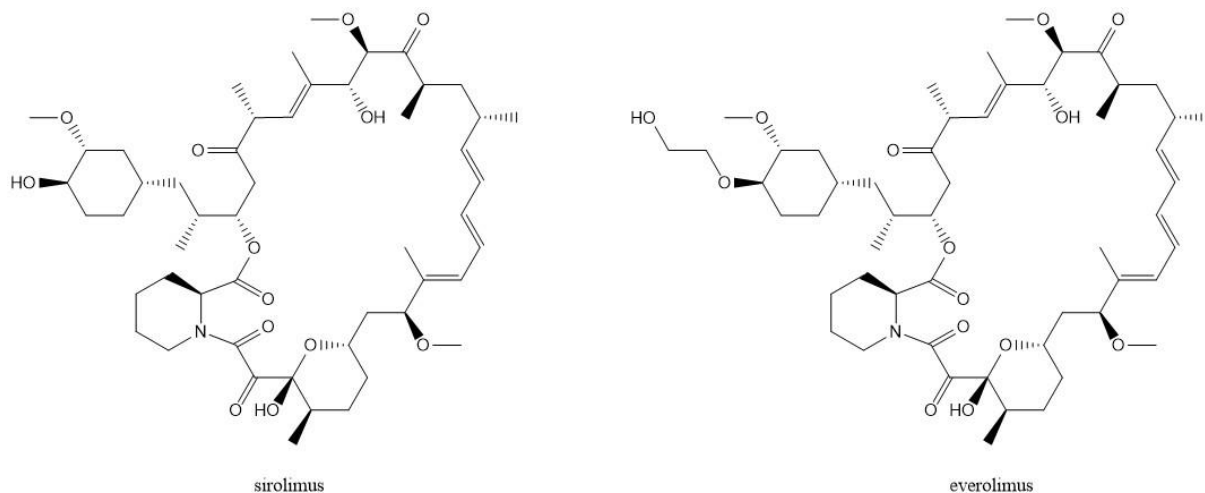
No, s obzirom da se glukokortikoidi koriste i u imunosupresivne i protuupalne i protualergijske svrhe, količina nuspojava od njihovog korištenja drastično je veća u odnosu na ostale imunosupresive. Stoga se, kako bi se privremeno one ublažile, koriste zajedno s drugim imunosupresivima. Najčešći glukokortikoidi koji se koriste kao imunosupresivi su prednizon i prednizolon, koji se strukturno razlikuju samo po prisutnosti karbonilne ili hidroksilne skupine na trećem šesteročlanom prstenu (slika 2).



Slika 2. Strukturna formula prednizona i prednizolona

### 3.3.2. mTOR inhibitori

mTOR (engl. *Mammalian Target of Rapamycin*) je serinska/treoninska proteinska kinaza koja igra središnju ulogu u regulaciji rasta stanica, metabolizmu te kontroli funkcija i odgovora imunološkog sustava. Nakon što receptori T limfocita prepoznaju antigen dolazi do aktivacije mTOR-a koji potiče diferencijaciju, aktivaciju te migraciju T stanica. Osim kod T limfocita uključen je i u sazrijevanje i diferencijaciju B limfocita koje potiče proizvodnju antitijela. Inhibitori mTOR-a (slika 3) su Rapamicin (Sirolimus) i Everolimus (EVL). Sirolimus je prirodni makrociklički lakton iz bakterija *Streptomyces hygroscopicus*, dok je everolimus njegov sintetski derivat, a glavna razlika među njima je poluvrijeme eliminacije koje za sirolimus iznosi 60h a za everolimus 22h. Oba spoja se u citoplazmi prvo vežu za citoplazmatski protein imunofilin FKBP12 te tvore kompleks koji ima vrlo visoki afinitet prilikom vezanja za mTOR. To uzrokuje sprječavanje staničnog ciklusa kao i odgovor na vezanje IL-2 za receptore na površini membrane. Prednost u odnosu na inhibitore kalcineurina, kakav je i ciklosporin, je što nisu nefrotoksični i ne uzrokuju propadanje jetre. S obzirom da je mTOR uključen u PI3K/Akt/mTOR signalnu kaskadu koja je zaslužna za prijelaz staničnog ciklusa iz G1 u S fazu, djelovanje inhibitorima pokazalo se učinkovitim i u liječenju tumora.<sup>10,11</sup>



Slika 3. Strukturna formula sirolimusa i everolimusa, predstavnika mTOR inhibitora

### 3.3.3. Blokatori kostimulacije

Osim inicijalnog vezanja receptora za antigen na površini limfocita T, za peptid-MHC kompleks izložen na površini APC stanica, potrebno je i sekundarno vezanje za potpunu aktivaciju limfocita T. Sekundarni signal, odnosno kostimulacija, odnosi se na interakciju između CD28 receptora koji se nalazi na površini limfocita T i CD80 te CD86 (B7) proteina prisutnih na površini APC stanica koja pokreće signalnu kaskadu odgovornu za proliferaciju limfocita T. Vezanje proteina prisutnih na površini APC stanica za CTLA-4 receptor koji se nalazi na površini već aktiviranih limfocita T uzrokuje negativnu regulaciju te smanjenu aktivaciju limfocita T. Abatacept i Belatacept djeluju kao blokatori kostimulacije. To su proteini sastavljeni od Fc fragmenta ljudskog IgG1 imunoglobulina vezanog za CTLA-4 receptor te oni posjeduju vrlo jak afinitet za vezanje CD80 i CD86 proteina pri čemu sprječavaju aktivaciju limfocita T, proliferaciju limfocita T te sintezu IL-2. Dva se proteina međusobno razlikuju u samo dvije aminokiseline u veznoj regiji što uzrokuje nekoliko puta veći afinitet Belacepta za vezanje na CD80 i CD86 proteine te deset puta veću inhibiciju aktivacije limfocita T, a to ga čini povoljnijim za korištenje pri transplantaciji organa. <sup>9</sup>

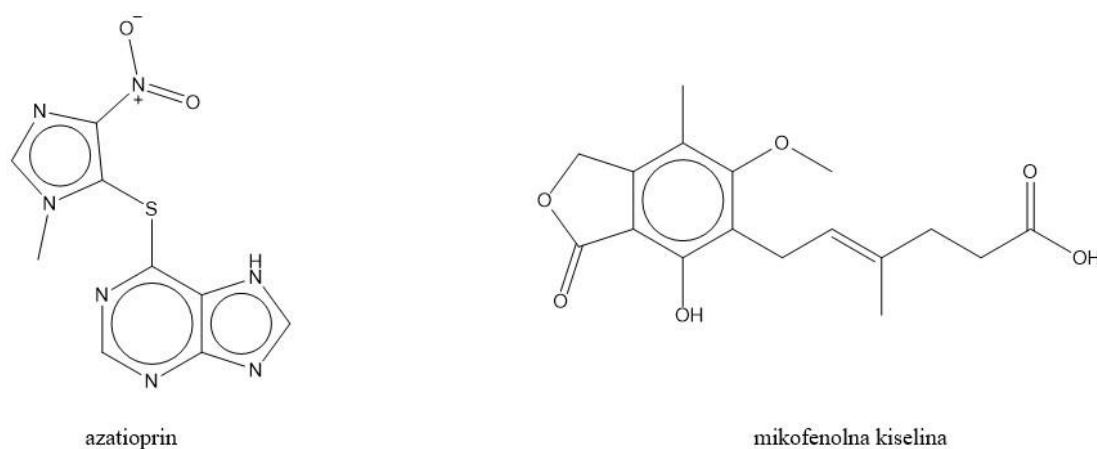
### 3.3.4. Antimetaboliti

Antimetaboliti su tvari koje djeluju kao inhibitori aktivnosti ključnih enzima u metaboličkim putevima.<sup>12</sup> Neki od predstavnika su Azatioprin i mikofenolna kiselina (MPA) koji utječu na biosintezu nukleotida i DNA, te proliferaciju stanice (slika 4).

Azatioprin je tvar koja nije aktivna sama po sebi, već postaje aktivna pri ulasku u organizam gdje se uz pomoć tripeptida glutationa reducira i nastaje 6-merkaptopurin. U jetri se potom dalje metabolizira u tri pravca: 1) do tiogvanozin-trifosfata (TGTP) i tiodeoksigvanozin-trifosfata, 2) metilacijom na sumporovom atomu dolazi do nastanka 6-metilmerkaptopurina te 3) do tioinozinske kiseline. Aktivni spoj je tioinozinska kiselina koja djeluje kao alosterički inhibitor glutamin-hipoksantin-fosforibozil-pirofosfat-amidottransferaze, enzima koji sudjeluje u prvom koraku biosinteze purinskih nukleotida, što utječe na nemogućnost replikacije DNA te potom i diobe stanica. Dodatno se, tioinozinska kiselina ugrađuje u DNA i RNA prilikom replikacije što dovodi do sinteze nefunkcionalne DNA te prekida replikacije.

MPA je aktivna tvar koja dolazi u dva oblika: mikofenolatni mofetil i natrijev mikofenolat. Mikofenolatni mofetil djeluje kao reverzibilni, ne-kompetitivni inhibitor inozin-5-monofosfat-dehidrogenaze, enzima koji je ključan za pretvorbu prekursora purinskih nukleotida, inozilata u gvanilat čime utječe na replikaciju DNA i proliferaciju stanice. No, za razliku od azatiopurina, MPA se ne ugrađuje u lanac DNA.

S obzirom da limfocitne stanice za sintezu nukleotida koriste isključivo *de novo* sintetske puteve, ovi imunosupresivi ponajviše će djelovati upravo na te stanice, dok će druge stanice u tim uvjetima pojačati sintezu nukleotida iz metaboličkog otpada.<sup>13</sup>



Slika 4. Strukturne formule azatioprina i mikofenolne kiseline

### 3.3.5. Poliklonska antitijela

Poliklonska antitijela su skupina antitijela iz različitih imunoloških stanica koja se vežu, različitim afinitetima, za različite dijelove antigena. Najčešće korišten tip poliklonskih antitijela u imunosupresivne svrhe jesu antitimocitni globulini. Antitimocitni globulini sadrže više različitih vrsta antitijela koja se vežu za proteine izložene na površini limfocita T poput CD3, CD2, CD4 i drugih pri čemu uzrokuju apoptozu stanica.<sup>9</sup>

### 3.3.6. Monoklonska antitijela

Monoklonska antitijela nastaju iz identičnih imunoloških stanica stoga je njihova struktura konstantna te se vežu za specifičan dio pojedinačnog antigena.<sup>3</sup> Postoje više vrsta monoklonskih antitijela korištenih u imunosupresivnu svrhu koja većinom djeluju kao kompetitivni inhibitori. Basiliximab je kompetitivni inhibitor IL-2 za receptor za IL-2 pri čemu uzrokuje inhibiciju proliferacije limfocita ovisne o vezanju IL-2. Rituximab se veže na CD20 receptore izložene na površini limfocita B koji su odgovorni za održavanje koncentracije kalcijevih iona u stanici i ključni prilikom aktivacije limfocita B. Također, svojim vezanjem tvori kompleks koji povećava vezanje NK stanica i uništavanje limfocita B.<sup>9</sup>

Poznavanje mehanizma djelovanja imunosupresiva vrlo je bitno prilikom uporabe i kombinacije više lijekova, a također i zbog mogućnosti sprječavanja potencijalnih nuspojava. Najveći napredak posljednjih godina u razvoju imunosupresiva napravljen je u smjeru monoklonskih antitijela koja ciljaju razne enzime i faktore u upalnim kaskadama. Trenutno najuspješniji i najkorišteniji imunosupresivi takve vrste jesu imunosupresivi TNF- $\alpha$  koji sprječavaju signalizaciju u imunološkom sustavu prilikom upalnog procesa te anti-integrini i anti-interleukini koji sprječavaju migraciju i aktivaciju stanica imunološkog sustava.

## § 4. CIKLOSPORIN A

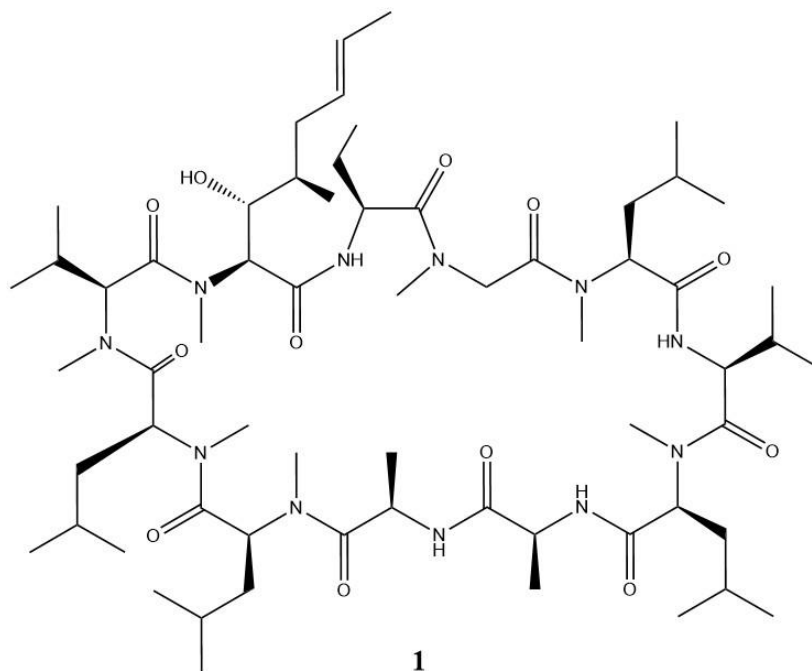
### 4.1. Povijest i uloga

Ciklosporin je smjesa cikličkih peptida prvotno izolirana iz gljivica *Tolypocladium infatum* u laboratoriju farmaceutske tvrtke Sandoz u potrazi za protugljivičnim agensima.<sup>14</sup> Nedugo nakon toga otkrivena su njihova imunosupresivna svojstva zbog čega su se relativno brzo krenuli upotrebljavati u sprječavanju odbacivanja transplatiranog organa. Ciklosporin A, ciklički je peptid koji pripada obitelji ciklosporina i najčešće se koristi kod transplantacije organa i koštane srži, ali i za liječenje reumatoidnog artritisa, psorijaze te ulceroznog kolitisa. Poluvrijeme eliminacije iznosi mu 6.4-8.7 sati, a razgrađuje se u jetri uz pomoć sustava citokroma p450 pri čemu nastaju primarni metaboliti koji se dalje oksidiraju do sekundarnih metabolita. Metaboliti ciklosporina A nemaju imunosupresivnu ulogu, a k tome su i nefrotoksični.<sup>15</sup>

### 4.2. Struktura

Kao što je već spomenuto ciklosporin je ciklički peptid sastavljen od 11 aminokiselina (slika 5). Jedna od aminokiselina je D-alanin što je rijetkost, s obzirom da su aminokiseline prirodnih peptida velikom većinom L konfiguracije. 7 od 11 amino skupina peptidnih veza je metilirano čime je osigurana veća stabilnost i otpornost na enzimsku razgradnju, što omogućava i veću bioraspoloživost. Za biološku aktivnost posebno je važna aminokiselina (2*S*,3*R*,4*R*,6*E*)-3-hidroksi-4-metil-2-metilamino-6-oktenska kiselina (MeBmt), dok i  $\alpha$ -aminobutiratna kiselina i *N*-metilglicin imaju ulogu u interakciji s imunofilinom.





Slika 5. Strukturna formula ciklosporina A

### 4.3. Fizikalno-kemijska svojstva

Ciklosporin A, spoj kemijske formule  $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$  ( $M = 1202.6 \text{ g mol}^{-1}$ ), organska je kruta tvar u obliku bijelog praha ili prizmatskih kristala. Tali se pri 148-151 °C, dok mu gustoća iznosi  $1.02 \text{ g cm}^{-3}$ . Dobro se otapa u acetonu, dietil-eteru i metanolu, ali je slabo topljiv u vodi i fiziološkim otopinama. Za razliku od većine spojeva, povećanjem temperature, topljivost ciklosporina se smanjuje. To se pripisuje intramolekulskim vodikovim vezama koje pri višim temperaturama postaju jače zbog izlaska kristalizacijskih molekula vode koje uzrokuju promjenu konformacije.<sup>16</sup> S obzirom da ne posjeduje ionizacijske skupine, promjenom pH vrijednosti ne može se utjecati na topljivost, stoga poboljšanje topljivosti u obliku soli nije opcija.

### 4.4. Mehanizam djelovanja

Kalcineurin je kalcij/kalmodulin-ovisna proteinska fosfataza koja u fosforiliranom (aktivnom) obliku defosforilira regulatorna mjesta transkripcijskih faktora, uključujući i nuklearni faktor aktiviranih limfocita T (NF-AT). Defosforilacija omogućava NF-AT transport iz citoplazme u jezgru gdje zajedno s ostalim transkripcijskim faktorima uzrokuje aktivaciju gena koji kodiraju za citokine, od kojih je najvažniji IL-2 koji sudjeluje u aktivaciji i proliferaciji limfocita T.

Ciklosporin A veže se na imunofilin ciklofilin. Ciklosporin A-ciklofilin kompleks djeluje kao inhibitor kalcineurina pri čemu sprječava defosforilaciju NF-AT koji ne može ući u jezgru i aktivirati transkripciju. Posljedica toga je da limfociti T ostaju u G0 stanju te ne mogu prijeći u G1 stanje staničnog ciklusa. Slično djelovanje kao i ciklosporin A, posjeduje i takrolimus, samo što se on, umjesto za ciklofilin, veže za FK vezni protein (engl. *FK binding protein*).

Ciklosporin A se osim za ciklofilin A, veže i za ciklofilin D zbog čega je postao predmet promatranja u sprječavanju hipertrofije srčanog mišića. Ciklofilin D je transmembranski protein na unutarnjoj membrani mitohondrija koji je odgovoran za regulaciju otvaranja mitohondrijskih pora. Vezanjem ciklosporina A na ciklofilin D dolazi do blokiranja otvaranja mitohondrijskih pora čime se sprječava otpuštanje citokroma C u citosol gdje potiče apoptozu stanice.

#### 4.5. Totalna sinteza

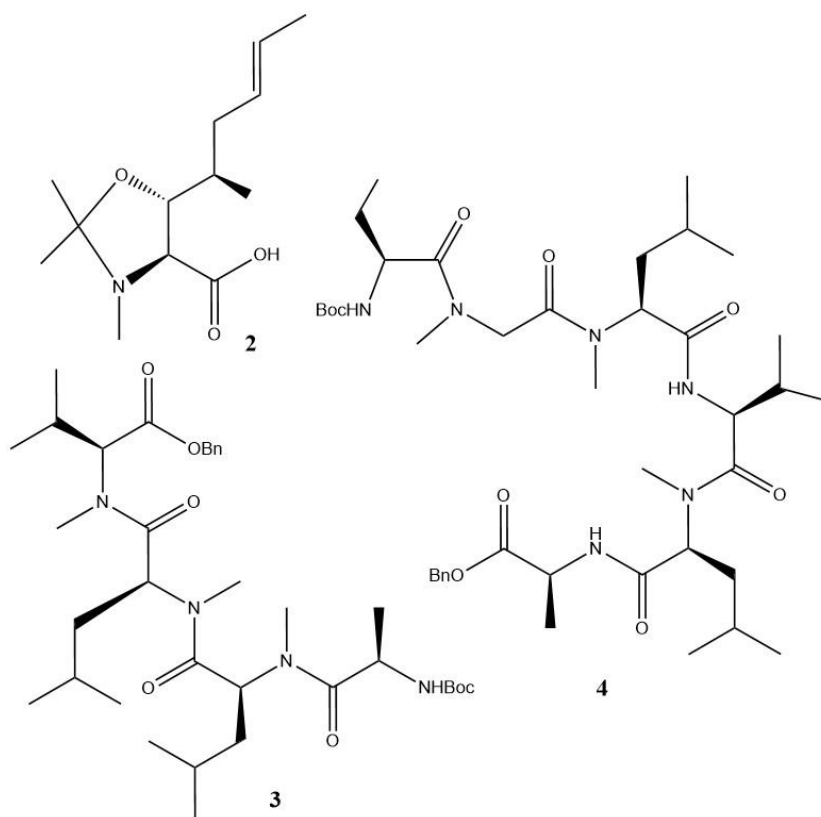
Trenutno su u literaturi poznate dvije totalne sinteze ciklosporina A. Prvu totalnu sintezu ciklosporina A predložio je Ronald M. Wegner 1984. godine.<sup>17</sup> Nakon toga, predložio je još i totalnu sintezu metabolita ciklosporina te totalnu sintezu ciklosporina i metabolita na krutom nosaču.

Iako je otkriven 10ak godina ranije, razlog nemogućnosti sinteze bilo je nepoznavanje strukture ciklosporina u potpunosti, odnosno postojanje MeBmt aminokiseline. Nakon što je otkriveno da je upravo ta aminokiselina potencijalni razlog farmakološke aktivnosti ciklosporina A, javila se potreba za njegovom potpunom sintezom i sintezom njegovih strukturnih analoga.

Druga totalna sinteza ciklosporina A, provedena je 2010. godine. od strane X. Wu-a i suradnika.<sup>18</sup> Cilj njihovog istraživanja bio je predstaviti novu metodu sinteze tercijarnih amida koristeći izonitrile, na zahtjevnijim spojevima. S obzirom da nije predstavljeno puno totalnih sinteza ciklosporina A, koji ima sedam tercijarnih dušikovih atoma, odlučili su se upravo za njega.

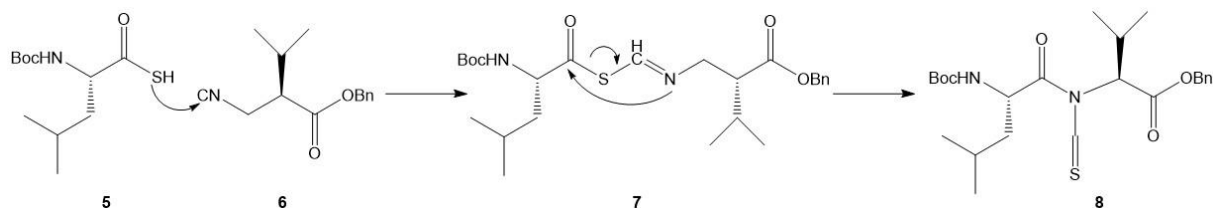
Retrosintetska analiza bila je usmjerena na cijepanje peptidne veze između L-alanina i D-alanina te dviju peptidnih veza unutar MeBmt aminokiseline. Navedenim cijepanjima nastali su MeBmt-acetonid **2**, tetrapeptid **3** i heksapeptid **4** (slika 6). Sintezu MeBmt aminokiseline razradili su Evans i Webber 1986.<sup>19</sup> nakon što je spoznata njezina biološka aktivnost.

Tetrapeptid **3** se može sintetizirati iz pripadajućih dipeptida, dok se heksapeptid **4** može pripremiti iz dipeptidnih i tetrapeptidnih fragmenata.

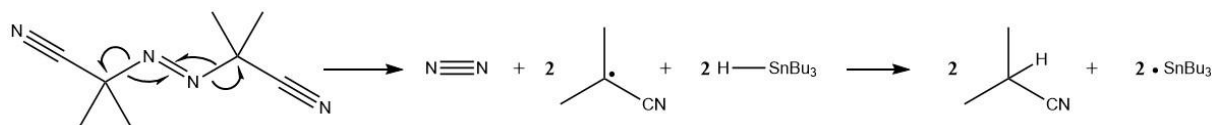


Slika 6. Fragmenti ciklosporina A dobiveni retrosintetskom analizom

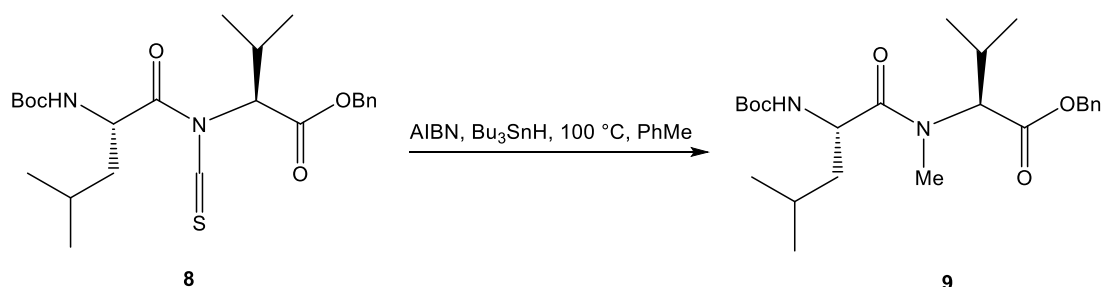
Retrosintetskim cijepanjem peptidne veze tetrapeptida **3** dobivena su dva dipeptida **11** i **14** čije će strukture biti prikazane nešto kasnije. Za pripremu oba dipeptida odmah je u prvom koraku osmišljena tehnika nastajanja tercijarnog amida (slika 7). Kao reaktanti korišteni su tiokiselina leucina **5** i izonitril valina **6**. Nukleofilnim napadom tioesterske skupine na ugljikov atom nastaje međuprodukt **7**, a zatim nukleofilnim napadom dušikovog atoma izonitrilne skupine na karbonilni ugljikov atom dolazi do nastanka *N*-tioformilamida **8**.

Slika 7. Sinteza *N*-tioformilamida **8**

U redukciji tioformilne skupine s Raney-Ni kao reducensom nije došlo do nastanka *N*-metilamida stoga je za redukciju korištena metoda slobodnih radikala. Reagensi koji se koriste kao izvor slobodnih radikala jesu AIBN i  $\text{Bu}_3\text{SnH}$ . AIBN djeluje kao inicijator radikalne reakcije dok je  $\text{Bu}_3\text{SnH}$  prekursor u lančanom prijenosu radikala. Zagrijavanjem AIBN dolazi do izlaska molekule dušika te nastanka dvije molekule radikala koje reagiraju s  $\text{Bu}_3\text{SnH}$ . Veza između kositra i vodika je neionska i vrlo slaba ( $73 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) zbog čega vrlo lagano dolazi do homolitičkog cijepanja i nastanka tributilkositrenih radikala (slika 8).

Slika 8. Aktivacija AIBN i stvaranje  $\text{Bu}_3\text{Sn}$  radikala

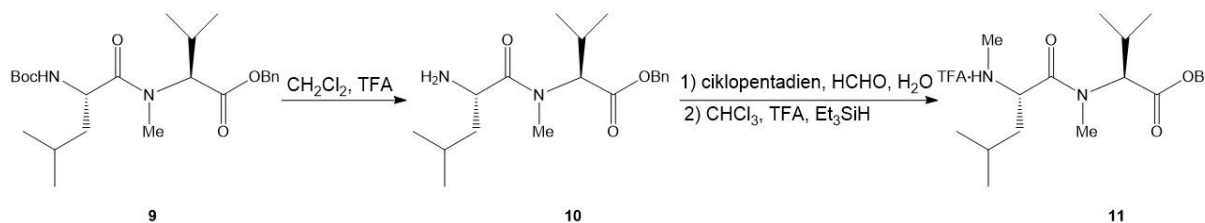
Reakcija je provedena u toluenu kao otapalu pri  $100^\circ\text{C}$  te je izoliran *N*-metildipeptid **9** (slika 9).



Slika 9. Redukcija tioformilne skupine mehanizmom slobodnih radikala uz AIBN kao reagens

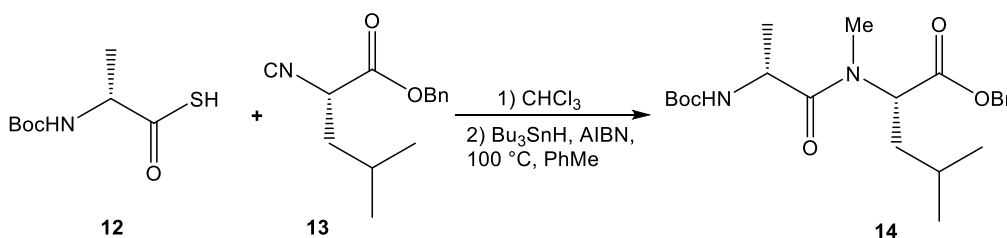
Za uklanjanje *t*-Boc zaštitne skupine korištena je otopina trifluoroctene kiseline u diklormetanu (slika 10). Dodavanje metilne skupine na dušikov atom bez epimerizacije ostvareno je retro-

aza-Diels-Alderovom metilacijom. Reakcija započinje *in situ* generiranjem imina reakcijom između amina i formaldehida. Nastali imin zatim reagira s ciklopentadienom kako bi nastao aza-nonbornen. Redukcijom pomoću trietilsilana ( $\text{Et}_3\text{SiH}$ ) u otopini trifluoroctene kiseline dobiven je željeni dipeptid **11**.



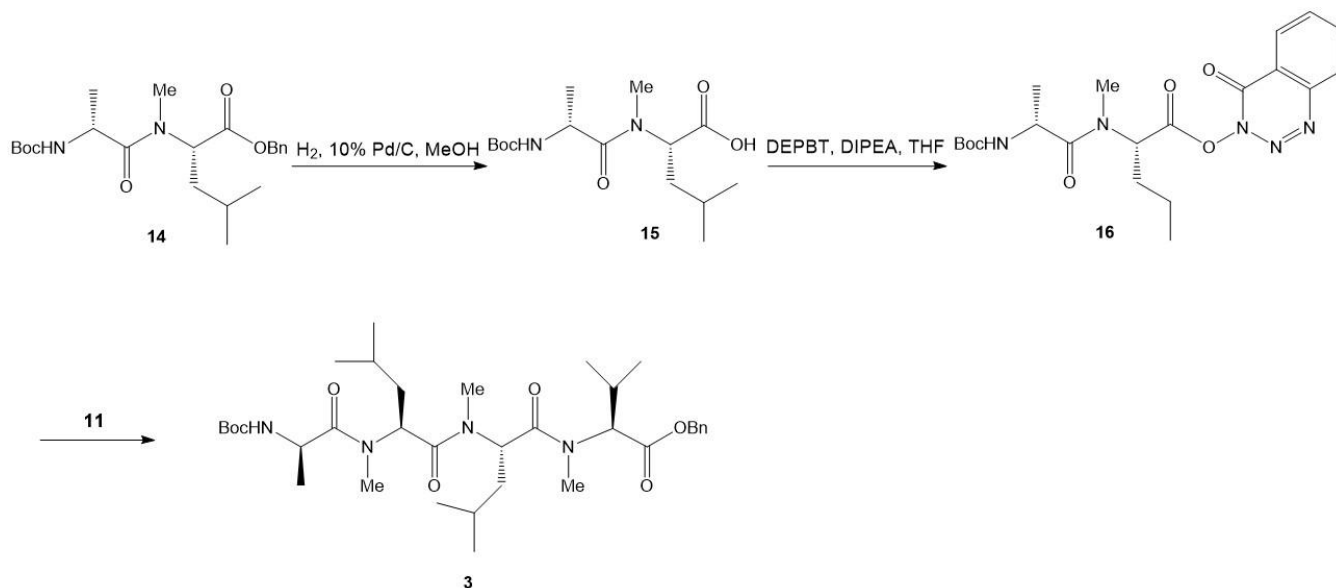
Slika 10. Uklanjanje zaštitne skupine s N-kraja i metilacija primarnog amina

Za sintezu drugog dipeptida koji sačinjava tetrapeptid **3** korištena je ista analogija. Reaktanti, D-alanin-tiokiselina **12** i izonitril leucina **13**, pomiješani su u kloroformu pri sobnoj temperaturi, a zatim reducirani pomoću slobodnih radikala uz iste reagense kako bi se dobio *N*-metilirani dipeptid **14**.



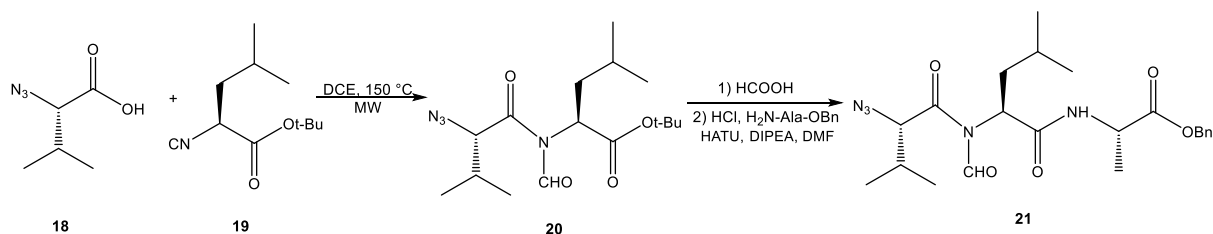
Slika 11. Sinteza *N*-metiliranog dipeptida **14**

Za spajanje dvaju dipeptida prvo je potrebno ukloniti benzilni ester koji djeluje kao zaštitna skupina karboksilne kiseline (slika 12). Za njegovo uklanjanje je korištena metoda hidrogenolize uz Pd/C kao katalizator. Zatim je za stvaranje peptidne veze potrebno aktivirati karboksilnu kiselinu kako bi ju mogla napasti amino skupina dipeptida **11**. Kao aktivirajući reagens koristi se DEPBT koji uz pomoć baze DIPEA u THF kao otapalu tvori aktivirani esterski međuprodukt koji reagira s amino skupinom i dolazi do nastanka peptidne veze, odnosno tetrapeptida **3**.



Slika 12. Uklanjanje zaštitne skupine, aktivacija karboksilne kiseline **15** i sinteza tetrapeptida **11**

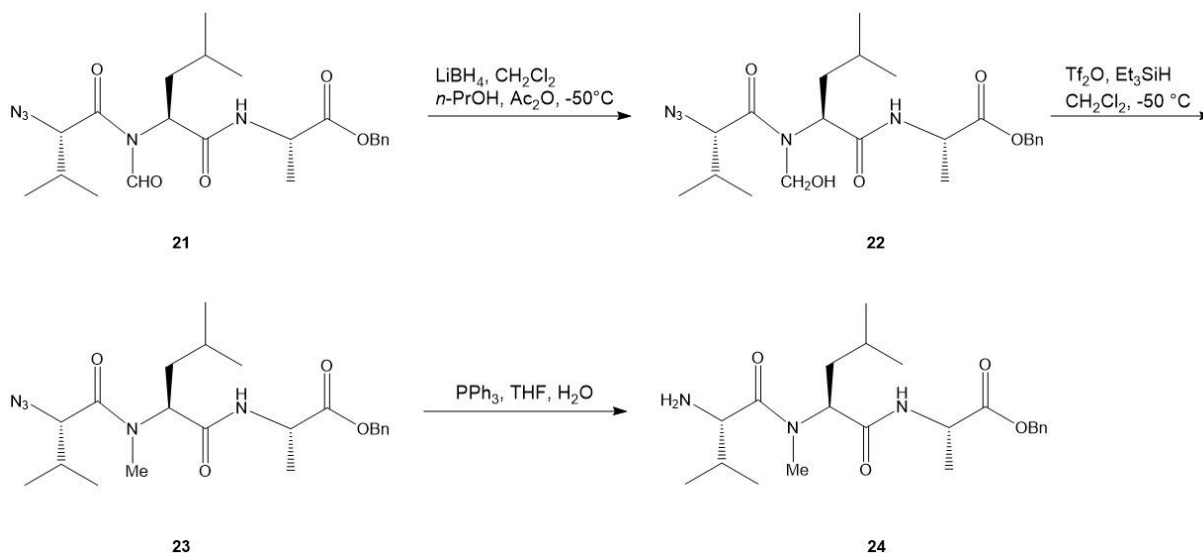
Nakon sinteze tetrapeptida, potrebno je sintetizirati i heksapeptid **4**. Mikrovalnim zračenjem reaktanata, azido-kiseline **18** i izonitrila leucina **19** s *tert*-butilnom esterskom zaštitom, provedena je sinteza *N*-formilamida **20** (slika 13). Formilna skupina nije odmah reducirana do metilne već je zadržana kako bi se smanjila mogućnost stvaranja oksazolona što bi dovelo do epimerizacije prilikom stvaranja peptidne veze sa zaštićenim alaninom na C-kraju. *Tert*-butilna esterska skupina je uklonjena s C kraja dipeptida pomoću mravlje kiseline. Aktivacijom karboksilne skupine na *N*-kraju ovaj je put korišten HATU zajedno s DIPEA u DMF kao otapalu, što je omogućilo nukleofilni napad amino skupine alanina zaštićenog benzilnom esterskom skupinom i nastanak azidnog tripeptida **21**.



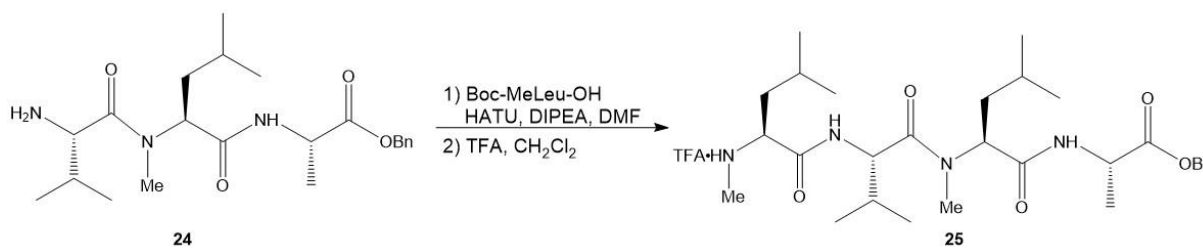
Slika 13. Mikrovalna sinteza tripeptida **21**

Za redukciju formilne skupine korištena je kombinacija litijeva borhidrida i acetanhidrida u smjesi diklormetana i *n*-propanola na  $-50\text{ }^\circ\text{C}$  te je dobiven nestabilni *N*-

hidroksimetilni međuprodukt **22** (slika 14). Anhidrid trifluormetansulfonske kiseline ( $\text{Tf}_2\text{O}$ ) se koristi kako bi aktivirao hidroksimetilnu skupinu koju će reducirati trietilsilan u diklormetanu čime nastaje *N*-metilirani tripeptid **23**. Za redukciju azida u amin korištena je Staudingerova redukcija gdje prvo nastaje iminofosforan nakon nukleofilnog napada trifenilfosfina na terminalni dušikov atom azida. Hidrolizom iminofosforana dolazi do nastajanja amina **24**.

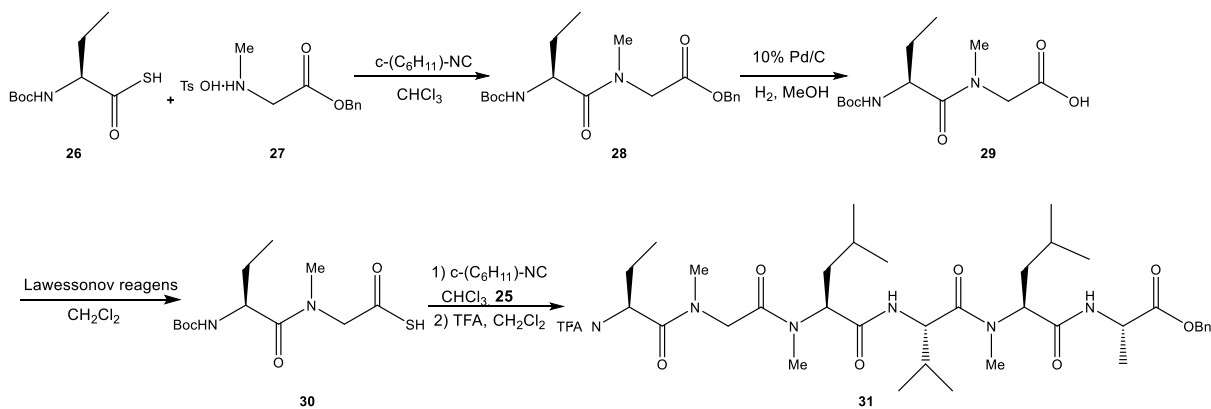
Slika 14. Sinteza tripeptida **24**

Posljednji korak u sintezi tetrapeptida **25** je dodatak *t*-Boc zaštićenog metilleucina na N-kraj (slika 15). S obzirom da će se na N-kraj tetrapeptida vezati dipeptid, zaštitna *t*-Boc skupina uklonjena je pomoću trifluoroctene kiseline u diklormetanu.

Slika 15. Sinteza tetrapeptida **25**

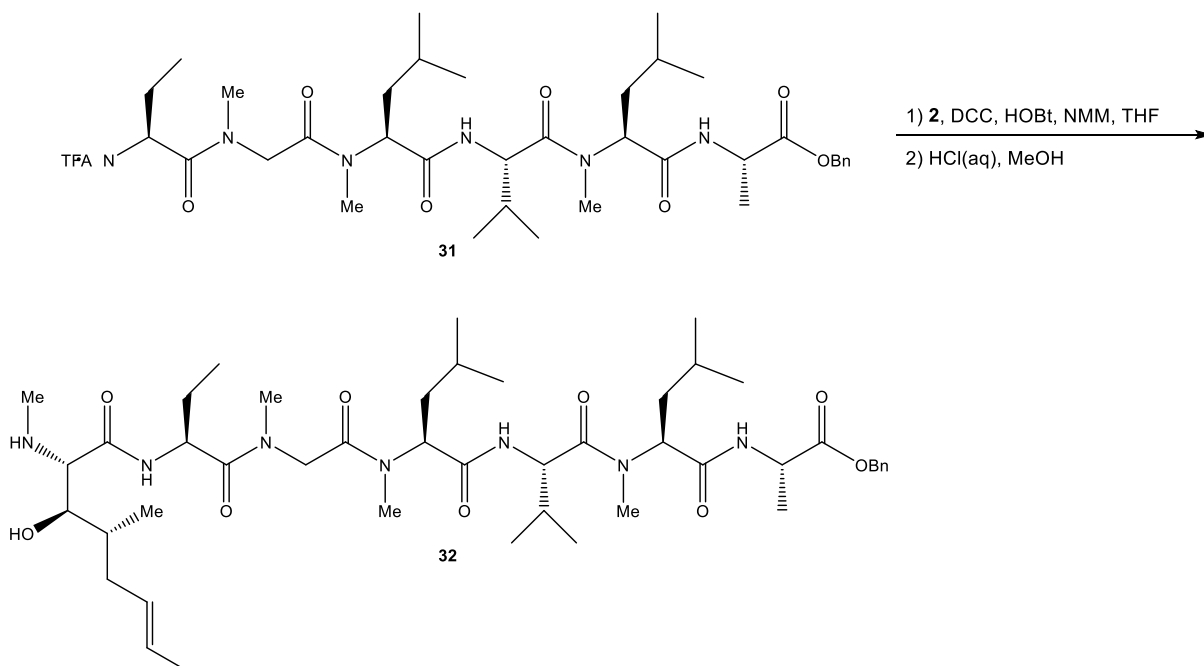
Sinteza dipeptida koji će se adirati na tetrapeptid započinje s tiokiselinom **26** (slika 16) koja je dodana u reakcijsku smjesu s cikloheksil-izonitriplom u kloroformu pri čemu nastaje formimidat-tiokarboksilat mješoviti anhidrid kojeg napada amino skupina spoja **27** te nastaje dipeptid **28**. Hidrogenolizom benzilnog estera dipeptida **28** dobiven je derivat **29**. Karboksilna skupina dobivenog dipeptida **29** može se prevesti u tiokiselinu pomoću Lawessonova reagensa pri sobnim ili mikrovalnim uvjetima. Nastala tiokiselina **30** zatim opet sudjeluje u formiranju

miješovitog anhidrida pomoću izonitrila kojeg napada sekundarnim amin pripravljenog tetrapeptida **25**. Uklanjanjem *t*-Boc zaštitne skupine dobiven je heksapeptid **31**.



Slika 16. Sinteza heksapeptida **31**

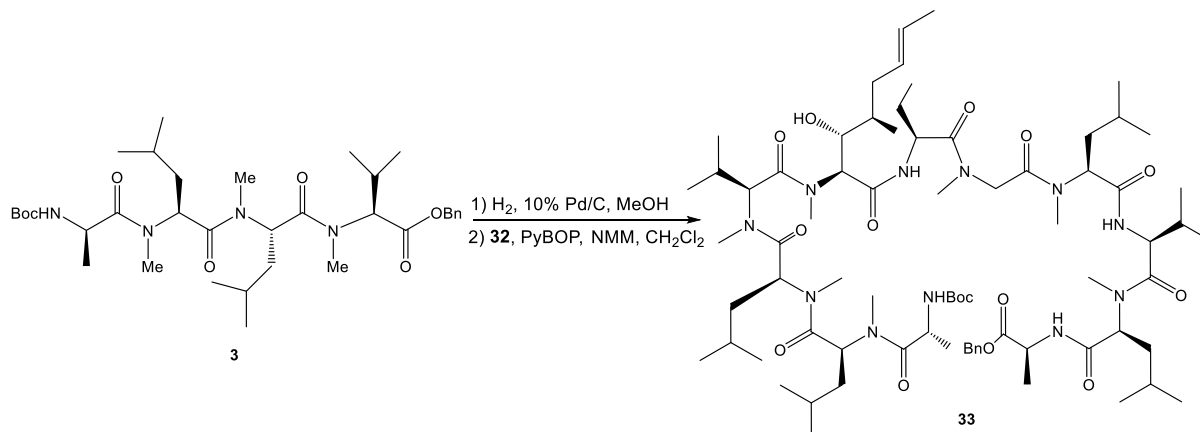
Karboksilna skupina zaštićene MeBmt aminokiseline **2** je aktivirana s dicikloheksilkarbodiimidom (DCC) i hidroksibenzotriazolom (HOBt) čime je omogućen nukleofilni napad amino skupine heksapeptida **31** te nastajanje heptapeptida **32** (slika 17).



Slika 17. Sinteza heptapeptida **32**

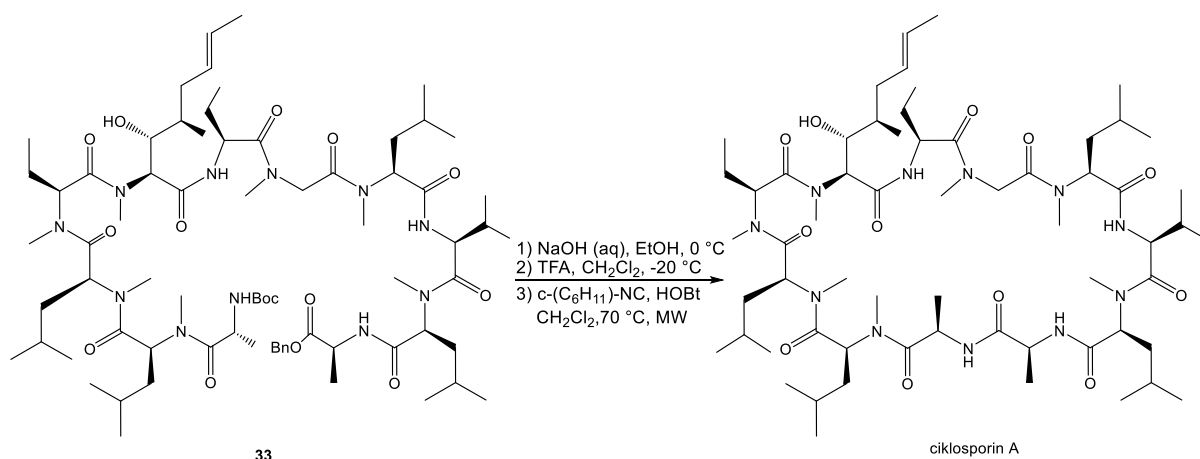


Hidrogenolizom C-kraja tetrapeptida **3** i aktivacijom karboksilne skupine pomoću PyBOP, omogućen je nukleofilni napad amino skupine MeBmt aminokiseline heptapeptida **32** i nastajanje undekapeptida **33** (slika 18).



Slika 18. Sinteza undekapeptida **33**

Hidrolizom u lužnatom je skinuta zaštita s karboksilne skupine, a zatim je zakiseljavanjem otopine pomoću trifluoroctene kiseline skinuta i zaštita s N kraja. Ciklizacija prstena, odnosno stvaranje peptidne veze, omogućeno je još jednim izonitrilnim sprežanjem pomoću 10 ekvivalenata cikloheksil-izonitrila pri  $70^\circ\text{C}$  te uz mikrovalno zračenje (slika 19).



Slika 19. Zadnji korak sinteze ciklosporina A

## § 5. ZAKLJUČAK

Imunosupresivi su promijenili tijek moderne medicine, osobito u područjima transplantacije organa i regulacije autoimunih bolesti i alergija. To su postigli umanjenjem nuspojava, usporavanjem razvoja bolesti te su uvelike unaprijedili kvalitetu života pacijenata. Jedan od najznačajnijih imunosupresiva je i ciklosporin A, koji je tu titulu stekao zbog široke upotrebe i velike učinkovitosti osobito pri transplantaciji organa. Iako njegova totalna sinteza i dalje nije komercijalno isplativa, pomoću nje su razvijene pojedine tehnike koje mogu poslužiti u sintezi peptida, cikličkih peptida i mnogih drugih biološki aktivnih spojeva. Omogućila je uvid i u sintezu njegovih modificiranih analoga za koje se vjeruje da će posjedovati bolju biološku aktivnost i primjenjivost uz manje nuspojava.

## § 6. POPIS KRATICA

AIBN	azobisizobutironitril
Bu <sub>3</sub> SnH	tributilkositrov hidrid
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	diklormetan
DCE	1,2-dikloretan
DEPBT	3-dietoksifosforiloksi-1,2,3-benzotriazin-4(3 <i>H</i> )-on
DIPEA	<i>N,N</i> -diizopropiletilamin
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
EtOH	etanol
HATU	1-[bis(dimetilamino)metilen]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol[4,5- b]piridinijev 3-oksidgeksafluorfosfat
HOBt	hidroksibenzotriazol
MW	
zračenje	mikrovalno zračenje
NaOH	natrijev hidroksid
NMM	<i>N</i> -metilmorforlin
Bn	benzil
PhMe	toluen
PyBOP	benzotriazol-1-iloksitripirolidinofosfonijev heksafluorfosfat
<i>t</i> -Boc	<i>tert</i> -butoksikarbonil
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -butil
TFA	trifluorocetna kiselina
THF	tetrahidrofuran
TsOH	<i>p</i> -toluensulfonska kiselina

## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/immune-system>  
(datum pristupa: 2. svibnja 2023.)
2. C. A. Janeway, P. Travers, M. Walport et al. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. Garland Science, New York, 2001
3. J. Lukač, *Klinička imunologija*, Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2004
4. L. Sompayrac, *How the immune system works*, Wiley Blackwell, New York, 2016
5. A. K. Abbas, S. Pillai, A. H. Lichtman, *Basic immunology: functions and disorders of the immune system*, Elsevier Saunders, Philadelphia, 2013
6. S. Awate, L.A. Babiuk, G. Mutwiri, *Frontiers in Immunology* **4** (2013)
7. P. Marrack, A. S. McKee, M. W. Munks, *Nature Reviews Immunology* **9** (2009) 287–293
8. M. Bulat, J. Geber, Z. Lacković, *Medicinska farmakologija*, Medicinska naklada, Zagreb, 1999
9. M. Meneghini, O. Bestard, J. M. Grinyo, *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **54-55** (2021)
10. J. D. Powell, K. N. Pollizzi, E. B. Heikamp, M. R. Horton, *Annu Rev Immunol* **30** (2012) 39-68
11. D. A. Guertin, D. M. Sabatini, *Science Signalling* **2** (2009)
12. <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=3065> (datum pristupa: 25. 6. 2023.)
13. P. Karran, N. Attard, *Nature Reviews. Cancer* **8** (2008) 24–36.
14. D. Tedesco, L. Haragsim, *Journal of Transplantation* **4** (2012)
15. R. M. Wenger, *Transplant Proc.* **22** (1990) 1104-1108
16. A. E. Wiącek, M. Jurak, A. Ładniak, K. Przykaza, K. Szafran, *Colloids and Interfaces* **4** (2020),
17. R. M. Wenger, K. Martin, C. Timbers, A. Tromelin, *Chimia* **46** (1992) 314-322
18. X. Wu, J. L. Stockdill, P. Wang, S. J. Danishefsky, *Journal of the American Chemical Society* **132** (2010) 4098-4100
19. A. D. Evans, A. E. Weber, *J. Am. Chem. Soc.* **108** (1986) 6757-6761