

Autor rozprawy:

Monika Gensicka-Kowalewska

Tytuł rozprawy doktorskiej:

Synteza i ocena biologiczna  
oligopeptydowych analogów akrydyny/  
akrydonu jako potencjalnych leków  
przeciwnowotworowych

## Spis treści

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW I SYMBOLI .....	8
STRESZCZENIE .....	13
SUMMARY .....	15
WSTĘP.....	16
1. CZĘŚĆ LITERATUROWA.....	17
1.1. Synteza pochodnych akrydyny/akrydonu.....	17
1.1.1. Synteza peptydowych pochodnych akrydyny .....	22
1.2. Aktywność biologiczna pochodnych akrydyny/akrydonu .....	26
1.2.1. Interakcje akrydyn z kwasami nukleinowymi .....	26
1.2.2. Inhibitory ludzkiej anhidrazy węglanowej .....	29
1.2.3. Inhibitory acetylocholinesterazy .....	30
1.2.4. Pochodne akrydyny o aktywności przeciwbakteryjnej i przeciw pasożytniczej .....	33
1.2.5. Pochodne akrydyny o aktywności przeciwnowotworowej .....	37
1.3. Tuftsyna.....	45
1.3.1. Właściwości tuftsyny .....	46
2. CEL I ZAKRES PRACY .....	49
3. WYNIKI WŁASNE .....	52
3.1. Prace syntetyczne .....	52
3.1.1. Synteza pochodnych akrydyny ( <b>125a-b</b> ).....	52
3.1.2. Synteza pochodnej akrydonu ( <b>130</b> ).....	54
3.1.3. Synteza odpowiednio chronionych pochodnych tuftsyny ( <b>143a-d</b> ).....	54
3.1.4. Synteza odpowiednio chronionych pochodnych retro-tuftsyny ( <b>153a-d</b> ).....	57
3.1.5. Synteza peptydowych pochodnych 1-nitroakrydyny ( <b>115a-e, 117</b> ) oraz 4-metylo-1-nitroakrydyny ( <b>116a-e, 118</b> ) .....	59
3.1.6. Synteza peptydowych pochodnych akrydonu ( <b>119a-e, 120a-e</b> ).....	63
3.2. Badania biologiczne .....	66
3.2.1. Analiza przeżywalności komórek czerniaka i neuroblastomy metodą XTT .....	67
3.2.1.1. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej metodą XTT nowych pochodnych akrydyny/akrydonu wobec amelanotycznych Ab i melanotycznych Ma komórek czerniaka i dwóm postaciom neuroblastomy SHSY5Y: cholinergicznej DC i dopaminergicznej NC.....	68
3.2.2. Apoptoza .....	69
3.2.2.1. Esternalizacja fosfatydyloseryny.....	70
3.2.2.2. Aktywacja kaspaz.....	71
3.2.2.3. Uszkodzone komórki w obszarze sub-G1 .....	71
3.2.3. Analiza przeżywalności komórek Jurkat i PBMC metodą MTT.....	72

3.2.3.1. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej metodą MTT nowych pochodnych akrydyny/akrydonu wobec komórek Jurkat oraz aktywowanych limfocytów .....	72
3.2.4. Oznaczenie szybkości zużycia związków przez komórki Jurkat na przykładzie związku ( <b>117</b> ) z wykorzystaniem chromatografii HPLC .....	77
4. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA .....	79
4.1. Materiały i metody stosowane podczas syntezy .....	79
4.2. Synteza 9-fenoksy-1-nitroakrydyny ( <b>125a</b> ) .....	82
4.2.1. Synteza soli potasowej kwasu <i>o</i> -chlorobenzoesowego ( <b>121</b> ) .....	82
4.2.2. Synteza kwasu <i>N</i> -(3'-nitrofenylo)antranilowego ( <b>123a</b> ) .....	82
4.2.3. Synteza 9-chloro-1-nitroakrydyny ( <b>124a</b> ) i 9-fenoksy-1-nitroakrydyny ( <b>125a</b> ) .....	82
4.3. Synteza 9-fenoksy-4-metylo-1-nitroakrydyny ( <b>125b</b> ) .....	83
4.3.1. Synteza kwasu <i>N</i> -(2'-metylo-5'-nitrofenylo)antranilowego ( <b>123b</b> ) .....	83
4.3.2. Synteza 9-chloro-4-metylo-1-nitroakrydyny ( <b>124b</b> ) i 9-fenoksy-4-metylo-1-nitroakrydyny ( <b>125b</b> ) .....	83
4.4. Synteza 1-chloro-4-nitro-9(10 <i>H</i> )-akrydonu ( <b>130</b> ) .....	84
4.4.1. Synteza kwasu <i>N</i> -(5'-chloro-2'-nitrofenylo)antranilowego ( <b>129</b> ) .....	84
4.4.2. Synteza 1-chloro-4-nitro-9(10 <i>H</i> )-akrydonu ( <b>130</b> ) .....	84
4.4. Synteza pochodnych tuftsyny/retro-tuftsyny .....	85
4.4.1. Synteza tuftsyny ( <b>140</b> ) .....	85
4.4.1.1. Synteza Boc-Pro-OH ( <b>131</b> ) .....	85
4.4.1.2. Synteza Boc-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ( <b>133</b> ) .....	85
4.4.1.3. Synteza Boc-Lys(Fmoc)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ( <b>136</b> ) .....	86
4.4.1.4. Synteza Boc-Thr-Lys(Fmoc)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ( <b>139</b> ) .....	86
4.4.1.5. Synteza Boc-Thr-Lys-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ( <b>140</b> ) .....	87
4.4.2. Synteza pochodnych tuftsyny ( <b>142a-d</b> ) .....	87
4.4.2.1. Synteza Boc-Thr-Lys(GlyFmoc)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ( <b>142a</b> ) .....	87
4.4.2.2. Synteza Boc-Thr-Lys( $\beta$ -AlaFmoc)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ( <b>142b</b> ) .....	87
4.4.2.3. Synteza Boc-Thr-Lys(ValFmoc)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ( <b>142c</b> ) .....	88
4.4.2.4. Synteza Boc-Thr-Lys(LeuFmoc)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ( <b>142d</b> ) .....	88
4.4.3. Synteza retro-tuftsyny ( <b>151</b> ) .....	89
4.4.3.1. Synteza Boc-Lys(Fmoc)-Thr-OCH <sub>3</sub> ( <b>145</b> ) .....	89
4.4.3.2. Synteza Boc-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OCH <sub>3</sub> ( <b>147</b> ) .....	89
4.4.3.3. Synteza Boc-Arg(NO <sub>2</sub> )-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OCH <sub>3</sub> ( <b>150</b> ) .....	89
4.4.3.4. Synteza Boc-Arg(NO <sub>2</sub> )-Pro-Lys-Thr-OCH <sub>3</sub> ( <b>151</b> ) .....	90
4.4.4. Synteza pochodnych retro-tuftsyny ( <b>153a-d</b> ) .....	90
4.4.4.1. Synteza Boc-Arg(NO <sub>2</sub> )-Pro-Lys(GlyFmoc)-Thr-OCH <sub>3</sub> ( <b>153a</b> ) .....	90
4.4.4.2. Synteza Boc-Arg(NO <sub>2</sub> )-Pro-Lys( $\beta$ -AlaFmoc)-Thr-OCH <sub>3</sub> ( <b>153b</b> ) .....	90
4.4.4.3. Synteza Boc-Arg(NO <sub>2</sub> )-Pro-Lys(ValFmoc)-Thr-OCH <sub>3</sub> ( <b>153c</b> ) .....	90

4.4.4.4. Synteza Boc-Arg(NO <sub>2</sub> )-Pro-Lys(LeuFmoc)-Thr-OCH <sub>3</sub> ( <b>153d</b> ).....	91
4.4.5. Deprotekcja osłony Boc z chronionych peptydów .....	91
4.4.5.1. Synteza TFAXPro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ( <b>134</b> ).....	91
4.4.5.2. Synteza TFAXLys(Fmoc)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ( <b>137</b> ).....	91
4.4.5.3. Synteza TFAXThr-Lys(Fmoc)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ( <b>154</b> ) .....	92
4.4.5.4. Synteza TFAXThr-Lys(GlyFmoc)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ( <b>143a</b> ) .....	92
4.4.5.5. Synteza TFAXThr-Lys(β-AlaFmoc)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ( <b>143b</b> ) .....	92
4.4.5.6. Synteza TFAXThr-Lys(ValFmoc)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ( <b>143c</b> ).....	92
4.4.5.7. Synteza TFAXThr-Lys(LeuFmoc)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ( <b>143d</b> ).....	92
4.4.5.8. Synteza TFAXLys(Fmoc)-Thr-OCH <sub>3</sub> ( <b>146</b> ).....	93
4.4.5.9. Synteza TFAXPro-Lys(Fmoc)-Thr-OCH <sub>3</sub> ( <b>148</b> ).....	93
4.4.5.10. Synteza TFAXArg(NO <sub>2</sub> )-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OCH <sub>3</sub> ( <b>155</b> ).....	93
4.4.5.11. Synteza TFAXArg(NO <sub>2</sub> )-Pro-Lys(GlyFmoc)-Thr-OCH <sub>3</sub> ( <b>153a</b> ).....	94
4.4.5.12. Synteza TFAXArg(NO <sub>2</sub> )-Pro-Lys(β-AlaFmoc)-Thr-OCH <sub>3</sub> ( <b>153b</b> ) .....	94
4.4.5.13. Synteza TFAXArg(NO <sub>2</sub> )-Pro-Lys(ValFmoc)-Thr-OCH <sub>3</sub> ( <b>153c</b> ) .....	94
4.4.5.14. Synteza TFAXArg(NO <sub>2</sub> )-Pro-Lys(FmocLeu)-Thr-OCH <sub>3</sub> ( <b>153d</b> ).....	94
4.5. Synteza peptydowych pochodnych 1-nitroakrydyny ( <b>156a-e, 160</b> ).....	95
4.5.1. Synteza 9-[Thr-Lys(Fmoc)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ]-1-nitroakrydyny ( <b>156a</b> ) .....	95
4.5.2. Synteza 9-[Thr-Lys(GlyFmoc)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ]-1-nitroakrydyny ( <b>156b</b> ) .....	95
4.5.3. Synteza 9-[Thr-Lys(β-AlaFmoc)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ]-1-nitroakrydyny ( <b>156c</b> ).....	96
4.5.4. Synteza 9-[Thr-Lys(ValFmoc)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ]-1-nitroakrydyny ( <b>156d</b> ).....	96
4.5.5. Synteza 9-[Thr-Lys(LeuFmoc)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ]-1-nitroakrydyny ( <b>156e</b> ).....	96
4.5.6. Synteza 9-[Arg(NO <sub>2</sub> )-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OCH <sub>3</sub> ]-1-nitroakrydyny ( <b>160</b> ).....	97
4.6. Deprotekcja osłony Fmoc z peptydowych pochodnych 1-nitroakrydyny .....	97
4.6.1. Synteza HClx9-[Thr-Lys-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ]-1-nitroakrydyny ( <b>115a</b> ) .....	97
4.6.2. Synteza HClx9-[Thr-Lys(Gly)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ]-1-nitroakrydyny ( <b>115b</b> ).....	98
4.6.3. Synteza HClx9-[Thr-Lys(β-Ala)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ]-1-nitroakrydyny ( <b>115c</b> ) .....	99
4.6.4. Synteza HClx9-[Thr-Lys(Val)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ]-1-nitroakrydyny ( <b>115d</b> ) .....	99
4.6.5. Synteza HClx9-[Thr-Lys(Leu)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ]-1-nitroakrydyny ( <b>115e</b> ).....	100
4.6.6. Synteza HClx9-[Arg(NO <sub>2</sub> )-Pro-Lys-Thr-OCH <sub>3</sub> ]-1-nitroakrydyny ( <b>117</b> ).....	101
4.7. Synteza peptydowych pochodnych 4-metylo-1-nitroakrydyny ( <b>157a-e, 161</b> ) .....	102
4.7.1. Synteza 9-[Thr-Lys(Fmoc)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ]-4-metylo-1-nitroakrydyny ( <b>157a</b> ) .....	102
4.7.2. Synteza 9-[Thr-Lys(GlyFmoc)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ]-4-metylo-1-nitroakrydyny ( <b>157b</b> ).....	102
4.7.3. Synteza 9-[Thr-Lys(β-AlaFmoc)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ]-4-metylo-1-nitroakrydyny ( <b>157c</b> )....	102
4.7.4. Synteza 9-[Thr-Lys(ValFmoc)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ]-4-metylo-1-nitroakrydyny ( <b>157d</b> ) .....	103
4.7.5. Synteza 9-[Thr-Lys(LeuFmoc)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ]-4-metylo-1-nitroakrydyny ( <b>157e</b> ).....	103
4.7.6. Synteza 9-[Arg(NO <sub>2</sub> )-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OCH <sub>3</sub> ]-4-metylo-1-nitroakrydyny ( <b>161</b> ).....	103

4.8. Deprotekcja osłony Fmoc z peptydowych pochodnych 4-metylo-1-nitroakrydyny .....	104
4.8.1. Synteza HClx9-[Thr-Lys-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ]-4-metylo-1-nitroakrydyny ( <b>116a</b> ) .....	104
4.8.2. Synteza HClx9-[Thr-Lys(Gly)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ]-4-metylo-1-nitroakrydyny ( <b>116b</b> ) .....	104
4.8.3. Synteza HClx9-[Thr-Lys(β-Ala)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ]-4-metylo-1-nitroakrydyny ( <b>116c</b> ) ....	105
4.8.4. Synteza HClx9-[Thr-Lys(Val)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ]-4-metylo-1-nitroakrydyny ( <b>116d</b> ) .....	106
4.8.5. Synteza HClx9-[Thr-Lys(Leu)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ]-4-metylo-1-nitroakrydyny ( <b>116e</b> ) .....	107
4.8.6. Synteza HClx9-[Arg(NO <sub>2</sub> )-Pro-Lys-Thr-OCH <sub>3</sub> ]-4-metylo-1-nitroakrydyny ( <b>118</b> ) .....	108
4.9. Synteza peptydowych pochodnych 4-nitro-9(10 <i>H</i> )-akrydonu ( <b>164a-e</b> , <b>166a-e</b> ) .....	108
4.9.1. Synteza 1-[Thr-Lys(Fmoc)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ]-4-nitro-9(10 <i>H</i> )-akrydonu ( <b>164a</b> ) .....	108
4.9.2. Synteza 1-[Thr-Lys(GlyFmoc)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ]-4-nitro-9(10 <i>H</i> )-akrydonu ( <b>164b</b> ) .....	109
4.9.3. Synteza 1-[Thr-Lys(β-AlaFmoc)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ]-4-nitro-9(10 <i>H</i> )-akrydonu ( <b>164c</b> ) .....	109
4.9.4. Synteza 1-[Thr-Lys(ValFmoc)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ]-4-nitro-9(10 <i>H</i> )-akrydonu ( <b>164d</b> ) .....	110
4.9.5. Synteza 1-[Thr-Lys(LeuFmoc)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ]-4-nitro-9(10 <i>H</i> )-akrydonu ( <b>164e</b> ) .....	110
4.9.6. Synteza 1-[Arg(NO <sub>2</sub> )-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OCH <sub>3</sub> ]-4-nitro-9(10 <i>H</i> )-akrydonu ( <b>166a</b> ) .....	110
4.9.7. Synteza 1-[Arg(NO <sub>2</sub> )-Pro-Lys(GlyFmoc)-Thr-OCH <sub>3</sub> ]-4-nitro-9(10 <i>H</i> )-akrydonu ( <b>166b</b> ) .....	111
4.9.8. Synteza 1-[Arg(NO <sub>2</sub> )-Pro-Lys(β-AlaFmoc)-Thr-OCH <sub>3</sub> ]-4-nitro-9(10 <i>H</i> )-akrydonu ( <b>166c</b> ) .....	111
4.9.9. Synteza 1-[Arg(NO <sub>2</sub> )-Pro-Lys(ValFmoc)-Thr-OCH <sub>3</sub> ]-4-nitro-9(10 <i>H</i> )-akrydonu ( <b>166d</b> ) .....	111
4.9.10. Synteza 1-[Arg(NO <sub>2</sub> )-Pro-Lys(LeuFmoc)-Thr-OCH <sub>3</sub> ]-4-nitro-9(10 <i>H</i> )-akrydonu ( <b>166e</b> ) .....	112
4.10. Deprotekcja osłony Fmoc z peptydowych pochodnych 4-nitro-9(10 <i>H</i> )-akrydonu .....	112
4.10.1. Synteza HClx1-[Thr-Lys-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ]-4-nitro-9(10 <i>H</i> )-akrydonu ( <b>119a</b> ) .....	112
4.10.2. Synteza HClx1-[Thr-Lys(Gly)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ]-4-nitro-9(10 <i>H</i> )-akrydonu ( <b>119b</b> ) .....	113
4.10.3. Synteza HClx1-[Thr-Lys(β-Ala)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ]-4-nitro-9(10 <i>H</i> )-akrydonu ( <b>119c</b> ) ....	113
4.10.4. Synteza HClx1-[Thr-Lys(Val)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ]-4-nitro-9(10 <i>H</i> )-akrydonu ( <b>119d</b> ) .....	114
4.10.5. Synteza HClx1-[Thr-Lys(Leu)-Pro-Arg(NO <sub>2</sub> )-OCH <sub>3</sub> ]-4-nitro-9(10 <i>H</i> )-akrydonu ( <b>119e</b> ) .....	115
4.10.6. Synteza HClx1-[Arg(NO <sub>2</sub> )-Pro-Lys-Thr-OCH <sub>3</sub> ]-4-nitro-9(10 <i>H</i> )-akrydonu ( <b>120a</b> ) .....	116
4.10.7. Synteza HClx1-[Arg(NO <sub>2</sub> )-Pro-Lys(Gly)-Thr-OCH <sub>3</sub> ]-4-nitro-9(10 <i>H</i> )-akrydonu ( <b>120b</b> ) .....	116
4.10.8. Synteza HClx1-[Arg(NO <sub>2</sub> )-Pro-Lys(β-Ala)-Thr-OCH <sub>3</sub> ]-4-nitro-9(10 <i>H</i> )-akrydonu ( <b>120c</b> ) ....	117
4.10.9. Synteza HClx1-[Arg(NO <sub>2</sub> )-Pro-Lys(Val)-Thr-OCH <sub>3</sub> ]-4-nitro-9(10 <i>H</i> )-akrydonu ( <b>120d</b> ) .....	118
4.10.10. Synteza HClx1-[Arg(NO <sub>2</sub> )-Pro-Lys(Leu)-Thr-OCH <sub>3</sub> ]-4-nitro-9(10 <i>H</i> )-akrydonu ( <b>120e</b> ) ....	119
4.11. Materiały stosowane w badaniach biologicznych .....	120
4.11.1. Linie komórkowe .....	120
4.11.1.2. Komórki neuroblastomy SH-SY5Y : NC (nondifferentiated cells, dopaminergiczne), DC (differentiated cells, cholinergiczne) .....	120
4.11.1.3. Linia komórkowa Jurkat .....	121
4.11.1.3.1. Pasażowanie linii komórkowej – hodowla zawieszona .....	121
4.11.1.3.2. Rozmrażanie linii komórkowej .....	121
4.11.1.3.3. Mrożenie komórek .....	121
4.11.1.4. Uzyskiwanie mononuklearnych komórek krwi obwodowej (PBMC) .....	122

4.11.2. Dakarbazyna, cisplatyna, etopozyd .....	122
4.11.3. Test kolometryczny XTT .....	122
4.11.4. Test kolometryczny MTT.....	123
4.11.4.1. Linia komórkowa Jurkat.....	123
4.11.4.2. PBMC.....	123
5. PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....	125
6. DOROBEK NAUKOWY.....	127
7. LITERATURA.....	129
Załącznik 1. Widmo DQF-COSY związku ( <b>117</b> ) .....	139
Załącznik 2. Widmo ROESY związku ( <b>117</b> ) .....	140
Załącznik 3. Widmo TOCSY związku ( <b>117</b> ) .....	141
Załącznik 4. Widmo HSQC związku ( <b>117</b> ).....	142
Załącznik 5. Widmo HMBC związku ( <b>117</b> ).....	143
Załącznik 6. Widmo <sup>1</sup> H i <sup>13</sup> C NMR związku ( <b>116d</b> ).....	144
Załącznik 7. Widmo DQF-COSY związku ( <b>119b</b> ) .....	145
Załącznik 8. Widmo ROESY związku ( <b>119b</b> ) .....	146
Załącznik 9. Widmo TOCSY związku ( <b>119b</b> ) .....	147
Załącznik 10. Widmo HSQC związku ( <b>119b</b> ) .....	148
Załącznik 11. Widmo HMBC związku ( <b>119b</b> ) .....	149
Załącznik 12. Widma HPLC-MS związków ( <b>115b, 115c, 117</b> ) .....	150
Załącznik 13. Widma HPLC-MS związków ( <b>116a, 116b, 118</b> ) .....	151

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW I SYMBOLI

ACN	acetonitryl
293T	ludzka linia komórkowa nowotworu nerki
3D7	szczep zarodźca sierpowatego
A172	linia komórkowa glejaka
A375	linia komórkowa nowotworu skóry
A549	linia komórkowa nowotworu płuc
$\gamma$ -Abu	kwasy aminomasłowy
AD	choroba Alzheimera ( <i>Alzheimer's disease</i> )
AHMA	(3-(akrydyn-9-yloamino)-5-(hydroksymetylo)fenylo)karbaminian etylu
AIDS	zespół nabytego niedoboru odporności ( <i>acquired immune deficiency syndrome</i> )
$\beta$ -Ala	$\beta$ -alanina
Arg	L-arginina
ARPE-19	ludzka linia komórkowa nabłonka barwnikowego siatkówki
AsPC-1	linia komórkowa raka trzustki
B16	linia komórkowa czerniaka
Boc	<i>tert</i> -butyloksykarbonyl
BxPC-3	linia komórkowa gruczolaka trzustki
C-1305	triazoloakrydon
C-1311	imidazoakrydon
C-1748	9-(2'-hydroksyloetyloamino)-4-metylo-1-nitroakrydyna
C38	linia komórkowa nowotworu serca
CA	anhydraza węglanowa ( <i>carbonic anhydrases</i> )
CCRF-CEM	linia komórkowa ludzkiej białaczki limfocytarnej
CDCl <sub>3</sub>	deuterowany chloroform
CD <sub>3</sub> OD	deuterowany metanol
Co26 i C38	linie komórkowe raka jelita grubego
Cys	L-cysteina
D3CLP	9-[(3-chloro)fenyloamino]-2-[3-(dietyloamino)propyloamino]tiazolo -[5,4-b]chinolina
DC-3F	linia komórkowa raka płuc
DCE	dichloroetan

DCM	dichlorometan
Dd2	szczep zarodźca sierpowatego
DEA	dietyloamina
DIEA	<i>N,N</i> -diizopropylloetyloamina
DMEM	medium do hodowli komórek ( <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> )
DMF	<i>N,N</i> -dimetyloformamid
DMSO	dimetylosulfotlenek
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy
DPEPhos	(oksydi-2,1-fenylene)bis(difenylofosfina)
ds-DNA	dwuniciowy kwas deoksyrybonukleinowy ( <i>double-stranded DNA</i> )
DQF-COSY	spektroskopia korelacyjna z filtrem dwukwantowym ( <i>Double Quantum Filtered Correlation Spectroscopy</i> )
FBS	plodowa surowica wołowa ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )
EEDQ	2-etoksy- <i>N</i> -etoksykarbonylo-1,2-dihydrochinolina
FDA	agencja żywności i leków ( <i>Food and Drug Administration</i> )
Fmoc	9-fluorenylometoksykarbonyl
GIST48	linia komórkowa nowotworu zrębu żołądkowo-jelitowego
Glu	L-kwas glutaminowy
Gly	glicyna
H37Rv	szczep prątka gruźlicy
hAChE	inhibitory ludzkiej acetylocholinesterazy
hal	halogen
HATU	heksafluorofosforan <i>O</i> -(7-azobenzotriazol-1-ilo)-1,1,3,3-tetrametylo-uronowy
HMBC	heterojądrowa korelacja ( <sup>1</sup> H-X) dalekiego zasięgu ( <i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i> )
HSQC	heterojądrowa korelacja z detekcją przejść wielokwantowych ( <i>Heteronuclear single quantum correlation</i> )
hBChE	inhibitory ludzkiej butyrylocholinesterazy
hCA	ludzka anhydraza węglanowa
HCT-15	linia komórkowa gruczolakoraka jelita grubego
HeLa	linia komórkowa raka szyjki macicy
HepG2	linia komórkowa nowotworu wątrobowo-komórkowego
His	L-histydyna



HOBt	<i>N</i> -hydroksybenzotriazol
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa
HT-29	linia komórkowa gruczolakoraka jelita grubego
IC <sub>50</sub>	stężenie hamujące (stężenie powodujące cytotoksyczność 50% komórek w stosunku do kontroli)
Jurkat	linia komórkowa ostrej białaczki limfoblastycznej typu T
K	L-lizyna
K562	linia komórkowa białaczki erytroleukemicznej
L1210	linia komórkowa białaczki limfoidalnej
LC	chromatografia cieczowa
Leu	L-leucyna
LS174T	linia komórkowa gruczolakoraka okrężnicy
LS-180	linia komórkowa gruczolakoraka jelita grubego
Lys	L-lizyna
<i>m</i> -AMSA	<i>N</i> -(4-(akrydyn-9-yloamino)-3-metoksyfenylo)metanosulfonamid
MCF-7	linia komórkowa ludzkiego raka piersi
MDA-MB-2311	linia komórkowa ludzkiego gruczolakoraka piersi
7-MEOTA	7-metoksyakrydyna
MGC803	linia komórkowa ludzkiego raka żołądka
MiaPaCa-2	linia komórkowa raka trzustki
MS	spektrometria mas
MTT	bromek 3-(4,5-dimetylo-2-ilo)-2,5-difenylotetrazolu
NF54	szczep zarodźca sierpowatego
NCI-H520	linia komórkowa raka płaskonabłonkowego
NCI-H522	linia komórkowa niedrobnokomórkowego raka płuca
NMM	<i>N</i> -metylomorfolina
NMR	spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego
NDV	rzekomy pomór drobiu, inaczej choroba Newcastle
Nrp-1	neuropilina-1
Nu	nukleofil
P	L-prolina
P388	linia komórkowa białaczki limfocytowej
PA-1	linia komórkowa gruczolakoraka jajnika
Panc-1	linia komórkowa nowotworu trzustki



PARP-1	polimeraza poli(ADP-rybozy)
PBMC	komórki mononuklearne krwi obwodowej
PC-3	linia komórkowa raka prostaty
Phe	L-fenylalanina
POCl <sub>3</sub>	trichlorek fosforu
Pro	L-prolina
PTLC	preparatywna chromatografia cienkowarstwowa
PyBOP	heksafluorofosforan benzotriazo-1-iloxytrypolidynofosfoniowy
R	L-arginina
RNA	kwasy rybonukleinowe
ROESY	spektroskopia NOE (jądrowy efekt Overhausera ) w rotującym układzie współrzędnych ( <i>Rotation Frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i> )
RPMI	pożywka z L-glutaminą
scFv	jednołańcuchowy fragment zmienny przeciwciała
Ser	L-seryna
SGC7901	linia komórkowa raka żołądka
SH-SY5Y-DC	cholinergiczna postać neuroblastomy
SH-SY5Y-NC	dopaminergiczna postać neuroblastomy
SW1398	linia komórkowa raka jelita grubego
T	L-treonina
T47D	linia komórkowa nowotworu piersi
TBTU	tetrafluoroboran 2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-ilo)-1,1,3,3-tetrametyloamoniowy
TFA	kwasy trifluorooctowe
TEA	trietyloamina
TFE	trifluoroetanol
THF	tetrahydrofuran
Thr	L-treonina
TLC	cienkowarstwowa chromatografia cieczowa
TOCSY	korelacyjna spektroskopia zupełna ( <i>Total Correlation Spectroscopy</i> )
U-118 MG	linia komórkowa glejaka
U251	linia komórkowa glejaka
WI38	linia komórkowa raka płuc



WiDr	linia komórkowa nowotworu jelita grubego
Val	L-walina
VEGF-A165	czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego
XTT	sól sodowa 2,3-bis[2-metoksy-4-nitro-5-sulfofenylo]-2 <i>H</i> -tetrazolio-5-karboksyanilidu

## STRESZCZENIE

Niniejsza praca doktorska obejmuje syntezę oraz testy aktywności biologicznej nowych analogów akrydyny/akrydonu z pochodnymi tuftsyny/retro-tuftsyny jako potencjalnych leków przeciwnowotworowych. Akrydyny należą do grupy policyklicznych związków heteroaromatycznych. Ich struktura chemiczna wywodzi się z trójpierścieniowego związku aromatycznego, będącego analogiem antracenu zawierającego atom azotu w pierścieniu B. Związki te powszechnie stosowane są m.in. jako leki przeciwnowotworowe (np. amsakryna (**66**)). Jednak ze względu na skutki uboczne i toksyczność pochodnych akrydyny/akrydonu wciąż poszukuje się nowych analogów o lepszych właściwościach farmakologicznych.

Prace syntetyczne obejmowały otrzymanie 9-fenoksy-1-nitroakrydyny, 9-fenoksy-4-metylo-1-nitroakrydyny i 1-chloro-4-nitro-9(10*H*)-akrydonu, analogów tuftsyny/retro-tuftsyny oraz koniugatów tych związków. W pierwszym etapie syntezy akrydyny/akrydonu w wyniku kondensacji Ullmana otrzymałam odpowiednie kwasy antranilowe, które w obecności POCl<sub>3</sub> lub H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ulegały cyklizacji do pożądanej pochodnej akrydyny, bądź akrydonu. Syntezę odpowiednio chronionych analogów tuftsyny/retro-tuftsyny acylowanych na grupie ε-aminowej lizyny aminokwami tj. Gly, β-Ala, Val, Leu prowadziłam w roztworze z wykorzystaniem metody mieszanych bezwodników z chloromrówczanem izobutyli i NMM, w bezw. DMF. Następnie w reakcji substytucji nukleofilowej w.w. związków otrzymałam koniugaty akrydyny/akrydonu z pochodnymi tuftsyny/retro-tuftsyny. Syntezę analogów akrydyny prowadziłam w fenolu, w temp. 50°C, w obecności TEA. Z kolei pochodne akrydonu otrzymywałam w bezw. DMF, w obecności TEA. Uzyskane związki poddawałam deprotekcji osłony Fmoc za pomocą 30% roztworu DEA w DMF, następnie pochodne przeprowadzałam w chlorowodorki. Zsyntetyzowane analogi scharakteryzowałam za pomocą technik spektroskopowych (<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, MS) oraz analitycznych (TLC, HPLC-MS).

Wszystkie otrzymane związki (**115a-e**, **116a-e**, **117**, **118**, **119a-e**, **120a-e**) poddałam wstępnym badaniom biologicznym *in vitro* na limfoidalnej linii komórkowej Jurkat oraz komórkach PBMC pochodzących od zdrowych dawców. W celu wyznaczenia IC<sub>50</sub> wykonałam testy żywotności MTT badające toksyczność pochodnych (**115a-e**, **116a-e**, **117**, **118**, **119a-e**, **120a-e**).

Ponadto, przeprowadzono badania biologiczne określające żywotność amelanotycznych Ab i melanotycznych Ma komórek czerniaka i dwóch postaci neuroblastomy SH-SY5Y: cholinergicznej DC i dopaminergicznej NC za pomocą testu XTT. Na podstawie



uzyskanych wyników  $IC_{50}$  wybrano związek (**117**), który poddano testom opisującym jego wpływ na apoptozę komórek.

## SUMMARY

This doctoral dissertation contains the synthesis and biological activity testing of new acridine/acridone analogs with tuftsin/retro-tuftsin derivatives as potential anticancer drugs. Acridines are polycyclic heteroaromatic compounds. Their chemical structure is based on a tricyclic aromatic compound which is an analogue of anthracene containing a nitrogen atom in ring B. These compounds are commonly used as anticancer drugs (e.g., amsacrine (**66**)). However, due to the side effects and toxicity of acridine/acridone derivatives, new analogues with improved pharmacological properties are still sought after.

Synthesis included obtaining 9-phenoxy-1-nitroacridine, 9-phenoxy-4-methyl-1-nitroacridine and 1-chloro-4-nitro-9(10*H*)-acridone, tuftsin/retro-tuftsin analogs and conjugates of these compounds. In the first step of acridine/acridone synthesis due to Ullman condensation, the appropriate anthranilic acids were prepared. Then, in the presence of POCl<sub>3</sub> or H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, they cyclized to acridine or acridone derivative. The synthesis of adequately protected analogues of tuftsin / retro-tuftsin acylated on ε-amino group of lysine with the amino acids: Gly, β-Ala, Val, Leu were carried out in a solution using a mixed anhydride method with isobutyl chloroformate and NMM in anhydrous DMF. Then, in the nucleophilic substitution reaction of the above-mentioned compounds, acridine/acridone conjugates with tuftsin/retro-tuftsin derivatives were received. The synthesis of acridine analogs were carried out in phenol at 50°C in the presence of TEA. In turn, acridone derivatives were prepared in anhydrous DMF, in the presence of TEA. Then, Fmoc-group was removed by using diethylamine and derivatives were converted into hydrochlorides. The synthesized analogs were characterized by means of spectroscopic techniques (<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, MS) and analytical techniques (TLC, HPLC-MS).

All obtained compounds (**115a-e**, **116a-e**, **117**, **118**, **119a-e**, **120a-e**) were subjected to preliminary *in vitro* bioassays on the Jurkat and PBMC cells. In order to determine the IC<sub>50</sub>, I performed MTT viability tests, which are used to investigate the toxicity of derivatives (**115a-e**, **116a-e**, **117**, **118**, **119a-e**, **120a-e**).

In addition, biological studies were carried out determining the viability of amelanotic Ab and melanotic Ma melanoma cells and two forms of SH-SY5Y neuroblastoma: cholinergic DC and dopaminergic NC using the XTT test. On the basis of the IC<sub>50</sub> results selected compound (**117**), which was tested to describing its effect on cellular apoptosis.

## WSTĘP

Choroby nowotworowe stanowią jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie. Obecnie w polskim społeczeństwie ok. 990 tys. osób żyje z chorobą nowotworową zdiagnozowaną w ciągu poprzedzających 15 lat. W 2015 roku zarejestrowano w Polsce ponad 163 tys. nowych zachorowań i stwierdzono przeszło 100 tys. zgonów z tego powodu (27,2% zgonów wśród mężczyzn i 23,6% wśród kobiet). Nowotwory złośliwe stanowią poważny problem zdrowotny głównie u osób w młodym i średnim wieku (25-64 lat) [1].

Leczenie nowotworów bardzo często opiera się na zastosowaniu chemioterapii wykorzystującej leki cytostatyczne. Niestety większość chemioterapeutyków stosowanych w trakcie leczenia wykazuje wysoką toksyczność przejawiającą się licznymi skutkami ubocznymi lub wywołującymi reakcje nadwrażliwości.

Ponadto, standardowe sposoby podawania leków w pełni nie wykorzystują terapeutycznych możliwości medykamentów. Jednym ze skutecznych sposobów dostarczania leków do miejsca docelowego w organizmie jest zastosowanie koniugatów lek-nośnik, w których składnik aktywny jest związany kowalencyjnie z nośnikiem, np. peptydem [2].

Tak więc, niska skuteczność klasycznych metod leczenia chorób nowotworowych jest istotną przyczyną poszukiwania nowych, o zwiększonej selektywności działania na komórki nowotworowe leków. Na świecie prowadzi się badania mające na celu uzyskanie chemioterapeutyków, które działałyby w sposób bezpieczny, bądź przynajmniej mało szkodliwy dla pacjenta. Przykładem potencjalnych leków poddawanych wszechstronnym badaniom są analogi akrydyny/akrydonu.

Pochodne akrydyny stanowią ważną klasę związków o szerokim zakresie właściwości biologicznych. Związki te charakteryzują się interesującymi właściwościami fizycznymi, chemicznymi i biologicznymi. Już w XIX wieku pochodne akrydyny stosowano jako pigmenty i barwniki. W przemyśle farmaceutycznym znajdują zastosowanie jako leki przeciwzapalne (np. rivanol (**84**)), przeciwnowotworowe (np. amsakryna (**66**)), przeciwbakteryjne (np. proflawina (**63**)), przeciwmalaryczne (np. chinakryna (**85**)) oraz grzybobójcze (np. akryflawina (**82**)), a także są skuteczne jako inhibitory acetylocholinoesterazy (np. takryna (**73**)). Ponadto, stosowane są one jako barwniki fluorescencyjne, materiały do wizualizacji cząsteczek biologicznych, a także w technice laserowej [3,4].

Akrydyny ze względu na swój duży potencjał aplikacyjny są szeroko badane pod kątem aktywności przeciwnowotworowej. Ich płaska, trójpierścieniowa struktura sprawia, że działają one jako interkalatory DNA oraz hamują topoisomerazę lub enzymy telomerazy [5].

# 1. CZĘŚĆ LITERATUROWA

## 1.1. Synteza pochodnych akrydyny/akrydonu

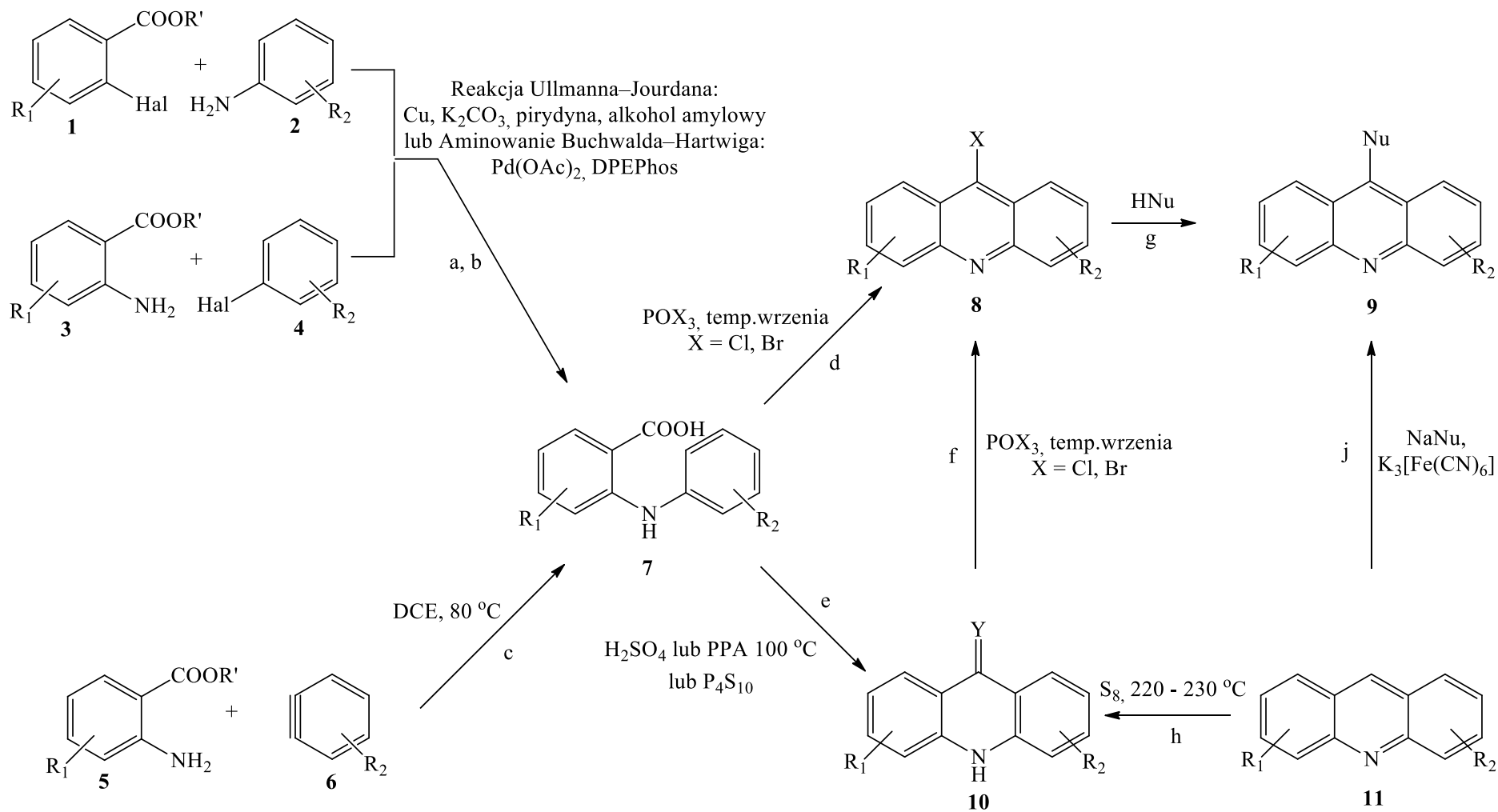
Do tej pory w literaturze chemicznej opisano kilka różnych metod syntezy pochodnych akrydyny/akrydonu. Pierwszy etap większości z nich opiera się na otrzymaniu prekursora pierścieni akrydynowych – kwasu *N*-fenyloantranilowego (**7**) (Schemat 1). Syntezę kwasu antranilowego można przeprowadzić trzema drogami: kondensacją Ullmanna-Jourdana (droga a i b), reakcją aminowania Buchwalda-Hartwiga (droga a i b), oraz w reakcji z wytworzonym termochemicznie benzenem (droga c) [6-8]. Najbardziej znana, podstawowa metoda Ullmanna-Jourdana polega na reakcji pomiędzy pochodną kwasu *o*-halogenobenzoesowego (**1**) a pochodną aniliny (**2**) (droga a), czy też kwasem antranilowym (**3**) i pochodnymi halogenobenzenu (**4**) (droga b), w obecności miedzi jako katalizatora [6-8]. Otrzymywanie kwasu *N*-fenyloantranilowego (**7**) może zostać przyspieszone poprzez reakcję Ullmanna-Goldberga z zastosowaniem ultradźwięków. Z kolei reakcja aminowania Buchwalda-Hartwiga jest udoskonaleniem metody Ullmanna, polegającym na zastosowaniu katalizatora palladowego wytworzonego *in situ* w obecności toluenu, w temp. 95°C [8].

Traktowanie kwasu *N*-fenyloantranilowego (**7**) lub tioakrydonu (**10**, Y = S) za pomocą POCl<sub>3</sub> prowadzi do powstania aktywowanych 9-chloroakrydyn (**8**) (droga d i f). W reakcji kwasu antranilowego (**7**) z POCl<sub>3</sub>, w pierwszym etapie powstaje akrydon, który jest następnie chlorowany do związku (**8**). Pochodne 9-metylotioakrydyny (**8**, X = SCH<sub>3</sub>) otrzymuje się w reakcji odpowiednich tioakrydonów (**10**) z jodkiem metylu [8].

Z kolei 9-akrydony (**10**, Y = O) uzyskuje się przez dehydratację kwasu *N*-fenyloantranilowego (**7**) z H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> lub kwasem polifosforowym (droga e). Natomiast syntezę tioakrydonów (**10**, Y = S) przeprowadza się w wyniku dehydratacji kwasu antranilowego (**7**) za pomocą P<sub>4</sub>S<sub>10</sub> (droga e). W przypadku gdy dostępny jest prekursor akrydyny, np. oranż akrydyny (**11**, gdzie R<sub>1</sub> = 6-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, R<sub>2</sub> = 3-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), może on być utleniony elementarną siarką do tioakrydonu (**10**, Y = S) (droga h) [8].

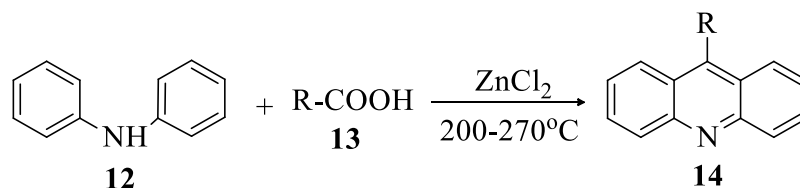
Pochodną akrydyny (**9**) otrzymuje się w bezpośredniej reakcji nukleofila z aktywowaną akrydyną (**8**) (droga g) [9] lub w reakcji silnego nukleofila z C9 niepodstawioną akrydyną (**11**) (droga j) w obecności lub nieobecności zmiatacza jonów wodorkowych – jak w reakcji Cziczibabina [9,10].





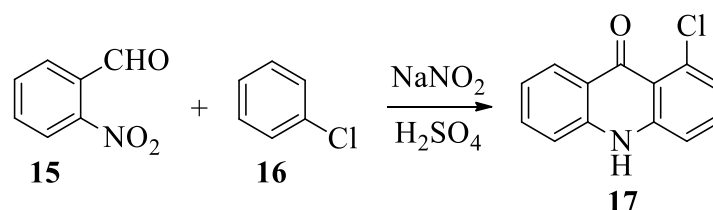
**Schemat 1.** Schemat syntezy podstawowych prekursorów 9-podstawionych akrydyn [8].

Kolejną metodą otrzymywania akrydyny (**14**) jest reakcja Brenthseny, polegająca na ogrzewaniu difenylaminy (**12**) i kwasu karboksylowego (**13**) w obecności  $\text{ZnCl}_2$ , w temp. 200-270°C (Schemat 2) [7].



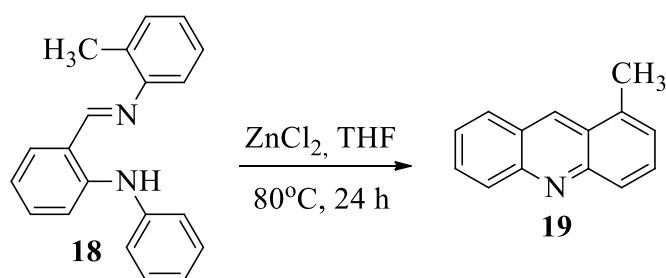
**Schemat 2.** Otrzymywanie pochodnych akrydyny (**14**) metodą Brenthseny [7].

Z kolei reakcja Lehmstedta-Tanasescu umożliwia syntezę akrydonu (**17**) i jego pochodnych. Wychodząc z 2-nitrobenzaldehydu (**15**) i halogenopochodnej benzenu (**16**) (Schemat 3) otrzymuje się odpowiednie cząsteczki akrydonu [8].



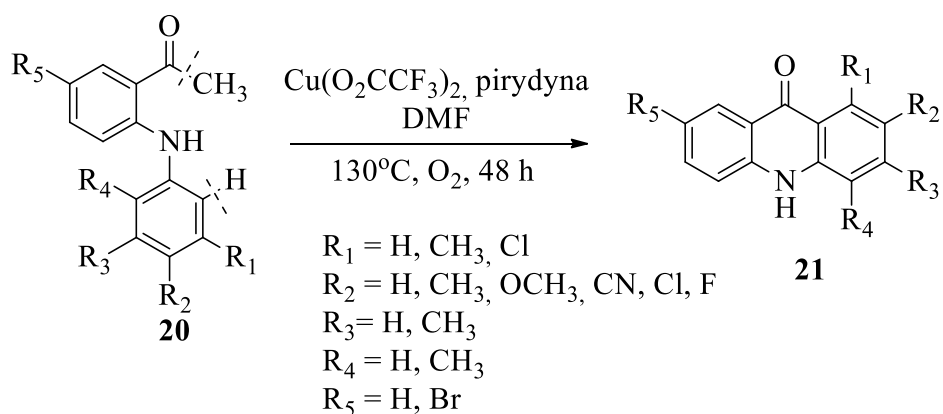
**Schemat 3.** Otrzymywanie akrydonu (**17**) metodą Lehmstedta-Tanasescu [8].

Inna metoda syntezy analogów akrydyny (**19**) polega na reakcji cyklizacji zasady Schiffa *o*-aryloaminofenyłu (**18**) w obecności  $\text{ZnCl}_2$  w THF, w temp. 80°C (Schemat 4) [11].



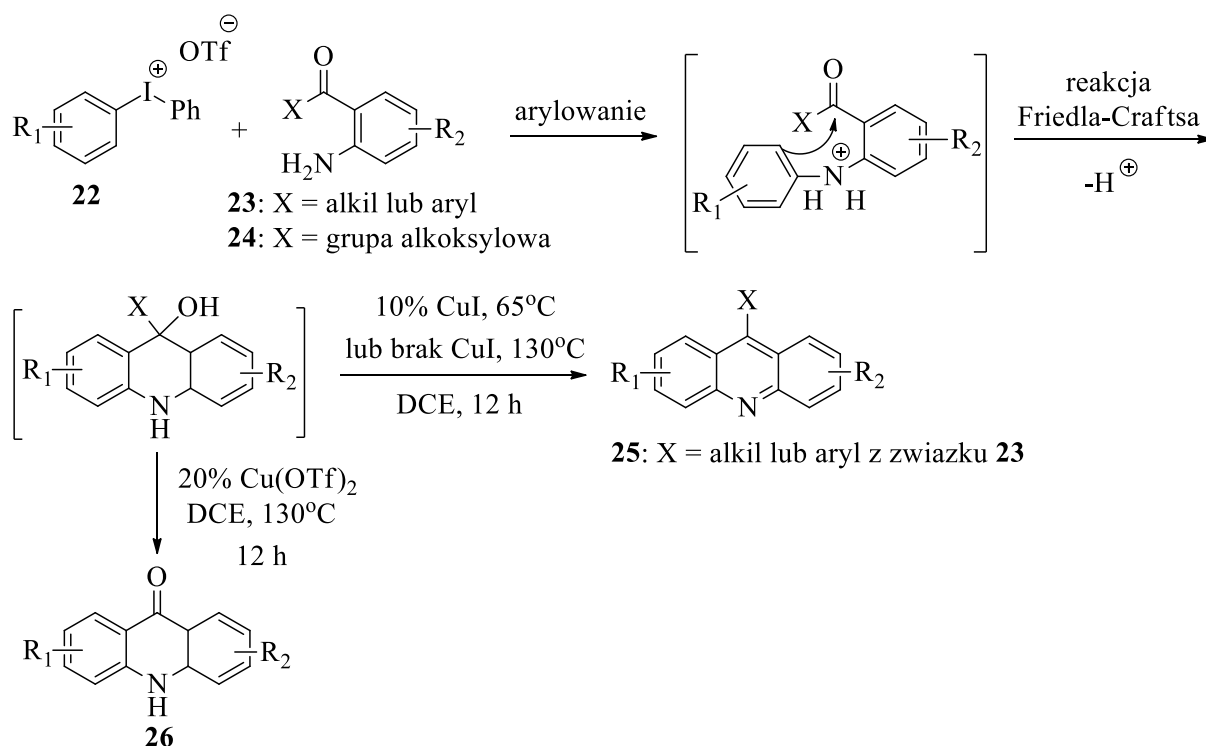
**Schemat 4.** Synteza pochodnych akrydyny (**19**) oparta na reakcji cyklizacji zasady Schiffa *o*-aryloaminofenyłu w obecności  $\text{ZnCl}_2$  [11].

Natomiast aerobowe utlenianie (reakcja w atmosferze  $\text{O}_2$ ) 1-(2-(fenyloamino)-fenylo)etanonu (**20**) w obecności pięciokrotnego nadmiaru pirydyny oraz  $\text{Cu}(\text{O}_2\text{CCF}_3)_2$  jako katalizatora w DMF, w temp. 130°C prowadzi do otrzymania pochodnych akrydonu (**21**) (Schemat 5). Procedura ta polega na rozszczepieniu wiązania aromatycznego C-H oraz acetylowego C-C z wewnątrzcząsteczkowym utworzeniem wiązania diaryloketonowego [12].



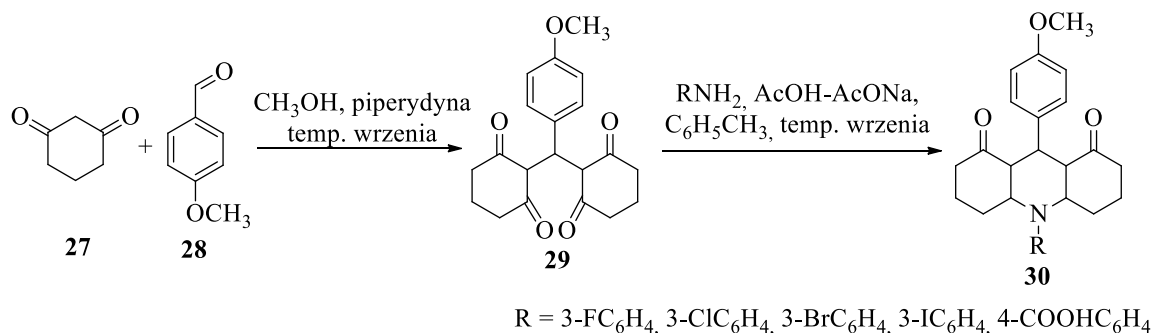
**Schemat 5.** Otrzymywanie pochodnych akrydonu (**21**) w wyniku aerobowego utleniania 1-(2-(fenyloamino)fenylo)etanonu (**20**) w obecności  $\text{Cu}(\text{O}_2\text{CCF}_3)_2$  jako katalizatora [12].

Pochodne akrydyny (**25**) oraz akrydonu (**26**) otrzymać można, także w wyniku reakcji arylowania, następnie acylowania Friedla-Craftsa, wykorzystując łatwo dostępne *o*-acyloanilinę (**23** lub **24**) i sól diarylojodoniową (**22**). Syntezę akrydyny (**25**) przeprowadza się ogrzewając substraty w DCE, w temp.  $65^\circ\text{C}$  w obecności związku miedzi jako katalizatora lub w temp.  $130^\circ\text{C}$  bez dodatku CuI. Z kolei analogi akrydonu (**26**) otrzymuje się stosując 20%  $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ , w temp.  $130^\circ\text{C}$  (Schemat 6) [13].



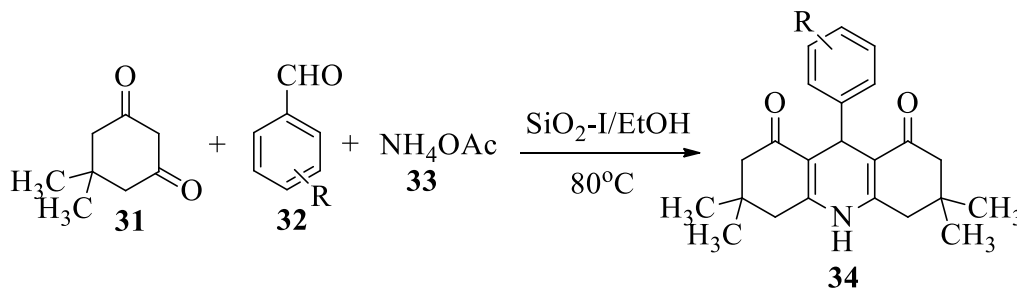
**Schemat 6.** Synteza pochodnych akrydyny (**25**)/akrydonu (**26**) z wykorzystaniem *o*-acyloaniliny i soli diarylojodoniowej [13].

Z kolei metoda syntezy pochodnych 1,8-dioakrydyny (**30**) polega na otrzymaniu związku pośredniego tetraketonu (**29**) w wyniku kondensacji cyklicznego 1,3-diketonu (**27**) z *p*-metoksybenzaldehydem (**28**). Następnie w reakcji tetraketonu (**29**) z pierwszorzędowymi aminami aromatycznymi, z wykorzystaniem aparatury Deana–Starka, w obecności mieszaniny kwas octowy - octan sodu w toluenie uzyskano pochodne akrydyny (**30**) (Schemat 7) [14].



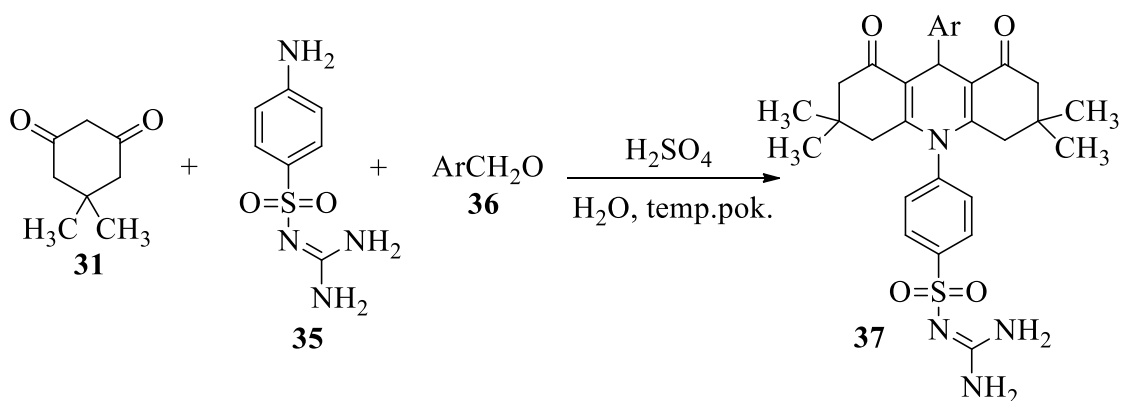
**Schemat 7.** Synteza pochodnych 1,8-dioakrydyny (**30**) [14].

Efektywny i ekonomiczny sposób syntezy 9-arylo-heksahydroakrydyno-1,8-dionu (**34**) polega na cyklocondensacji dimedonu (**31**), aromatycznych aldehydów (**32**) oraz octanu amonu (**33**) w obecności heterogenicznego katalizatora SiO<sub>2</sub>-I w etanolu, w temp. 80°C (Schemat 8) [15].



**Schemat 8.** Synteza 9-aryloheksahydroakrydyno-1,8-dionu (**34**) [15].

Z kolei sulfonamidowe pochodne akrydyny (**37**) otrzymano w wyniku jednoetapowej reakcji dimedonu (**31**), 4-amino-*N*-(diaminometyleno)-benzenosulfonamidu (**35**) i aromatycznego aldehydu (**36**), w obecności kwasu siarkowego jako katalizatora, stosując wodę jako rozpuszczalnik, w temp. pokojowej (Schemat 9). Metoda ta charakteryzuje się dobrymi wydajnościami oraz wysoką czystością otrzymanych związków. Dodatkowo jej zaletą jest zastosowanie korzystnego dla środowiska H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> jako katalizatora oraz H<sub>2</sub>O jako rozpuszczalnika [16].



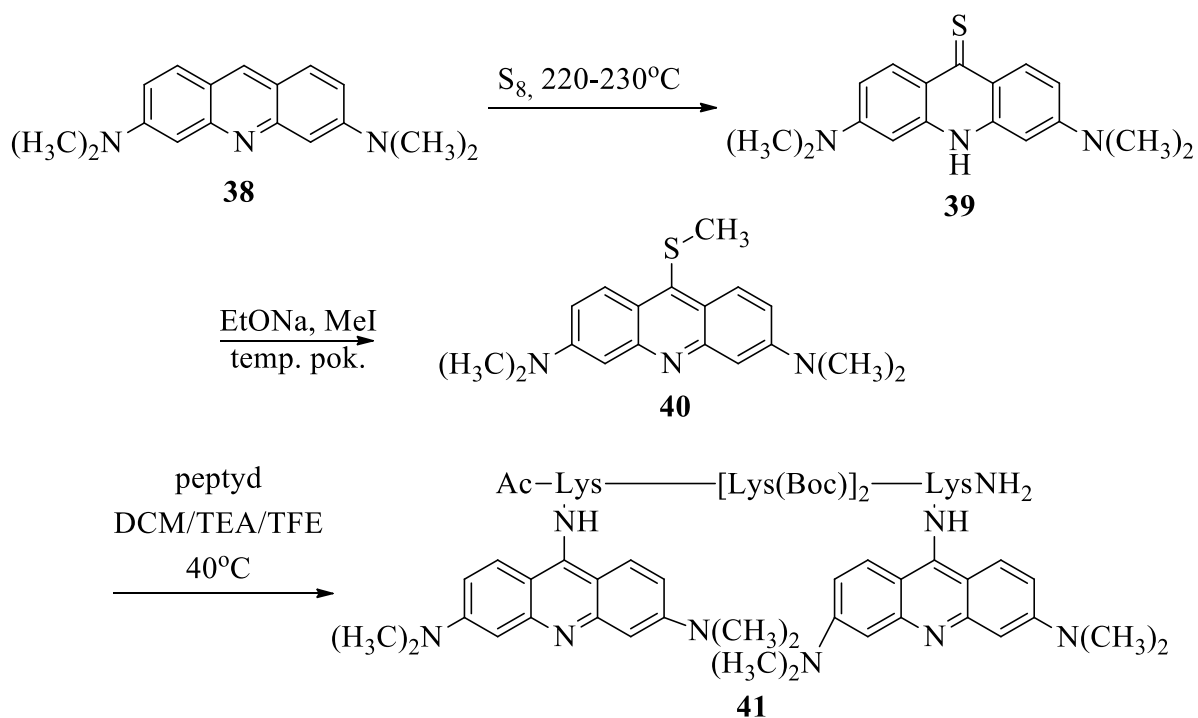
**Schemat 9.** Synteza sulfonamidowych pochodnych akrydyny (**37**) [16].

### 1.1.1. Synteza peptydowych pochodnych akrydyny

Na uwagę zasługują również peptydowe pochodne akrydyny, które znajdują zastosowanie jako leki, systemy dostarczania genów oraz środki do obrazowania (np. fluorescencyjne markery w diagnostyce nowotworowej).

Peptydy zazwyczaj przyłączone są do ugrupowania akrydyny poprzez jej grupę aminową do *C*-końca łańcuchów bocznych asparagianu i glutaminianu, bądź przez karboksyl lub aldehyd do *N*-końca lub łańcucha bocznego lizyny i ornityny.

W reakcji substytucji nukleofilowej 9-chloroakrydyny z krótkim peptydem zawierającym wolną grupą aminową oraz karboksylową, w obecności DEA otrzymano pochodną akrydyna-Gly-Gly-Gly-OH. Natomiast pochodne bisakrydyny z wiązaniem peptydowym pochodzącym od Gly,  $\beta$ -Ala i  $\gamma$ -Abu otrzymano w wyniku podobnej reakcji w fenolu pod nieobecność zasady. Z kolei tetrapeptyd Fmoc- $\beta$ -Ala-Pro-His-Lys-NH<sub>2</sub> połączono z 2-metylo-9-akrydynokarboksyaldehydem w obecności *N,N*-diizopropylometyloaminy w bezw. metanolu. Inny peptyd zawierający lizynę na *C*-końcu został wprowadzony do cząsteczki 3,6-bis(dimetyloamino)-9-(metylmerkapt)akrydyny (**40**) w mieszaninie rozpuszczalników DCM/TEA/TFE, w temp. 40°C (Schemat 10) [8].



**Schemat 10.** Derywatywacja grup  $\epsilon$ -aminowych lizyny za pomocą akrydyny [8].

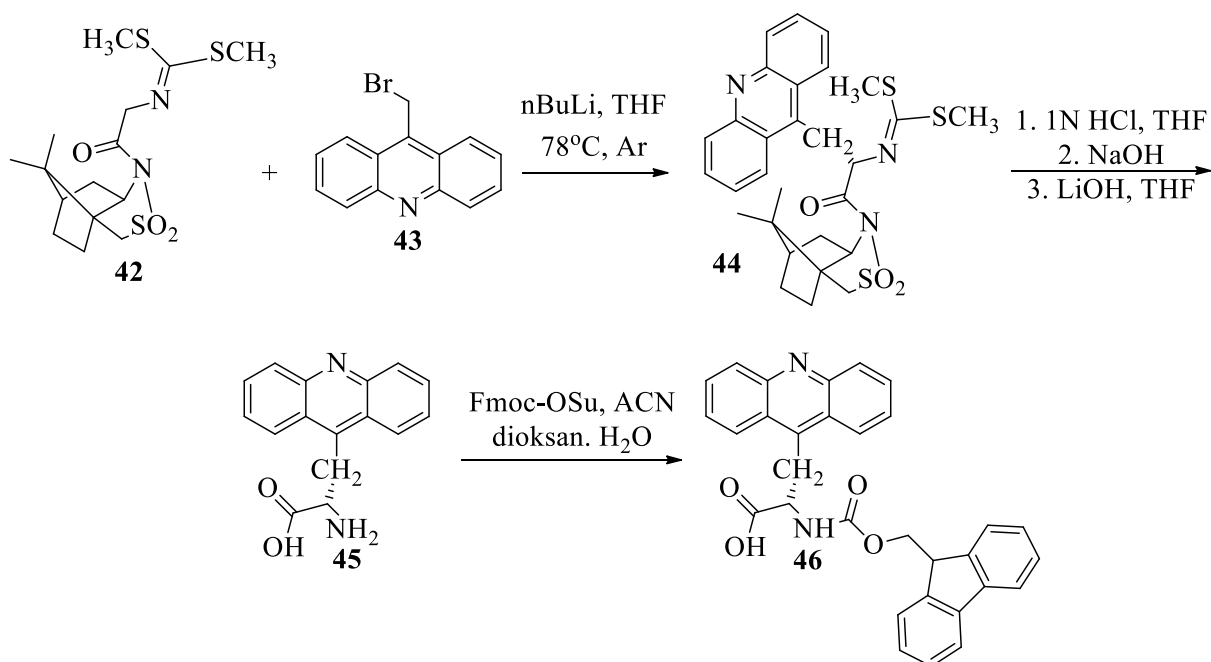
Nitroakrydyny oraz akrydony zawierające diaminoalkilowe łączniki (od 2 do 5 grup metylenowych) wprowadzono do łańcucha bocznego D-izoglutaminy w muramylopeptydach za pomocą odczynnika kondensującego EEDQ [17,18]. Wykorzystując syntezę na podłożu stałym otrzymano również koniugaty peptydów połączone *N*-końcem do kwasu akrydyno-9-karboksylowego przy użyciu HATU/DIEA w DMF [19].

Innym przykładem jest otrzymanie pochodnej bradykininy (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) modyfikowanej na *N*-końcu kwasem akrydyno-9-octowym (Ata) [20]. Akrydynę sprzężono z peptydem za pomocą TBTU/HOBt w DMF w obecności DIEA.

Opracowano także metodę syntezy peptydowych pochodnych mono- i bis-9-anilinoakrydyn zgodnie z mechanizmem aromatycznej substytucji nukleofilowej na fazie stałej, w obecności  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  w DMF [21]. Z kolei trójpodstawione koniugaty akrydyna-peptyd otrzymano przy użyciu PyBOP/HOBt/DIEA w *N*-metylopirolidynie [22].

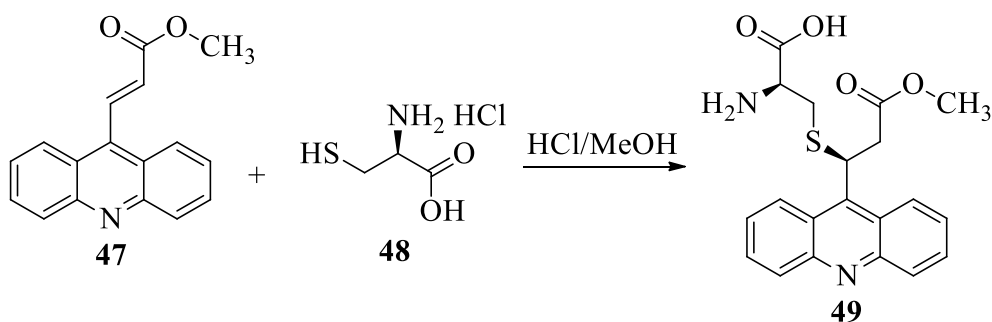
Pochodne 1-nitroakrydyny i 4-karboksyloakrydonu połączone wiązaniem amidowym pomiędzy grupą karboksylową heterocyklicznej cząsteczki i *N*-końcem łańcucha tuftsyny/retro-tuftsyny otrzymano na nośniku stałym metodą Fmoc [23].

Kolejnym przykładem jest synteza optycznie czystej (*S*)- $\beta$ -(9-akrydyno)alaniny (**46**), wychodząc z 9-bromometyloakrydyny (**43**) i chiralnego glicynoamidu (**42**) (Schemat 11) [8].



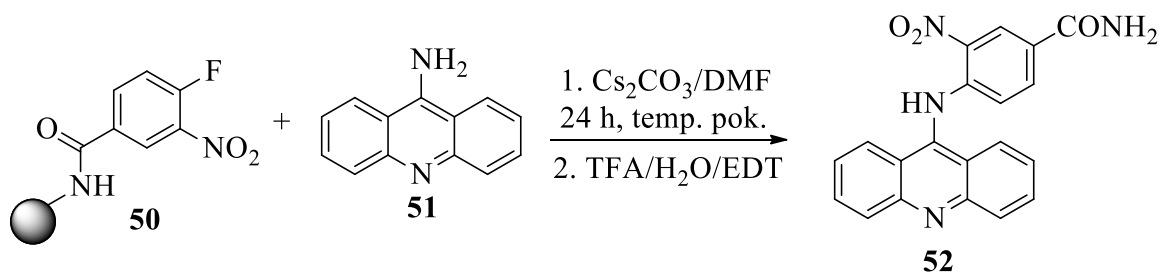
**Schemat 11.** Synteza aminokwasowej pochodnej akrydyny [8].

Z kolei reakcja akrydynowej pochodnej cynamonianu metylu (**47**) z Cys (**48**) prowadziła do otrzymania chiralnego związku (**49**) (enancjomer (*S*)) (Schemat 12) [24].



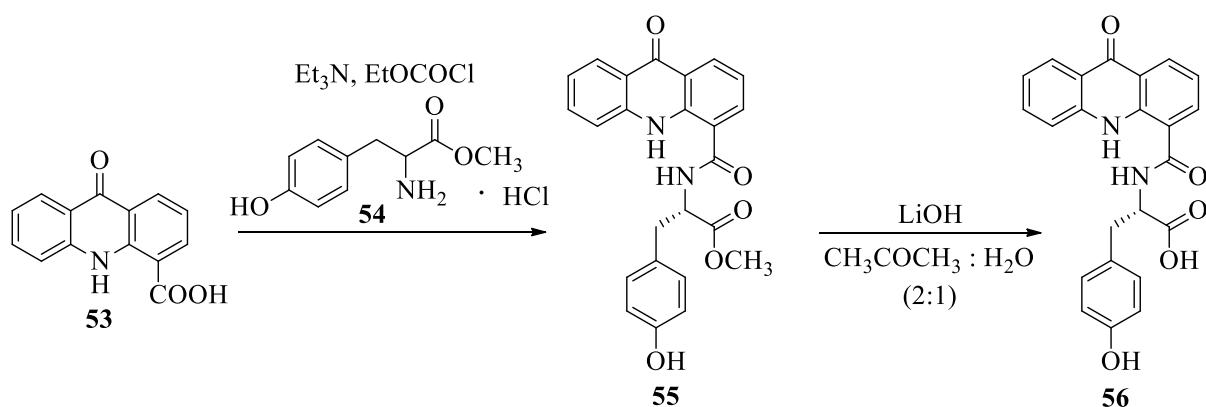
**Schemat 12.** Otrzymywanie chiralnie czystej (*S*) pochodnej akrydyny (**49**) [24].

W innym podejściu 9-aminoakrydyna (**51**) reaguje z "ubogim" w elektrony fluorowanym benzenem (**50**) otrzymując pochodną (**52**) (Schemat 13) [25].

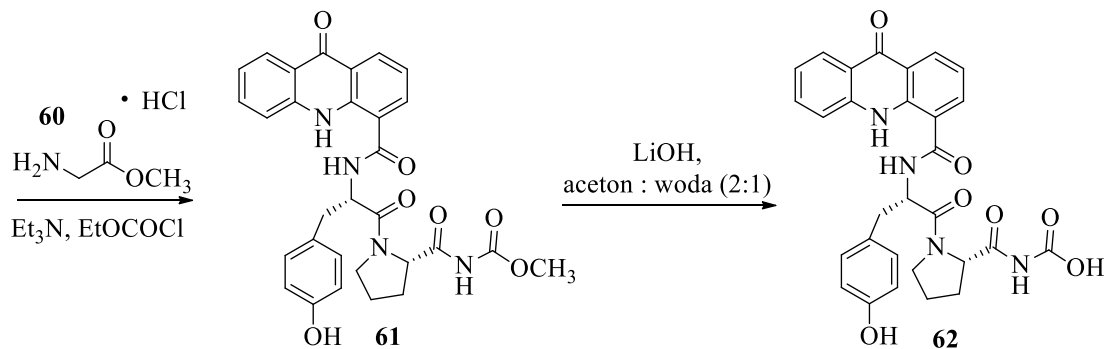
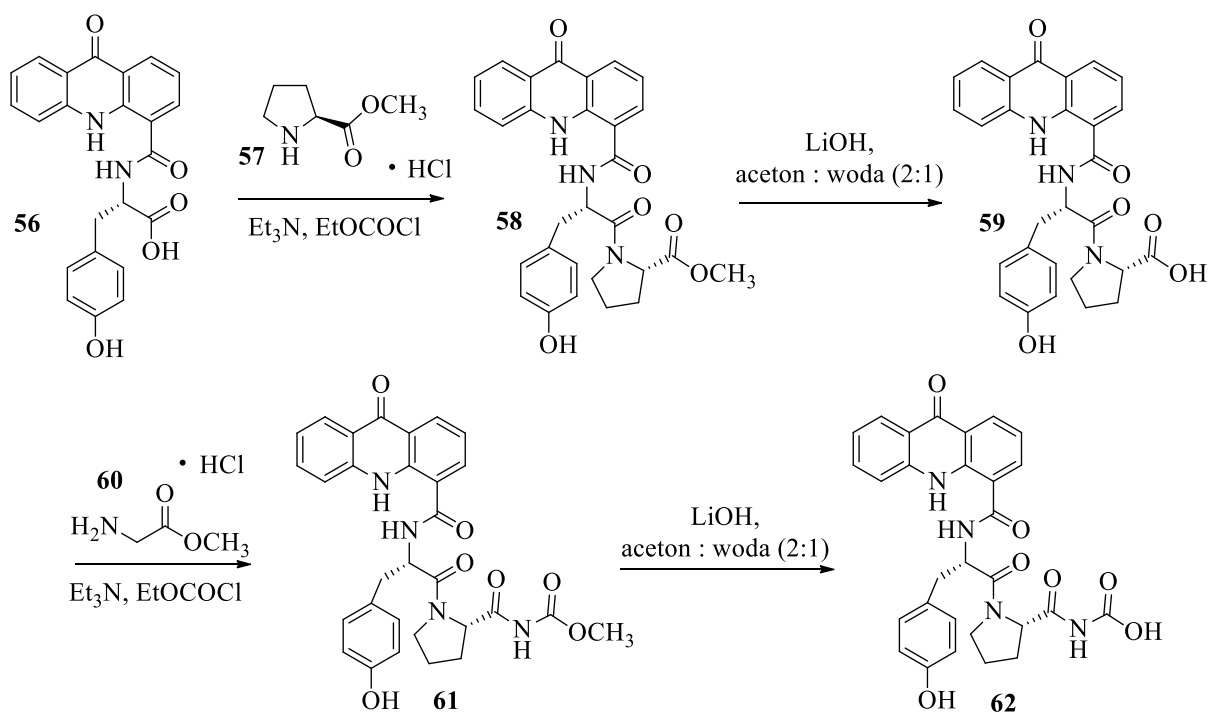


**Schemat 13.** Wszechstronna synteza na fazie stałej aminowych pochodnych akrydyny [25].

Natomiast w reakcji kwasu 9-okso-9,10-dihydro-4-karboxyakrydonu (**53**) z chlorowodorkiem estru metylowego L-tyrozyny (**54**) w obecności TEA i chloromrówczanu etylu otrzymano pochodną (**55**). Hydroliza grupy estrowej związku (**55**) przy użyciu LiOH prowadziła do uzyskania analogu (**56**) (Schemat 14). Następnie pochodną (**56**) poddano reakcji z chlorowodorkiem estru metylowego L-proliny (**57**) otrzymując związek (**58**). Po odbezpieczeniu grupy karboksylowej uzyskano analog (**59**), który w reakcji z chlorowodorkiem estru metylowego glicyny (**60**) dał związek (**61**). Końcowy produkt (**62**) otrzymano w wyniku hydrolizy pochodnej (**61**) za pomocą LiOH (Schemat 15) [26].



**Schemat 14.** Synteza aminokwasowych pochodnych akrydonu (**56**) [26].



**Schemat 15.** Synteza peptydowych pochodnych akrydonu (**62**) [26].



## 1.2. Aktywność biologiczna pochodnych akrydyny/akrydonu

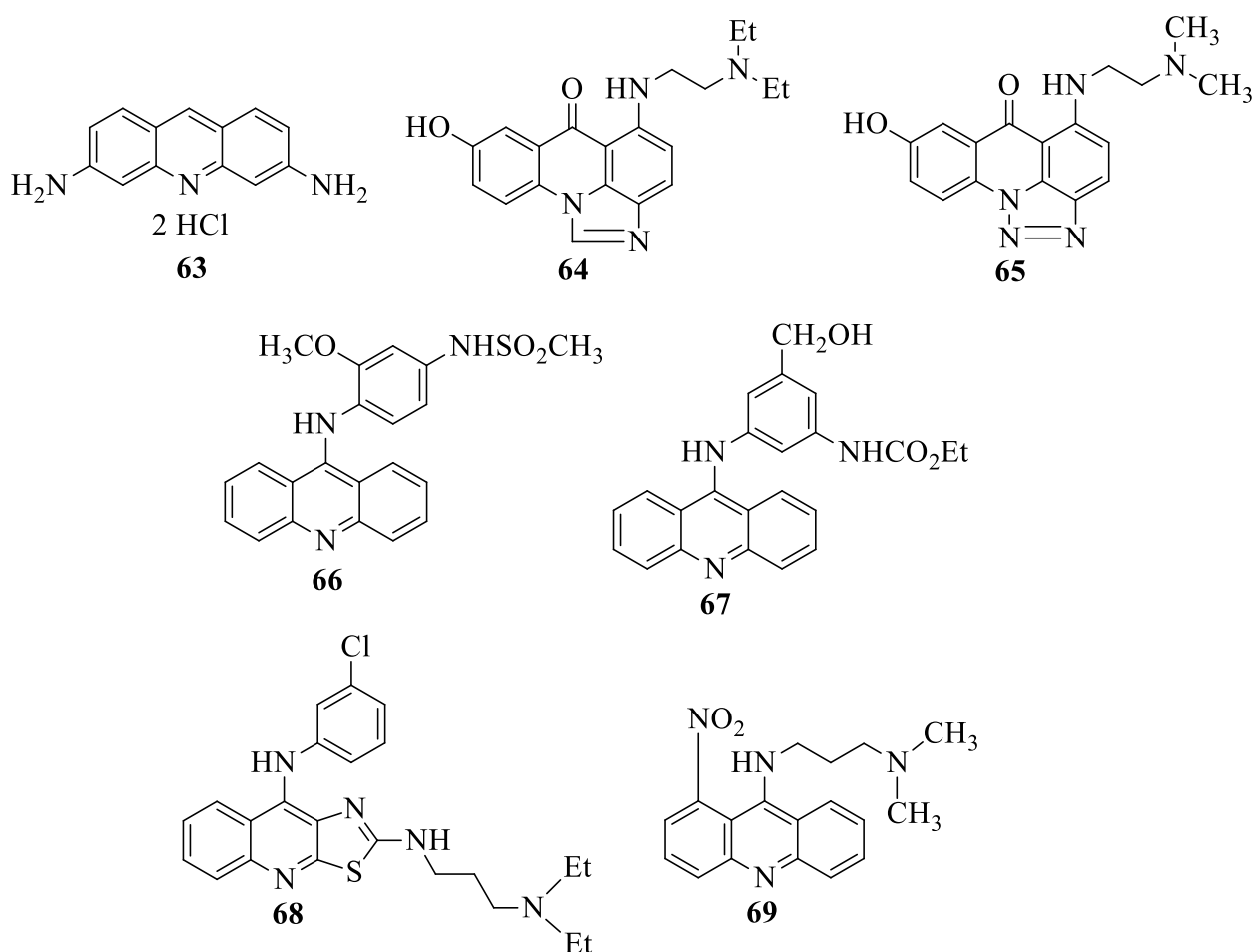
Znane już od ponad wieku pochodne akrydyny/akrydonu stanowią grupę związków o szerokim spektrum aktywności biologicznej, stosowane jako inhibitory esterazy acetylocholinowej, leki przeciwmalaryczne, grzybobójcze, przeciwbakteryjne, przeciwzapalne, przeciwnowotworowe [27], a także znajdują zastosowanie jako sondy fluorescencyjne w diagnostyce laboratoryjnej [28].

### 1.2.1. Interakcje akrydyn z kwasami nukleinowymi

Użyteczność akrydyn jako chemoterapeutyków wynika z ich biologicznej stabilności oraz zdolności do efektywnego wiązania się do DNA lub RNA [9], czego skutkiem jest zaburzenie funkcji biologicznych w żywych komórkach. Akrydyny zdolne są do wiązania i rozpoznawania kwasów nukleinowych poprzez oddziaływania hydrofobowe, prowadzące do auto-insercji między dwiema sąsiednimi parami zasad kwasów nukleinowych (interkalacja) [8]. Właściwość ta jest niezbędna w terapii przeciwnowotworowej oraz przeciwwirusowej. Pochodne akrydyny zaburzają funkcję komórek nowotworowych poprzez obniżanie aktywności niektórych enzymów, takich jak topoizomerazy, telomerazy oraz cyklino zależne kinazy, które są kluczowe dla prawidłowego działania DNA. Akrydyny mogą także wchodzić w interakcje z kwasami nukleinowymi w rybosomach i polisomach, powodując zaburzenia ich struktury [9].

Użycie wielu struktur akrydyny w jednej cząsteczce może spowodować poliinterkalację i zwiększać ich powinowactwo do DNA, a także selektywność sekwencyjną [29]. Takie układy akrydynowe zwykle połączone są ze sobą łącznikiem o charakterze alifatycznym, który przy odpowiedniej budowie chemicznej może oddziaływać krawędziami zasad eksponowanymi do małego rowka DNA oraz z grupami fosforanowymi helisy kwasu nukleinowego. Tak więc, zmieniając odpowiednio strukturę chemiczną łącznika można zmieniać ilość grup będących donorami/akceptorami wiązań wodorowych, modulując preferencje sekwencyjne związku. Łącznik ten może być „elastyczny”, w wyniku czego możliwa jest rotacja układów akrydynowych lub „sztywny”, co uniemożliwia wewnątrzcząsteczkowe oddziaływania pomiędzy pierścieniami akrydynowymi. W przypadku tych związków odnotowano znaczny wzrost ich powinowactwa do DNA, jednakże nie zaobserwowano istotnej zmiany w aktywności biologicznej w porównaniu z monointerkalatorami [8,29].

Proflawina (**63**) (Rys. 1) była jedną z pierwszych pochodnych akrydyny, którą poddano badaniom dotyczącym jej oddziaływań fizykochemicznych z DNA [30]. Związek ten powodował wydłużenie helisy kwasu, nie wpływając na długość zdenaturowanego DNA. Dodatkowo **63** zaburza strukturę kwasu nukleinowego, obniża współczynnik sedymentacji oraz zwiększa lepkość roztworu DNA. A zatem dochodzi do interkalacji związku pomiędzy pary zasad podwójnej helisy DNA, w wyniku czego powstaje kompleks proflawiny z kwasem nukleinowym stabilizowany przez oddziaływania typu  $\pi$ - $\pi$  płaskich układów aromatycznych z układami aromatycznymi zasad [4,27,30].



**Rys. 1.** Struktury chemiczne proflawiny (**63**), imidazoakrydonu C-1311 (**64**), triazoloakrydonu C-1305 (**65**), *m*-AMSA (**66**), AHMA (**70**), D3CLP (**67**), ledakrinu (**68**) [3,4].

Innym przykładem pochodnych akrydyny wiążącymi się niekowalencyjnie z dwuniciowym DNA są imidazoakrydony oraz triazoloakrydony [27]. W 1990 roku zespół Politechniki Gdańskiej pod kierunkiem prof. Jerzego Konopy otrzymał imidazoakrydon C-1311 (**64**) (Rys. 1), który zakwalifikował się do badań klinicznych [31,32]. C-1311 (**64**)

powoduje zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G<sub>2</sub> w komórkach nowotworowych. Badania aktywności przeciwnowotworowej wykazały, że obecność grupy 8-OH w imidazoakrydonie powoduje aktywność cytotoksyczną tego typu związków, ze względu na fakt, iż jest on bardziej wrażliwy na procesy utleniające niż związek bez podstawnika hydroksylowego lub z podstawnikiem w innej pozycji pierścienia. Ponadto wykazano, że kluczowym elementem skuteczności imidazoakrydonów w terapii przeciwnowotworowej jest obecność alkilowego łańcucha bocznego w pozycji 5 pierścienia [30,31]. Związki te przejawiają dużą, zróżnicowaną aktywność przeciwnowotworową *in vitro* wobec komórek nowotworowych białaczki L1210, płuc DC-3F, a także *in vivo* wobec białaczki P388 oraz raka jelita grubego Co26 i C38 [32-34].

Triazoloakrydony są związkami zawierającymi oprócz struktury trójcyklicznej dodatkowy pierścień triazolowy. Pochodne te wykazują aktywność przeciwnowotworową w modelach przesiewowych *in vitro* oraz *in vivo* wobec nowotworów ludzkich, takich jak białaczka P388 oraz czerniak B16 [27]. Triazoloakrydon C-1305 (**65**) (Rys. 1) jest pochodną akrydonu otrzymaną w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej, która wykazuje silne właściwości inhibitoryjne w stosunku do topoizomerazy II. Związek (**65**) zakwalifikowano do II fazy badań klinicznych. C-1305 (**65**) hamuje cykl komórkowy w fazie G<sub>2</sub> w komórkach rakowych oraz powoduje zmiany strukturalne w sekwencjach DNA zawierających tryplety guaniny [27].

Inną grupą pochodnych akrydyny o interesujących właściwościach biologicznych są 9-anilinoakrydyny. Głównym przedstawicielem tej grupy związków jest amsakryna (*m*-AMSA) (**66**) (Rys. 1), analog akrydyny otrzymany na początku lat 70 XX wieku przez zespół Denny'ego. Od 1976 r. stosowana w leczeniu ostrych białaczek. Jest to pierwszy syntetyczny lek należący do grupy inhibitorów topoizomerazy II wykazujący skuteczność kliniczną [27]. Właściwości hamujące amsakryny (**66**) zależne są od łańcucha bocznego cząsteczki. Badania pokazały, że produkcja wolnych rodników może brać udział w metabolizmie amsakryny (**66**), co z kolei może prowadzić do uszkodzenia DNA zarówno w guzach, jak i zdrowych komórkach. Ponadto reaktywna chininodiimina, wytwarzana w wyniku biooksydacji *m*-AMSA (**66**), reaguje z nukleofilami obecnymi w komórkach [9]. W ciągu ostatnich lat otrzymano wiele pochodnych *m*-AMSA (AHMA (**67**) D3CLP) (**68**) (Rys. 1), które charakteryzują się silniejszymi właściwościami przeciwnowotworowymi oraz pozbawione są wielu skutków ubocznych [3,4].

Kolejnym przykładem jest 1-nitro-9-(3-dimetylo-aminopropylamino)akrydyna (**69**) (ledakrin) (Rys. 1) należąca do grupy pochodnych 1-nitroakrydyny, otrzymana na Politechnice

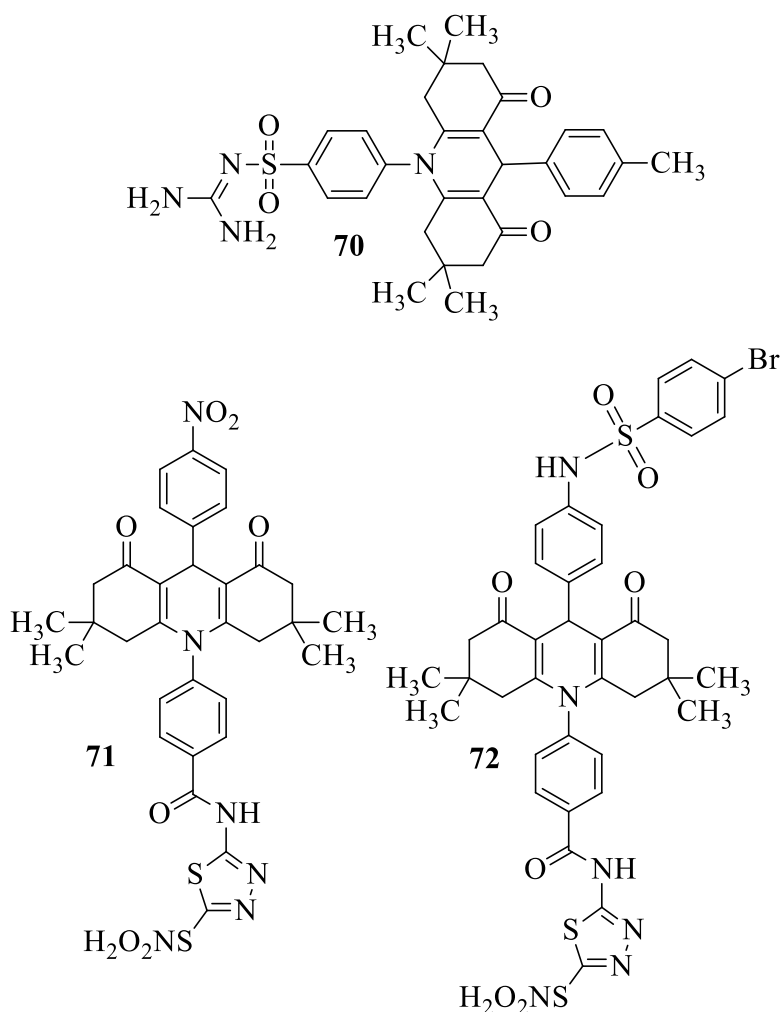
Gdańskiej przez zespół Ledóchowskiego w latach 70 XX wieku. Związek ten w 1974 r. znalazł kliniczne zastosowanie jako pierwszy polski lek przeciwnowotworowy. Pochodna ta wykazywała silną aktywność cytostatyczną przeciw nowotworom jajnika, płuc, skóry oraz piersi. Ze względu na uciążliwe efekty uboczne i toksyczność, została jednak wycofana z leczenia [27,35].

Pomimo licznych badań obejmujących mechanizm działania akrydyn, nadal nie stwierdzono jakie właściwości tych chemoterapeutyków odpowiadają za ich aktywność biologiczną. Prawdopodobnie etap wiązania fizykochemicznego z DNA jest wstępnym i niezbędnym etapem w mechanizmie działania akrydyn, umożliwiającym dostarczenie wystarczającej ilości aktywnego czynnika w pobliże kwasu nukleinowego.

### 1.2.2. Inhibitory ludzkiej anhidrazy węglanowej

Anhidrazy węglanowe (CA, EC 4.2.1.1.) to grupa metaloenzymów zawierających jony Zn(II), które katalizują wzajemną konwersję dwutlenku węgla ( $\text{CO}_2$ ), wodorowęglanu ( $\text{HCO}^{3-}$ ) i odpowiednią dehydratację wodorowęglanu w kwaśnym środowisku z regeneracją  $\text{CO}_2$ . Ponadto uczestniczą w kluczowych procesach fizjologicznych związanych między innymi z homeostazą pH, wydzielaniem elektrolitu, oddychaniem, transportem  $\text{CO}_2$  i jonu, reakcjami biosyntezy (np. glukoneogenezą, lipogenezą), a także rakotwórczością. Do chwili obecnej, szesnaście różnych izoenzymów anhidrazy  $\alpha$ -karbonowej zostało opisanych u ssaków. CA II, który jest najbardziej aktywnym katalizatorem hydratacji dwutlenku węgla, znajduje się głównie w krwinkach czerwonych i innych tkankach wydzielniczych przewodu żołądkowo-jelitowego, nerek, płuc i oka. Dlatego też, izoenzymy anhidrazy  $\alpha$ -karbonowej, uczestniczące w tych procesach są ważnymi celami terapeutycznymi, które mogą być hamowane/aktywowane w leczeniu szeregu zaburzeń, takich jak: obrzęk, jaskra, otyłość, rak czy epilepsja [8].

Grupa Yesildag'a [12] otrzymała sulfonamidowe pochodne akrydyny, które poddali badaniom *in vitro* pod kątem efektywności ich działania wobec izoenzymów (hCA I, II) hydratazy i esterazy. Zsyntetyzowane związki wykazywały jedynie umiarkowaną aktywność w stosunku do hCA I i II esterazy. Cząsteczka (**70**) (Rys. 2) zawierająca grupę metylową w pozycji para w fragmencie benzylovym posiadała najlepszą inhibicję przeciwko hCA I ( $\text{IC}_{50} = 47,2 \mu\text{M}$ ) i hCA II ( $\text{IC}_{50} = 50,1 \mu\text{M}$ ). Z kolei pochodne zawierające większe grupy funkcyjne tj.  $-\text{OCH}_3$  i  $-\text{SCH}_3$  były nieaktywne. Wynikać może to z efektu sterycznego, który blokuje interakcję między enzymem, a inhibitorem [12].



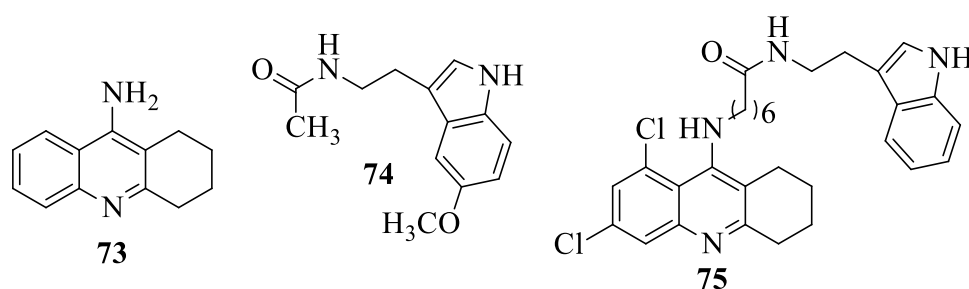
**Rys. 2.** Struktury chemiczne sulfonamidowej (**70**) [12] i 5-amino-1,3,4-tiadiazolo-2-sulfonamidowych (**71**, **72**) [36] pochodnych akrydyny.

Aday i in. [36] opisali 5-amino-1,3,4-tiadiazolo-2-sulfonamidowe pochodne akrydyny jako inhibitory hCA I, II, IV i VII. Badania *in vitro* wykazały, że wszystkie otrzymane związki posiadały aktywność w stosunku do różnych izoform hCA z wartościami  $K_{IS}$  w zakresie 2832–2.5 nM. Najlepszą zdolność hamowania wobec izoformy cytosolowej hCA VII posiadał analog (**72**) (Rys. 2). Z kolei najslabsze powinowactwo obserwowano w przypadku pochodnej (**71**) (Rys.2) w stosunku do hCA I.

### 1.2.3. Inhibitory acetylocholinesterazy

Choroba Alzheimer (AD) jest najczęstszą postacią demencji, chorobą nieuleczalną i neurodegeneracyjną, która objawia się postępującym zmniejszeniem zdolności intelektualnych tj. utratą pamięci i pogorszeniem funkcji poznawczych, spowodowanych zanikaniem komórek

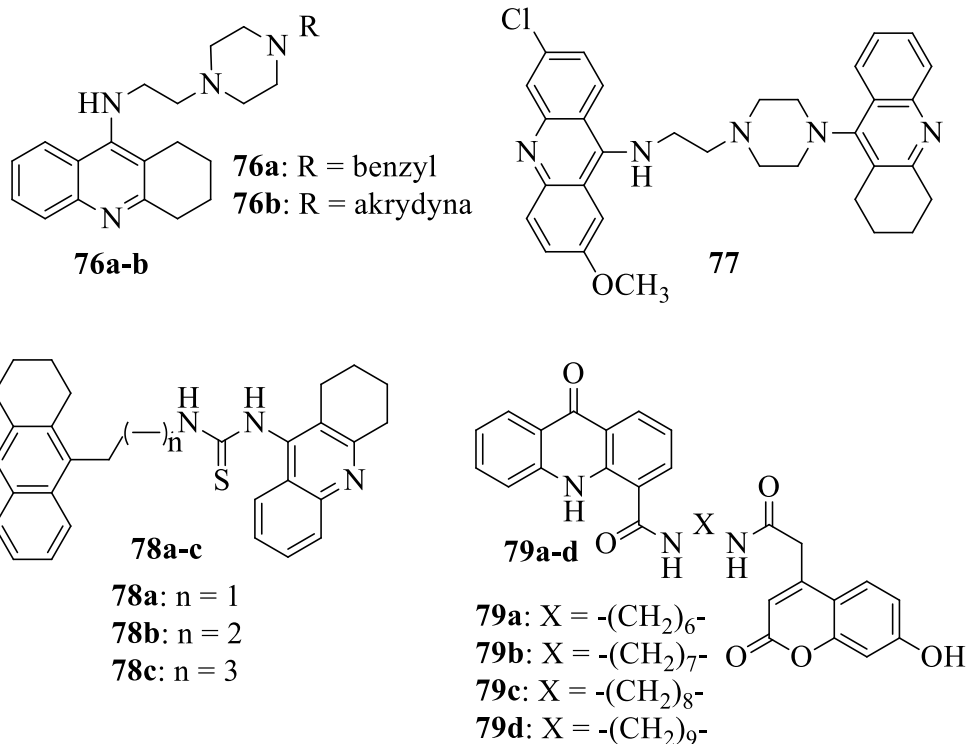
nerwowych [37]. Leki stosowane w AD obejmują inhibitory cholinesterazy, które wzmagają neurotransmisję synaps cholinergiczných w mózgu, a tym samym zwiększają aktywność intelektualną [38]. Przykładem takiego związku jest takryna (**73**) (Rys. 3), pierwszy zatwierdzony lek stosowany jako inhibitor acetylocholinesterazy [39]. Inną dobrze znaną substancją wykorzystywaną w chorobie Alzheimera jest melatonina (**74**) (Rys. 3). W 2005 roku zespół Rodrigueza-Franco [40] otrzymał związek (**75**) (Rys. 3), będący hybrydą takryny oraz melatoniny, który wykazał 8000-krotnie lepsze działanie jako inhibitor esteraży acetylocholinowej, niż takryna (**73**).



**Rys. 3.** Pochodne akrydyny stosowane w leczeniu choroby Alzheimera.

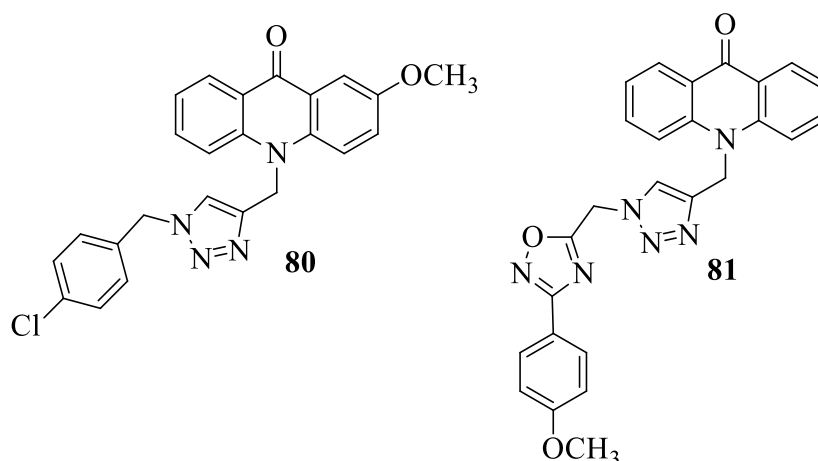
Hamulakova i in. [41] przedstawili koniugaty takryny z pochodnymi akrydyny (**76a-b**, **77**, **78a-c**) (Rys. 4) jako inhibitory ludzkiej acetylocholinesterazy (hAChE) i butyrylocholinesterazy (hBChE). Badania *in vitro* wykazały, że związki (**76b**, **77**, **78b-c**) silnie hamują hAChE z wartościami IC<sub>50</sub> w zakresie od 2 do 8 nM, z kolei analogi (**75a-b**, **78a-c**) były skuteczniejsze jako inhibitory hBChE (IC<sub>50</sub> = 0,4-20 nM) [41].

Otrzymano również hybrydy akrydonu z kumaryną (**79a-d**) (Rys. 4) jako potencjalne związki hamujące hAChE i hBuChE. Pochodne (**79a-d**) wykazały wyższą aktywność wobec hAChE w porównaniu do standardowego leku 7-MEOTA. Najlepszą inhibicję hAChE posiadał analog (**79b**) z IC<sub>50</sub> = 5,85 μM [42].



**Rys. 4.** Struktury chemiczne hybryd akrydyny z takryną (**76a-b**, **77**, **78a-c**) [41] oraz akrydonu z kumaryną (**79a-d**) [42].

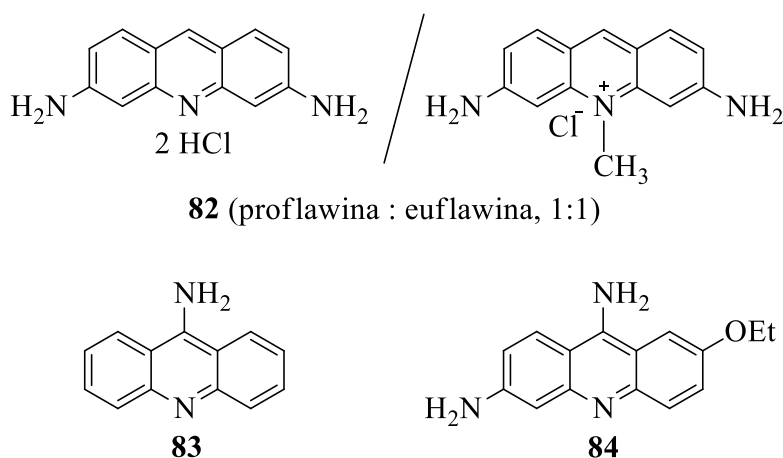
Zespół Mohammadi-Khanapostani zaprezentował triazolowe [43] oraz oksadiazol-1,2,3-triazolowe [44] pochodne akrydonu jako inhibitory hAChE i hBChE. W przypadku analogów triazolowych najlepszą zdolność hamowania wobec hAChE posiadał związek (**80**) (Rys. 5) ( $\text{IC}_{50} = 7,31 \mu\text{M}$ ), w którym reszta benzylova została podstawiona chlorem w pozycji 4. Dodatkowo, obecność grup w porządku  $\text{OCH}_3 > \text{CH}_3 > \text{Cl} > \text{Br}$  zamiast atomu wodoru znajdującego się w pozycji 2 pierścienia akrydonu wpływała na wzrost aktywności związków [43]. Z kolei oksadiazol-1,2,3-triazolowe pochodne akrydonu wykazywały działanie hamujące wobec hAChE z wartościami  $\text{IC}_{50}$  w zakresie od 11,55 do 77,79  $\mu\text{M}$ . Najbardziej aktywny okazał się związek (**81**) (Rys. 5) zawierający niepodstawiony pierścień akrydonowy i ugrupowanie 4-metoksyfenylo-1,2,4-oksadiazolowe. Natomiast w przypadku pochodnych posiadających ugrupowania akrydonu podstawione w pozycji 2- lub 4- przez chlor, brom lub grupę metoksylową nie obserwowano żadnej aktywności [44].



**Rys. 5.** Struktury chemiczne triazolowej (**80**) [43] oraz oksadiazol-1,2,3-triazolowej (**81**) [44] pochodnej akrydonu.

#### 1.2.4. Pochodne akrydyny o aktywności przeciwbakteryjnej i przeciw pasożytniczej

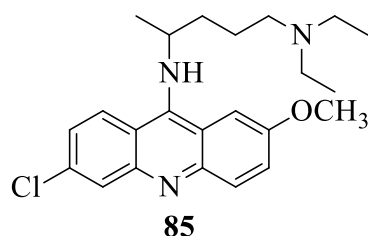
Pierwsze kliniczne zastosowania akrydyny ukierunkowane były przeciwko zakażeniom bakteryjnym. Do tej pory otrzymano wiele pochodnych akrydyny wykazujących skuteczność bakteriobójczą. Przykładem klinicznie stosowanego analogu jest akryflawina (**82**), będąca mieszaniną proflawiny i eufławiny (w stosunku 1:1) (Rys. 6) [45]. Dodatkowo interesujące okazało się, że akryflawina (**82**) wykazuje silne działania przeciwmalaryczne *in vivo* i *in vitro*, a także przejawia potencjalną aktywność przeciwnowotworową u myszy i została ona zatwierdzona przez agencję żywności i leków (FDA) do badań klinicznych [46]. Do innych przeciwbakteryjnych pochodnych akrydyny stosowanych w medycynie należy 9-aminoakrydyna (**83**) oraz etakrydyna (**84**) (rivanol) (Rys. 6) [45].



**Rys. 6.** Struktury chemiczne akryflawiny (**82**), 9-aminoakrydyny (**83**) oraz rivanolu (**84**) [45].



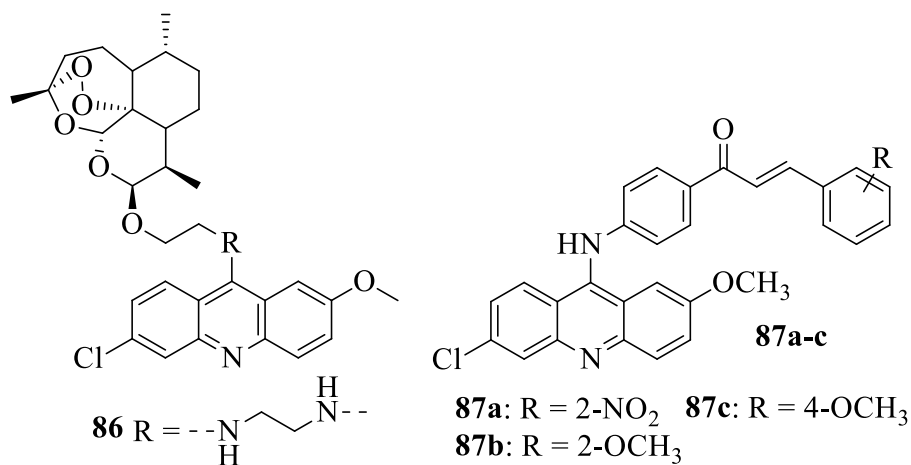
Kolejnym problemem z jakim zmagają się setki milionów ludzi, szczególnie w krajach słabo rozwiniętych, są choroby pasożytnicze m.in. malaria. Obecnie jednym z najskuteczniejszych leków przeciwmalarycznych jest pochodna akrydyny, chinakryna (**85**) (Rys. 7) [47,48]. Lek ten wykazuje silne działanie bakteriobójcze przeciwko *Trypanosoma cruzi*, nie wpływając na ludzką reduktazę glutationową, a także hamuje przenoszenie choroby Chagasa [49].



**Rys. 7.** Struktura chemiczna chinakryny (**85**) [46].

Biorąc pod uwagę istnienie lekooporności, braku skuteczności wielu szczepionek, a także powstające zjawisko odporności na insektycydy naukowcy nadal poszukują niedrogich oraz łatwo dostępnych leków przeciwko opornym pasożytom.

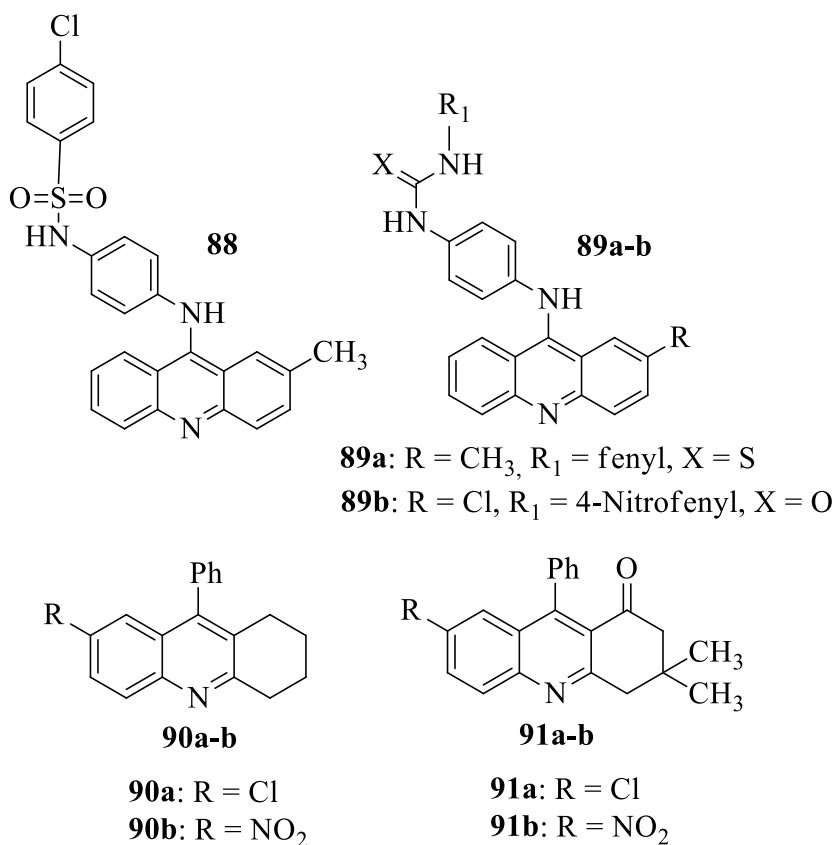
Zespół Joubert'a [50] przedstawił nowe analogi akrydyny z pochodną artemizyniny, jako potencjalne leki przeciwmalaryczne. Otrzymane związki badano *in vitro* pod względem ich aktywności wobec szczepów *Plasmodium falciparum* NF54 i Dd2. Wszystkie otrzymane pochodne wykazywały wyższą skuteczność przeciwmalaryczną przeciwko szczepu NF54 w stosunku do Dd2. Związek (**86**) (Rys. 8), zawierający łącznik etylenodiaminowy, posiadał najlepszą zdolność hamowania w stosunku do NF54 i Dd2 z  $IC_{50} = 2,6$  i  $35,3$  nM, odpowiednio. Co ciekawe, analog (**86**) charakteryzował się 7-krotnie wyższą aktywnością przeciwmalaryczną wobec badanych szczepów w porównaniu do stosowanego leku chlorochiny, z wysokim selektywnym działaniem w kierunku komórek pasożytniczych [50].



**Rys. 8.** Struktury chemiczne pochodnych (**86**) [50] i (**87a-c**) [51].

Prajapati i in. [51] otrzymali b-benzoilostyrenowe pochodne akrydyny (**87a-c**) (Rys. 8) jako potencjalne związki przeciwmalaryczne. Związki badano przeciw *Plasmodium falciparum*, szczepom wrażliwych na chlorochinę (3D7) i opornych na chlorochinon (Dd2). Związki (**87a-c**) wykazywały bardzo dobrą aktywność o wysokiej selektywności i obiecujących wskaźnikach oporności ( $IC_{50}$  w zakresie 0,30-0,52  $\mu\text{M}$  względem szczepu 3D7 i 0,15-0,32  $\mu\text{M}$  wobec szczepu Dd2) [51].

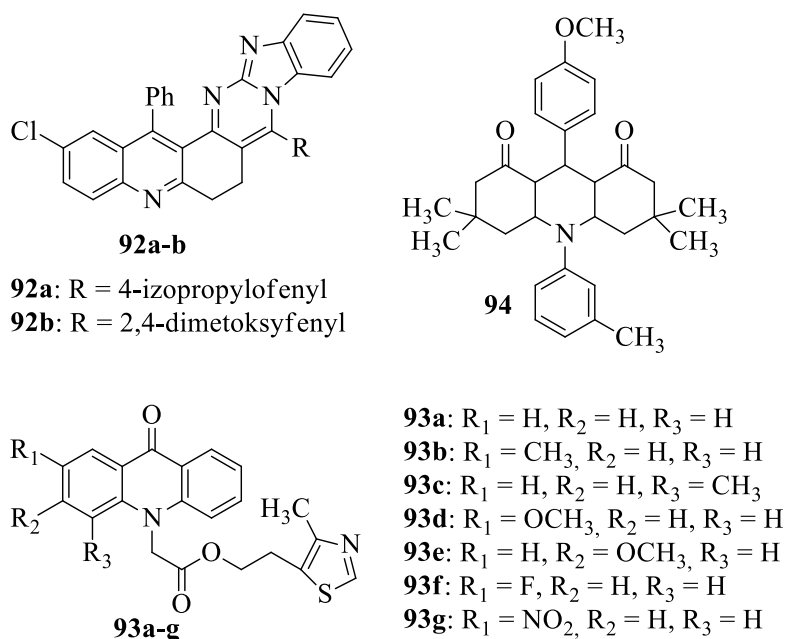
Z kolei Medapi i in. [52] ocenili *p*-fenylenodiaminowe pochodne akrydyny pod kątem ich aktywności względem gyrazy *Mycobacterium tuberculosis* DNA. Otrzymane związki wykazywały dobrą aktywność przy wartościach  $IC_{50} = 5,2-33,9 \mu\text{M}$ . Najbardziej efektywne okazały się koniugaty sulfonamidowe (**88**,  $IC_{50} = 5,2 \mu\text{M}$ ), następnie analogi tiomocznika (**89a**,  $IC_{50} = 6,3 \mu\text{M}$ ), natomiast najmniejszą skuteczność posiadały pochodne mocznika (**89b**,  $IC_{50} = 7,3 \mu\text{M}$ ) (Rys. 9) [52].



**Rys. 9.** Struktury chemiczne potencjalnych leków przeciwgruźliczych (**88**, **89a-b**, **90a-b**, **91a-b**) [52,53].

Muscia i in. [53] zaprezentowali pochodne akrydyny (**90a-b**, **91a-b**) (Rys. 9) jako potencjalne środki przeciwgruźlicze. Otrzymane związki wykazywały aktywność wobec *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Najlepszą skuteczność posiadała pochodna (**90b**) (IC<sub>50</sub> = 44,35 μM).

Z kolei Palaniraja i in. [54] otrzymali imidazo-pirymidynowe pochodne akrydyny jako potencjalne związki przeciwbakteryjne oraz owadobójcze. Cząsteczki poddano badaniom *in vitro* przeciwko dwóm szkodnikom: *Sitophilus oryzae* (wołek ryżowy) i *Callosobruchus maculatus* (strąkowiec czteroplamy); oraz czterech linii bakteryjnych: *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* i *Vibrio parahaemolyticus*. Spośród otrzymanych związków, jedynie pochodne (**92a** i **92b**) (Rys. 10) wykazywały niewielką aktywność wobec *Vibrio parahaemolyticus* (MIC = 10,0 i 8,5 μg/mL, odpowiednio). Z kolei badania przeciwko owadom pokazały, że wszystkie analogi posiadały aktywność względem *Sitophilus oryzae* i *Callosobruchus maculatus* przy stężeniu 250 ppm. Związki (**92a**, **92b**) wykazały 100% śmiertelność po 7 dniach eksperymentów przeciwko *Sitophilus oryzae*, oraz po 14 i 7 dniach w przypadku *Callosobruchus maculatus*, odpowiednio [54].



**Rys. 10.** Struktury chemiczne imidazo-pirymidynowych pochodnych akrydyny (**92a-b**) [54], karboksylanów 2-(4-metylo-1,3-tiazol-5-ilo)etyloakrydonu (**93a-g**) [55] i pochodnej 8-dioakrydyny (**94**) [14].

Zespół Markowich'a [55] otrzymał karboksylany 2-(4-metylo-1,3-tiazol-5-ilo)etyloakrydonu (**93a-g**) (Rys. 10). Otrzymane związki zbadano pod kątem ich aktywności przeciwbakteryjnej wobec szczepów mikroorganizmów (*E. Coli*, *Ps. aeruginosa* *Pr. vulgaris* *S. aureus* *B. subtilis* *Candida albicans*). Badane analogi (**93a-g**) wykazały zdolność hamowania w stosunku do wszystkich mikroorganizmów. Ponadto, pochodna (**93b**) posiadała nieco wyższą aktywność przeciwko *Candida albicans* w porównaniu do rivanolu [55].

Z kolei grupa Kaya przedstawiła pochodne 1,8-dioksoakrydyny jako potencjalne związki przeciwbakteryjne i przeciwgrzybiczne. Większość analogów charakteryzowała się znaczącą skutecznością przeciwko *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. enteritidis* i *S. aureus*. Związek (**94**) (Rys. 10) wykazał wyższą aktywność przeciwko *S. enteritidis* w porównaniu do konwencjonalnego antybiotyku erytromycyny. Dodatkowo, wszystkie pochodne posiadały umiarkowaną aktywność przeciwgrzybiczą wobec *C. albicans* oraz *C. Glabrata* [14].

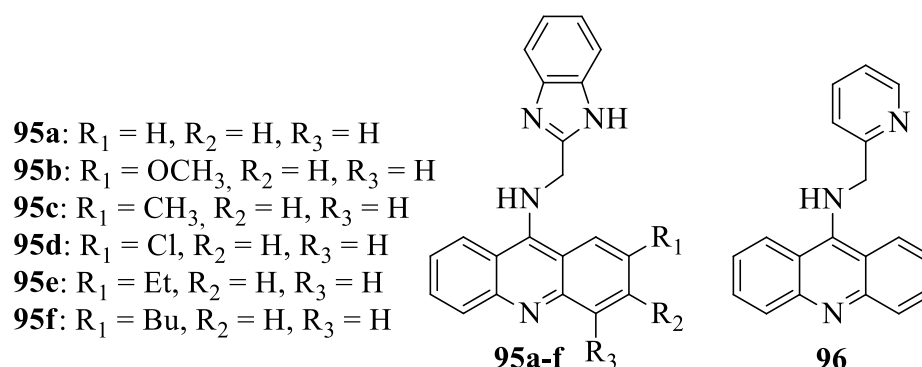
### 1.2.5. Pochodne akrydyny o aktywności przeciwnowotworowej

Efektywność heterocyklicznego, trójpierścieniowego, płaskiego układu do interkalacji pomiędzy pary zasad w dwuniciowej strukturze DNA [9] oraz zdolności akceptorowo/donorowe atomu azotu [56] to dwa główne czynniki pozwalające na wykorzystywanie akrydyn/akrydonów jako potencjalnych związków przeciwnowotworowych. Ponadto, pochodne akrydyny/akrydonu uniemożliwiają prawidłowe funkcjonowanie komórek nowotworowych, także poprzez zaburzenie działania istotnych dla DNA enzymów: topoizomeraż, telomeraż oraz cyklinozależnych kinaz [27].

Do chwili obecnej otrzymano wiele analogów akrydyny/akrydonu, które testowano pod kątem aktywności przeciwnowotworowej. Z pośród różnorodnych związków akrydyny/akrydonu, m.in. analogi jak triazoloakrydon C-1305 (**65**) [57] i amsakrynę (*m*-AMSA) (**66**) [58] (Rys. 1) wprowadzono do badań klinicznych.

Gao i in. [59] przedstawili pochodne benzoimidazoloakrydyny (**95a-f**) (Rys. 11) jako potencjalne związki przeciwnowotworowe. Przeprowadzone testy MTT dowiodły, że większość z nich wykazuje dobre działanie antyproliferacyjne. Najwyższą aktywność posiadał związek (**95f**) wobec linii komórkowych K562 ( $IC_{50} = 2.68 \mu M$ ) i HepG-2 ( $IC_{50} = 8.11 \mu M$ ). Ponadto, pochodna (**95f**) hamowała aktywność topoizomeraży I, a także indukowała apoptozę komórek białaczkowych linii K562 [59]. Podstawienie fragmentu akrydynowego oraz rodzaj łącznika między pierścieniem benzimidazolu i ugrupowaniem akrydyny miało istotny wpływ na aktywność przeciwnowotworową związków. Patrząc na struktury tych cząsteczek można

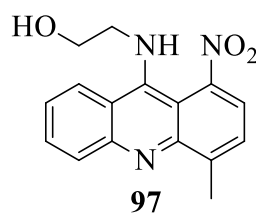
zauważyć, że podstawienie w pozycji C2 reszty akrydynowej grupą butylową sprawia, że cząsteczka (**95f**) jest bardziej aktywna, niż związki zawierające ugrupowanie akrydyny podstawione przez grupę etylową (**95e**) lub metylową (**95c**). Z kolei niepodstawiony analog (**95a**) wykazywał podobną aktywność do pochodnej (**95c**), zawierającej podstawnik metylowy. Zatem zarówno wielkość, jak i długość podstawników, a także ich elektroujemność w dużym stopniu wpłynęła na zdolności cytotoksyczne związków. Na przykład, cząsteczka (**95b**), z podstawnikiem 2-metoksy, była około 3-krotnie silniejsza od analogu zawierającego grupę 2-metylową (**95c**) lub 2-chloro (**95d**) [59].



**Rys. 11.** Struktury chemiczne pochodnych benzoimidazoloakrydyny (**95a-f**) [59] oraz 9-aminoakrydyny (**96**) [60].

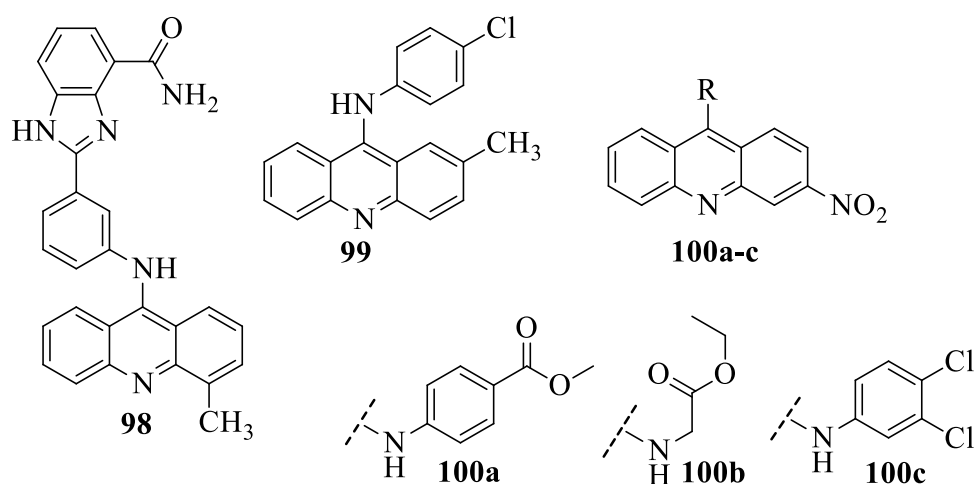
Li i in. [60] otrzymali nowe analogi 9-aminoakrydyny. Zsyntetyzowane związki zbadano pod względem ich aktywności antyproliferacyjnej wobec komórek K562 i HepG-2. Dobrą aktywność przeciw obu liniom komórkowym wykazała pochodna (**96a**) ( $IC_{50} = 2,52 \mu\text{mol/L}$  wobec K562 i  $10,73 \mu\text{mol/L}$  przeciwko HepG-2) (Rys. 11), która hamowała aktywność topoizomerazy I [60].

Z kolei Borowa-Mazgaj i in. [61] przeprowadzili badania pochodnej akrydyny C-1748 (**97**) (Rys. 12) jako potencjalnego leku przeciwko rakowi trzustki. Związek (**97**) zbadano wobec czterech linii nowotworu trzustki: Panc-1, MiaPaCa-2, BxPC-3 i AsPC-1, różniących się poziomem ekspresji zmutowanych genów dla tego typu raka. C-1748 (**97**) wykazywał najwyższą aktywność cytotoksyczną przeciw MiaPaCa-2 ( $IC_{50} = 0,015 \mu\text{M}$ ), z kolei najbardziej odporne okazały się komórki AsPC-1 ( $IC_{50} = 0,075 \mu\text{M}$ ) [61].



**Rys. 12.** Struktura chemiczna pochodnej C-1748 (**97**) [61].

Yuan i in. [62] zaprojektowali serie pochodnych 4-amidobenzimidazoloakrydyny jako podwójne inhibitory topoizometazy i PARP-1. Związek (**98**) (Rys. 13) wykazywał silne działanie hamujące zarówno wobec topoizomerazy, jak i PARP-1, a także znacząco hamował proliferację komórek rakowych. Ponadto, działanie analogu (**98**) wobec komórek MCF-7 indukowało nagromadzone dwuniciowe pęknięcia DNA, pobudzało apoptozę oraz powodowało zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G0/G1. Dodatkowo, **98** znacznie tłumił wzrost guza u myszy i wykazywał korzystne właściwości metaboliczne w mikrosomach wątroby [62].



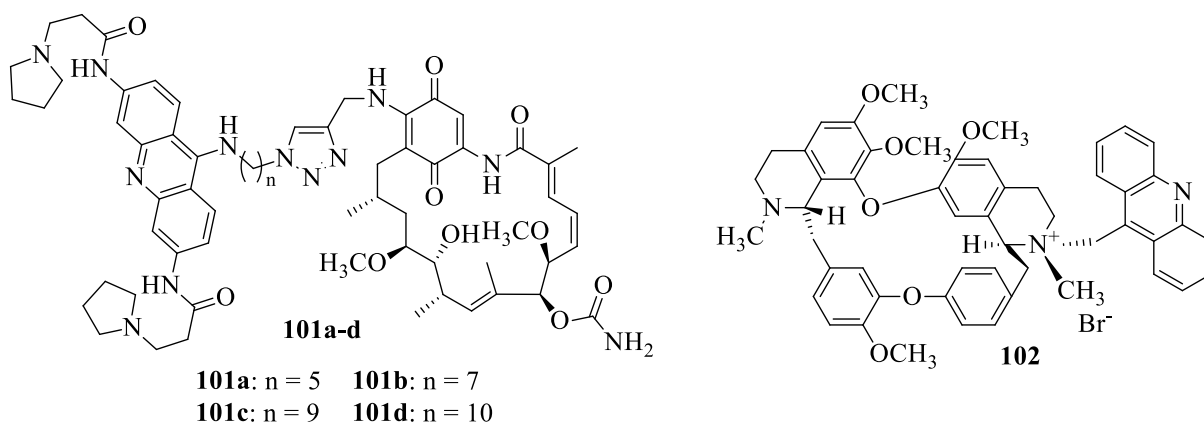
**Rys. 13.** Struktury chemiczne analogu 4-amidobenzimidazoloakrydyny (**98**) [62], 2-metylo-9-podstawionej (**99**) [63] oraz 3-nitro-9-podstawionych (**100a-c**) [64] pochodnych akrydyny.

Kumar i in. [63] ocenili 2-metylo-9-podstawione pochodne akrydyny pod względem aktywności antyproliferacyjnej przeciwko liniom komórkowym A-549 i MCF-7. Najwyższą aktywność *in vitro* wykazywał związek (**99**) (Rys. 13) ( $CTC_{50} = 187,5 \mu\text{g/ml}$  wobec A-549 i  $212,5 \mu\text{g/ml}$  wobec MCF-7). Ponadto badania pokazały, że wszystkie pochodne charakteryzowały się silniejszą cytotoksycznością w stosunku do linii komórkowej A-549, w porównaniu do MCF-7 [63].

Zhou i in. [64] zbadali 3-nitro-9-podstawione pochodne akrydyny (**100a-c**) (Rys. 13) pod względem działania przeciwnowotworowego. Otrzymane związki testowano przeciwko czterem liniom komórkowym: MCF-7, MDA-MB-231, SGC7901 i MGC803. Cząsteczki (**100a-c**) wykazały znaczącą cytotoksyczność, szczególnie wobec linii komórkowych ludzkiego raka piersi. Związek (**100b**) charakteryzował się najlepszą aktywnością hamującą komórek MCF-7 ( $IC_{50} = 6,79 \mu\text{M}$ ) i MDA-MB-231 ( $IC_{50} = 6,46 \mu\text{M}$ ). Ponadto, pochodne (**100a-c**) indukowały apoptozę ludzkich komórek raka piersi w sposób zależny od dawki,

wykazując działanie przeciwnowotworowe poprzez uszkodzenie DNA, powodując zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G0/G1 [64].

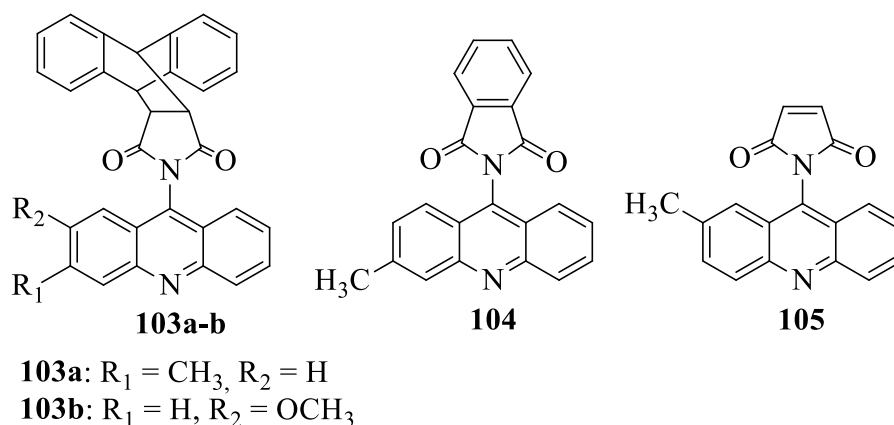
Roe i in. [65] zaprezentowali pochodne akrydyny (**101a-d**) (Rys. 14) jako inhibitory telomerazy. Wszystkie zsyntetyzowane związki (**101a-d**) zbadano pod kątem hamowania wzrostu komórek nowotworowych, w tym MCF7, A549, GIST48 i WI38. Pochodne (**101a-d**) wykazywały najlepszą aktywność wobec A549 ( $IC_{50} = 0,1-0,5 \mu M$ ). Związki (**101c-d**) zawierające najdłuższe łączniki ( $n = 9$  i  $10$ ) charakteryzowały się silniejszą aktywnością cytotoksyczną w porównaniu do analogu (**101a**) z najkrótszym łącznikiem ( $n = 5$ ) [65].



**Rys. 14.** Struktury chemiczne związków (**101a-d**) [65], (**102**) [66].

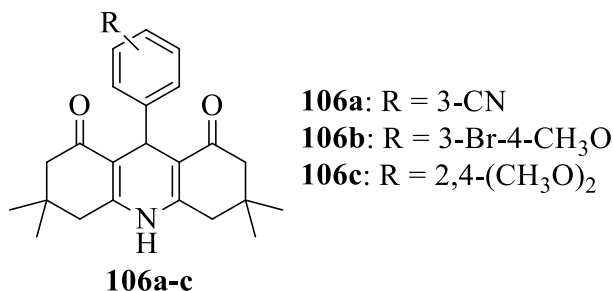
Calvillo-Páez i in. [66] zaprezentowali mono-alkilową pochodną akrydyny (**102**) (Rys. 14) jako związek wiążący DNA o potencjalnej aktywności antyproliferacyjnej. Badania rozpoznawania molekularnego pokazały, że pochodna (**102**) posiada wysokie powinowactwo ( $K \sim 10^5 M^{-1}$ ) i selektywność do ds-DNA, prawdopodobnie w wyniku interkalacji. Częsteczkę (**102**) poddano badaniom *in vitro* wobec liniom komórkowym: HeLa, A-549, LS-180, PC-3 i ARPE-19. Najwyższą aktywność wykazał on wobec HeLa ( $IC_{50} = 13,6 \mu g/mL$ ) [66].

Arya i in. [67] poddali badaniom *in vitro* pochodne pirolidyno-2,5-dionakrydyny (**103a-b**, **104**, i **105**) (Rys. 15) przeciw liniom komórkowym ludzkich nowotworów (T47D, NCI H-522, HCT-15, PA-1, Hep G2). Najbardziej aktywna wobec T47D była pochodna (**103a**) ( $IC_{50} = 5.4 \mu M$ ), przeciw NCI H-522 analog (**103b**) ( $IC_{50} = 4.2 \mu M$ ), w przypadku HepG-2 związek (**104**) ( $IC_{50} = 4.5 \mu M$ ), z kolei wobec HCT-15 najwyższą cytotoksyczność posiadała cząsteczka (**105**) ( $IC_{50} = 2.4 \mu M$ ). Związki zawierające 7- lub 8-podstawione ugrupowanie akrydyny grupą elektronodonorową charakteryzowały się wyższą aktywnością. Wynikać to może z bardziej efektywnego oddziaływania tych cząsteczek z DNA w porównaniu z innymi pochodnymi [67].



**Rys. 15.** Struktury chemiczne pochodnych akrydyny (**103a-b**, **104**, **105**) [67].

Ramesh i Pasha [15] otrzymali pochodne 9-aryloheksahydroakrydino-1,8-dionu (**106a-c**) (Rys. 16), które wykazały obiecujące działanie przeciwnowotworowe przeciwko liniom komórkowym HepG-2 i MCF-7. Związki (**106a-c**) charakteryzowały się dobrą aktywnością w stosunku do HepG-2 ( $\text{IC}_{50} = 1,4\text{-}2,2 \mu\text{g/mL}$ ) i MCF-7 ( $\text{IC}_{50} = 4,7\text{-}5,3 \mu\text{g/mL}$ ). Najwyższą cytotoxycyzość wobec obu linii komórkowych posiadał związek (**106a**).



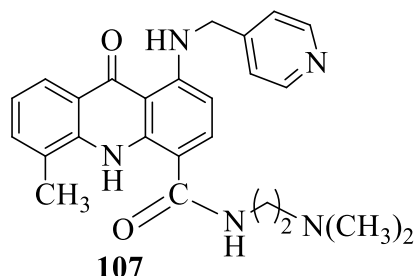
**Rys. 16.** Struktury chemiczne 9-aryloheksahydroakrydino-1,8-dionu (**106a-c**) [15].

Zhang i in. [68] otrzymali pirydylowe pochodne akrydonu jako środki silnie wiążące DNA i indukujące apoptozę. Większość analogów wykazała dobrą cytotoxycyzość wobec komórek K562. Najlepszą zdolność hamowania K562 posiadał związek (**107**) (Rys. 17) zawierający grupę metylową w pozycji C5 akrydonu ( $\text{IC}_{50} = 0,46 \mu\text{M}$ ). W przypadku cząsteczek zawierających dwie grupy metylenowe pomiędzy grupą *N,N*-dimetyloaminową i 4-karboksyamidową obserwuje się lepszą aktywność antyproliferacyjną, w porównaniu do pochodnych posiadających trzy jednostki metylenowe. Ponadto, związki z grupą *N,N*-dimetyloaminową w łańcuchu bocznym 4-karboksyamidu charakteryzowały się lepszą cytotoxycyzością w porównaniu do analogów zawierających grupę metoksyłową, nie wykazujących aktywności [68].

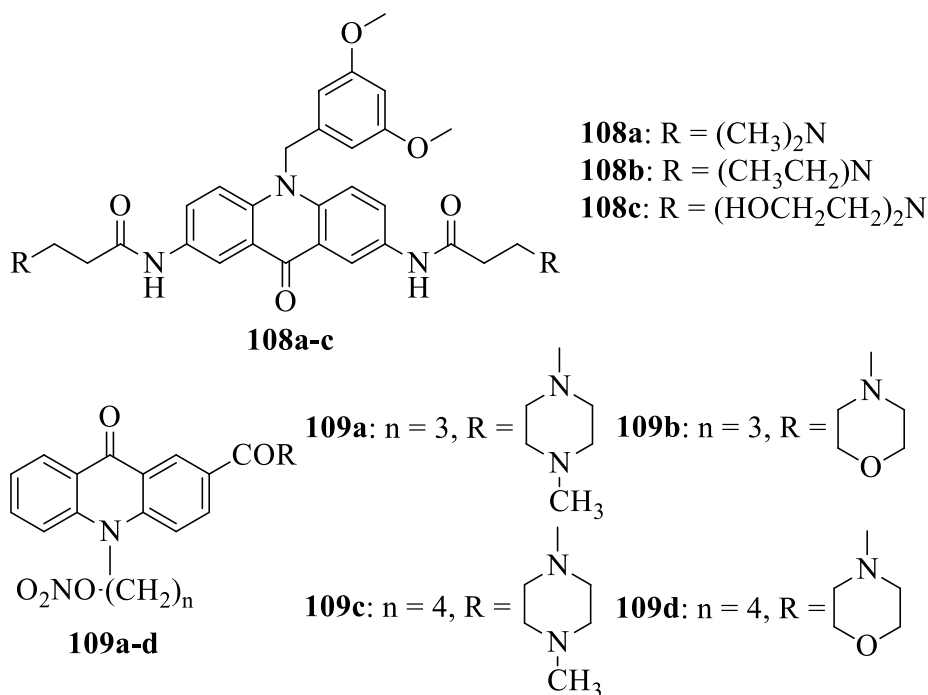
Dodatkowo, związek (**107**) zbadano *in vitro* przeciwko liniom komórkowym NCI-H520, U251, A375, A172, HeLa, U-118 MG, HepG2 i MCF-7. Uzyskane wyniki



pokazały, że **107** posiada szerokie działania przeciwnowotworowe. Pochodna (**107**) charakteryzowała się najlepszą aktywnością antyproliferacyjną wobec komórek A375 ( $IC_{50} = 0,16 \mu M$ ) i HepG2 ( $IC_{50} = 0,32 \mu M$ ). Ponadto metody spektrofotometryczne, pomiar lepkości i test hamowania topoiizomerazy I wykazały, że związek (**107**) silnie wiązał się z DNA, hamował aktywność topoiizomerazy, a także indukował apoptozę [68].



**Rys. 17.** Struktura chemiczna pirydylowej pochodnej akrydonu (**107**) [68].



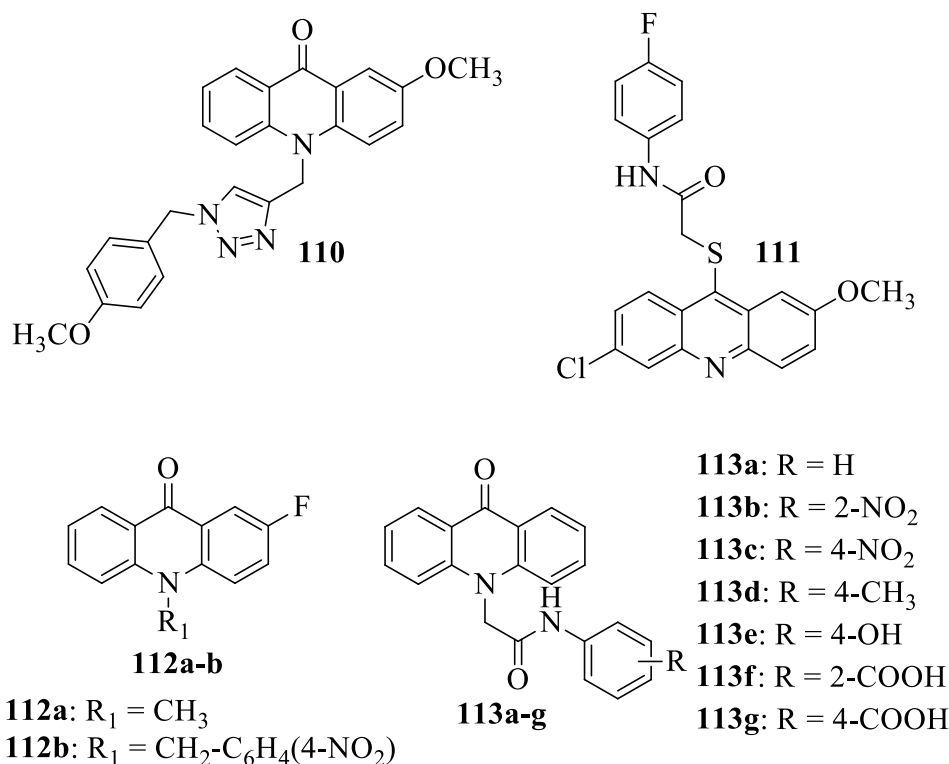
**Rys. 18.** Struktury chemiczne analogów 10-(3,5-dimetoksy)benzylo-9(10H)-akrydonu (**108a-c**) [69] oraz pochodnych (**109a-d**) [70].

Gao i in. [69] ocenili pochodne 10-(3,5-dimetoksy)benzylo-9(10H)-akrydonu (**108a-c**) (Rys. 18) pod kątem ich działania antyproliferacyjnego. Najwyższą aktywność wobec komórek białaczkowych CCRF-CEM wykazał związek (**108a**) ( $IC_{50} = 0,3 \mu M$ ) z podstawnikami dimetyloaminowymi na końcach łańcuchów. Z kolei związki (**108b,c**), zawierające grupy dietyloaminowe i dietanoloaminowe, posiadały zmniejszone działanie hamujące. Ponadto,

(**108a**) charakteryzował się niską toksycznością przeciwko komórkom 293T ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ) [69].

Prasad i in. [70] zaprezentowali pochodne akrydonu (**109a-d**) (Rys. 18) jako potencjalne związki przeciwnowotworowe. Związki (**109a-d**) wykazały najwyższą aktywność wobec komórek raka piersi MCF7 ( $IC_{50} = 0,8-1,6 \mu M$ ). Dodatkowo, analogi (**109a-d**) zbadano pod kątem aktywności wobec linii komórkowych raka jelita grubego (WiDr, SW1398, LS174T). Cząsteczki (**109a-d**) charakteryzowały się dobrą zdolnością hamowania i selektywnością wobec SW1398 ( $IC_{50} = 1.7-11 \mu M$ ), WiDr ( $IC_{50} = 2.8-19.1 \mu M$ ) i LS174T ( $IC_{50} = 3.1-18.2 \mu M$ ) [70].

Zespół Mohammadi-Khanaposhtani [71] przedstawił 1,2,3-triazolowe pochodne akrydonu jako inhibitory przeciwnowotworowe. Otrzymane analogi zostały zbadane przeciwko trzem liniom komórkowym raka piersi MCF-7, T47D i MDA-MB-231. Najlepszą zdolność hamowania wobec MCF-7 ( $IC_{50} = 11,0 \mu M$ ), T-47D ( $IC_{50} = 14.5 \mu M$ ) i MDA-MB-231 ( $IC_{50} = 16,6 \mu M$ ) posiadał związek (**110**) (Rys. 19), zawierający grupę metoksy w pozycji C2 akrydonu. Cząsteczki zawierające *mono*-metoksy podstawione ugrupowanie benzytowe wykazały lepszą cytotoxycznosc ( $IC_{50} = 11.0-60.0 \mu M$ ) w porównaniu do pochodnych *tri*-metoksy podstawionych, które nie posiadały aktywności ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ). [71].



**Rys. 19.** Struktury chemiczne 1,2,3-triazolowej (**110**) [71], tioacetamidowej (**111**) pochodnej, N10-podstawionych (**112a-b**) [73] analogów akrydonu oraz 2-(9-oksoakrydyn-10(9H)-ylo)-N-fenylacetamidów (**113a-g**) [74].

Otrzymano także serię nowych akrydyn połączonych z tioacetamidami [72]. Związek (**111**) (Rys. 19) przejawiał aktywność cytotoksyczną przeciwko MCF-7 z wartością  $IC_{50} = 13,42 \mu M$ , niewiele niższą niż w przypadku standardowego leku etopozydu ( $IC_{50} = 12,4 \mu M$ ). Dodatkowo, pochodna (**111**) nie wykazała toksyczności wobec ludzkich komórek fibroblasty w stężeniu  $100 \mu M$ . Ponadto, wszystkie nowo otrzymane związki doskonale hamowały  $\alpha$ -glukozydazę w zakresie  $IC_{50} = 80,0-383,1 \mu M$ , w porównaniu do standardowego leku akarbozy ( $IC_{50} = 750,0 \mu M$ ) [72].

Kumar i współpracownicy [73] zsyntetyzowali *N*10-podstawione pochodne akrydonu (**112a-b**) (Rys. 19). Za pomocą testu MTT zbadano działanie cytotoksyczne analogów wobec czterech linii komórkowych (MCF-7, A-549, HT-29 i HeLa). Związek (**112b**) zawierający grupę *p*-nitrobenzylową w pozycji *N*10 i fluor w pozycji C2, wykazał dobrą aktywność cytotoksyczną wobec MCF-7, A-549 i HeLa, z wartościami  $IC_{50}$  równymi 57,4, 43,1 i 39,5  $\mu M$ , odpowiednio. Z kolei pochodna (**112a**), z grupą metylową w pozycji *N*10 2-fluoroakrydonu, wykazywała umiarkowany efekt hamujący [73].

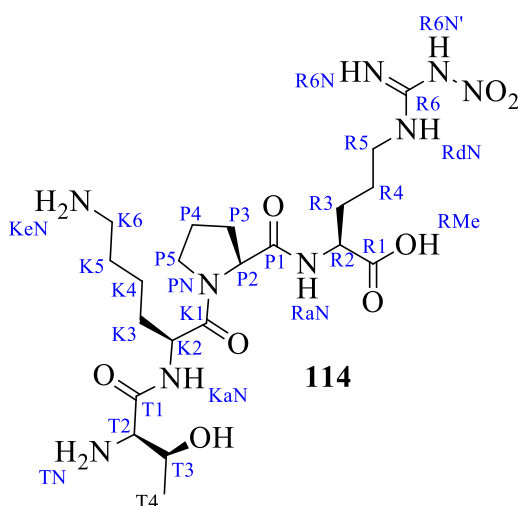
Kumar i in. [74] zbadali *in vitro* pochodne 2-(9-oksoakrydyn-10(9*H*)-ylo)-*N*-fenyloacetamidów (**113a-g**) (Rys. 19) pod kątem ich aktywności przeciwrakowej przeciwko trzem ludzkim liniom komórek nowotworowych (MCF-7, HeLa i A-549). Koniugaty zawierające grupę karboksylową w pozycji 2 lub 4 w pierścieniu fenylowym (**113f** i **113g**) wykazywały największą zdolność hamowania wobec MCF-7 ( $IC_{50} = 6.07$  i  $7.12 \mu M$ , odpowiednio), HeLa ( $IC_{50} = 8.80$  i  $10.66 \mu M$ , odpowiednio) i A-549 ( $IC_{50} = 7.39$  i  $8.80 \mu M$ , odpowiednio). Ponadto analogi (**113b,c,e,g,f**), zawierające grupy elektronoakceptorowe (-COOH, -NO<sub>2</sub>, -OH) charakteryzowały się lepszą aktywnością cytotoksyczną w porównaniu do niepodstawionego analogu (**113a**) lub związku (**113d**) z grupą uwalniającą elektrony (-CH<sub>3</sub>) [74].

Struktury chemiczne otrzymanych i badanych w pracy koniugatów zbudowane są z pochodnych akrydyny/akrydonu połączonej poprzez utworzenie wiązania węgiel-azot w reakcji substytucji nukleofilowej z analogami tuftsyny/retro-tuftsyn. Poniżej przedstawiłam krótką charakterystykę tuftsyny.

### 1.3. Tuftsyna

W 1970 roku na Uniwersytecie Tufts w Bostonie, Najjar i Nishioka po raz pierwszy wyizolowali tuftsynę (**114**), endogenny tetrapeptyd o sekwencji Thr-Lys-Pro-Arg (Rys. 20). Peptyd ten naturalnie występuje we krwi człowieka i innych ssaków.

W organizmie tuftsyna (**114**) aktywna jest wyłącznie w postaci wolnego peptydu [75]. Stanowi fragment ciężkiego łańcucha Fc (289-292) immunoglobuliny typu G i uwalniana jest w wyniku działania specyficznych enzymów takich, jak leukokininaza znajdująca się w błonach komórek fagocytujących oraz endokarboksypeptydaza tuftsynowa śledziony [76]. Działanie endokarboksypeptydazy powoduje rozszczepienie wiązania peptydowego pomiędzy Arg<sup>292</sup> a Glu<sup>293</sup>, z kolei leukokininaza wpływa na wiązanie pomiędzy Lys<sup>288</sup> a Thr<sup>289</sup>.



Rys. 20. Struktura chemiczna tuftsyny (**114**).

Mechanizm działania tetrapeptydu (**114**) nie jest do końca poznany. Prawdopodobnie na początku **114** łączy się z komórką fagocytarną wykorzystując siły elektrostatyczne, następnie przemieszcza się na wybrane receptory i zachodzi internalizacja kompleksu receptor-peptyd.

Uwolniona tuftsyna (**114**) zwiększa ruchliwość, fagocytozę, pinocytozę oraz chemotaksję [76]. Aktywuje makrofagi do zwalczania infekcji bakteryjnych, poprawia komunikację pomiędzy układem odpornościowym (makrofagi, limfocyty T i wytwarzające przeciwciała limfocyty B). Ponadto **114** wzmacnia odpowiedź immunologiczną wobec nowotworów oraz opóźnia wzrost guzów. Stymuluje produkcję komórek krwi przez szpik kostny [77]. Dodatkowo peptyd (**114**) reguluje również poziom noradrenaliny, serotoniny, a

także dopaminy. Może powodować zmiany poziomu monoamin, acetylocholin i protein w strukturach kory i podkorza mózgu [75].

W przypadku osób z usuniętą śledzioną zauważono niekorzystny dla organizmu niedobór tuftsyny (**114**). A więc, pacjenci mający uszkodzoną śledzionę, są znacznie bardziej narażeni na ostre infekcje. Deficyt tego immunomodulatora obserwowano również w przypadku takich schorzeń jak anemia sierpowata, AIDS oraz białaczka Hidgkina [78].

### 1.3.1. Właściwości tuftsyny

Tuftsyna (**114**) charakteryzuje się unikalnymi właściwościami biologicznymi. Wykazuje działanie immunoaktywne, przeciwnowotworowe, przeciwwirusowe, przeciwgrzybicze a także przeciwbakteryjne. Dodatkowo tuftsyna (**114**) działa przeciwbólowo [78], co potwierdza jej bezpośredni wpływ na układ nerwowy. Peptyd ten (**114**) może hamować degenerację aksonów, opóźnić śmierć neuronów oraz przekształcać komórki mikrogleju w mniej rozgałęzione i owalne kształty. Ponadto tuftsyna (**114**) poprawia funkcjonowanie układu neurologicznego oraz łagodzi objawy głodu narkotycznego, zwiększa ciśnienie tętnicze krwi i hamuje kurczenie się naczynek limfatycznych [78,79].

Raibon i in. [80] udowodnili, że inhibitor fragmentu 1-3 tuftsyny (TKP) wprowadzony do ciała szklatego oka przyczynia się do zwiększonej regeneracji aksonów warstwy zwojowej siatkówki oraz zmniejsza ilości fagocytów w siatkówce.

Grupa Wang'a [81] dowiodła, że tripeptyd (TKP) działa jako inhibitor makrofagów/mikrogleju, który odgrywa ważną rolę ochronną zapobiegającą krwotokowi śródmózgowemu. Z kolei fragment 1-2 tuftsyny (TK) obniża produkcję wolnych rodników oraz ilość neuronów ulegających degradacji.

Szlak sygnalizacyjny tuftsyny (**114**) nie został jeszcze w pełni poznany, pomimo tego, że jest ona znana już od czterdziestu lat. Ostatnio udowodniono, że peptyd ten (**114**) wiąże się z neuropiliną-1 (Nrp-1) [82,83]. Nrp-1 jest receptorem odgrywającym zasadniczą rolę w angiogenezie, przepuszczalności naczyń oraz w rozwoju systemu nerwowego. Tuftsyna (**114**) zawierająca sekwencję podobną do końca VEGF-A165, wiąże się z Nrp-1 za pomocą sieci interakcji, konkurując z VEGF. Ponadto dowiedziono, że obecność receptorów dla tetrapeptydu (**114**) na komórkach śródbłonna odzwierciedla zdolność tych komórek do udziału w reakcji zapalnej. W związku z tym stosowanie odpowiednich sond mogłoby okazać się skuteczne w uwidacznianiu zapaleń naczyń *in vivo* [84].

Dodatkowo tuftsyna (**114**) połączona z przeciwciałem anti-CA125 może powodować ochronę immunologiczną przeciwko rakowi jajnika *in vivo* [85]. Aktywność nowotworowa może być związana z fagocytozą. Tetrapeptyd (**114**) połączono również z przeciwciałem poprzez łącznik Ser-Gly-Gly-Gly, w wyniku czego otrzymano białko fuzyjne scFv-tuftsyna. Immunizacja tym białkiem wzmocniła humoralną odpowiedź immunologiczną poprzez zwiększoną produkcję przeciwciał anti-idiotypowych Ab2 i anti-antyidiotypowych Ab3 [86].

Tuftsyna (**114**) indukuje pinacytozę oraz redukuje w procesie fagocytozy jon ponadtlenny  $O_2^-$ , co powoduje powstawanie kolejnych form tlenowych, prowadząc do wzbudzonych stanów elektronowych i luminescencji fagocytów. Efektem tego jest zwiększenie poprzez fagocyty właściwości bakteriobójczych, ponieważ powstałe formy tlenowe są toksyczne dla drobnoustrojów. Niszczeniu ulegają komórki i tkanki otaczające fagocyty, w tym komórki nowotworowe. Badania wykazały, że peptyd (**114**) podawany wraz z nystatyną, myszom zakażanym *Candida albicans*, wzmacnia właściwości przeciwrzybicze leku [87].

Podczas leczenia kryptokokowego zapalenia opon mózgowych u myszy z leukopenią zastosowano liposomy z przyłączoną do powierzchni tuftsyną, zmodyfikowaną na C-końcu (Thr-Lys-Pro-Arg-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-COC<sub>15</sub>H<sub>31</sub>) [88]. Taka modyfikacja ułatwia przyłączenie peptydu (**114**) do podwójnej warstwy liposomów. Zaobserwowano wzrost aktywności mysich makrofagów otrzewnowych. Udowodniono, że liposomalna nystatyna z tuftsyną jest skuteczniejsza, bezpieczniejsza oraz bardziej stabilna niż liposomalna nystatyna bez połączenia z tuftsyną. Podanie tuftsyny z liposomalną nystatyną zwiększa jej aktywność przeciwko *Cryptococcus*. Ze względu na obecność receptorów na makrofagach, liposomalna tuftsyna służy jako transporter leku, specyficznie dostarczając go do odpowiednich miejsc, w infekcjach malarii [89], gruźlicy i leiszmaniozy [90].

Trevisani i in. [91] udowodnili, że aktywność oraz stężenie tuftsyny (**114**) jest niższe w przypadku marskości wątroby i uszkodzonej śledziony, przyczyniając się do osłabienia aktywności fagocytarnej granulocytów.

Pavlov i Samonina [92] odkryli zdolność tuftsyny (**114**) do zmniejszania owrzodzeń. Naukowcy dowiedli, że podawanie tetrapeptydu (**114**) powoduje ograniczenie miejsca owrzodzenia, a także szybsze gojenie się chorej tkanki.

Przed wylęgnięciem piskląt stosowane są szczepienia embrionalne kurczaków w połączeniu z tuftsyną, w celu zapewnienia ochrony przed infekcjami. Szczepienia te okazują się bardzo skuteczne przeciwko chorobom Mareka, Gumboro i Newcastle (NDV) oraz krwotocznemu zapaleniu jelit i zapaleniu oskrzeli. Badania wykazują, że po podaniu

szczepionki embrionalnej przeciwko NDV wraz z tuftsyną, po kilku tygodniach wzrasta stężenie peptydu chroniąc tym samym przed chorobami układu immunologicznego [93].

Tuftsynę (**114**) wykorzystano także w celu otrzymania radiofarmaceutycznego związku  $^{99m}\text{TcRP-128}$ , który uwidacznia zmienione chorobowo miejsca w reumatoidalnym zapaleniu stawów. W jego skład wchodzi antagonist tuftsyny - TKPPR, który posiada zdolność czterokrotnie silniejszego wiązania się *in vivo* z receptorami na powierzchni fagocytycznych komórek. Pozwala on na wykrycie i oznaczenie obszarów zapalnych w centralnym systemie nerwowym [94].

Ponadto, naukowcy zbadali wpływ tuftsyny (**114**) na ryby. Badania przeprowadzono na karpniu z gatunku *Labeorohita*, któremu wstrzyknięto peptyd (**114**) czterokrotnie w dwutygodniowych odstępach. Po tym czasie zaobserwowano zwiększoną odporność na infekcje oraz wzrost niespecyficznego odpowiedzi immunologicznej. Wyniki te mogą posłużyć w celu ochrony hodowli ryb [95].

Pomimo tak korzystnych właściwości tuftsyny (**114**), peptyd ten (**114**) nie jest stabilny, jego okres półtrwania w krwi wynosi 16 min. Jest on hydrolizowany przez aminopeptydazę leucynową, karboksypeptydazę B, protonazę oraz subtylizynę. W wyniku tej hydrolizy powstają tripeptydy, takie jak: Lys-Pro-Arg i Thr-Lys-Pro. Związki te inhibują aktywność tuftsyny [78]. Tak więc, aby właściwości tuftsyny (**114**) mogły być w pełni wykorzystywane, należy pracować nad znalezieniem bardziej trwałych analogów tuftsyny oraz jej połączeń z różnymi biologicznie czynnymi związkami.

## 2. CEL I ZAKRES PRACY

Celem mojej pracy doktorskiej była synteza oraz badania aktywności biologicznej nowych peptydowych pochodnych 1-nitroakrydyny (**115a-e**, **117**), 4-metylo-1-nitroakrydyny (**116a-e**, **118**) oraz 4-nitro-9(10*H*)-akrydonu (**119a-e**, **120a-e**) (Rys. 21).

Praca syntetyczna obejmowała:

- syntezę 9-fenoksy-1-nitroakrydyny (**125a**)
- syntezę 9-fenoksy-4-metylo-1-nitroakrydyny (**125b**)
- syntezę 1-chloro-4-nitro-9(10*H*)akrydonu (**130**)
- syntezę pochodnych tuftsyny/retro-tuftsyny:
  - TFAxThr-Lys(Fmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> (**154**),
  - TFAxThr-Lys(GlyFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> (**143a**),
  - TFAxThr-Lys(β-AlaFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> (**143b**),
  - TFAxThr-Lys(ValFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> (**143c**),
  - TFAxThr-Lys(LeuFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> (**143d**),
  - TFAxArg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> (**155**),
  - TFAxArg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(GlyFmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> (**153a**),
  - TFAxArg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(β-AlaFmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> (**153b**),
  - TFAxArg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(ValFmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> (**153c**),
  - TFAxArg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(LeuFmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> (**153d**);
- syntezę analogów 1-nitroakrydyny z pochodnymi tuftsyny/retro-tuftsyny (**115a-e**, **117**)
- syntezę analogów 4-metylo-1-nitroakrydyny z pochodnymi tuftsyny/retro-tuftsyny (**116a-e**, **118**)
- syntezę analogów 4-nitro-9(10*H*)akrydonu z pochodnymi tuftsyny/retro-tuftsyny (**119a-e**, **120a-e**)

Praca biologiczna obejmowała:

- badania żywotności komórek testem kolorymetrycznym MTT poddanych działaniu otrzymanych związków (**115a-e**, **116a-e**, **117**, **118**, **119a-e**, **120a-e**) wobec komórek Jurkat i PBMC;

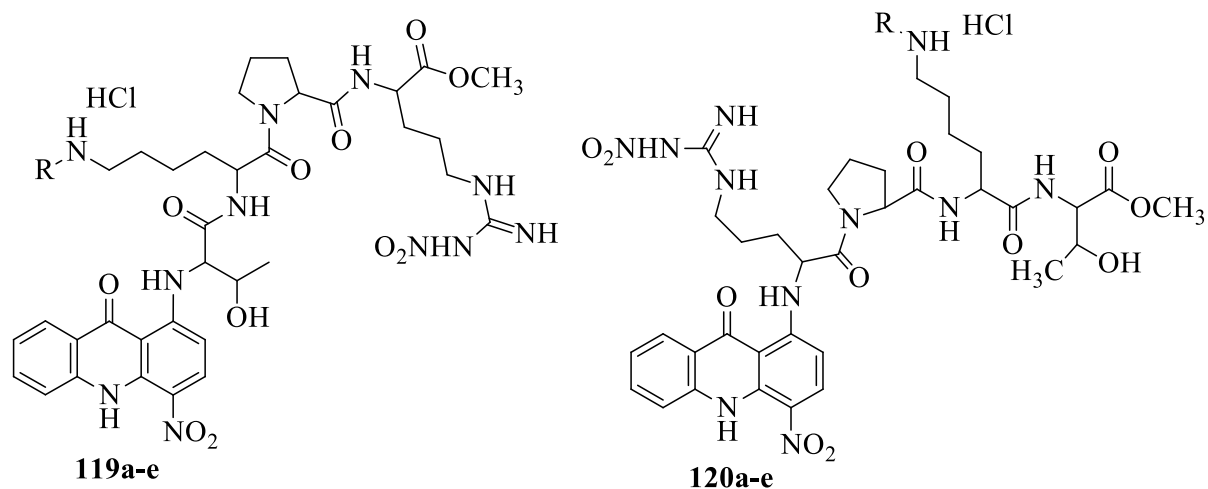
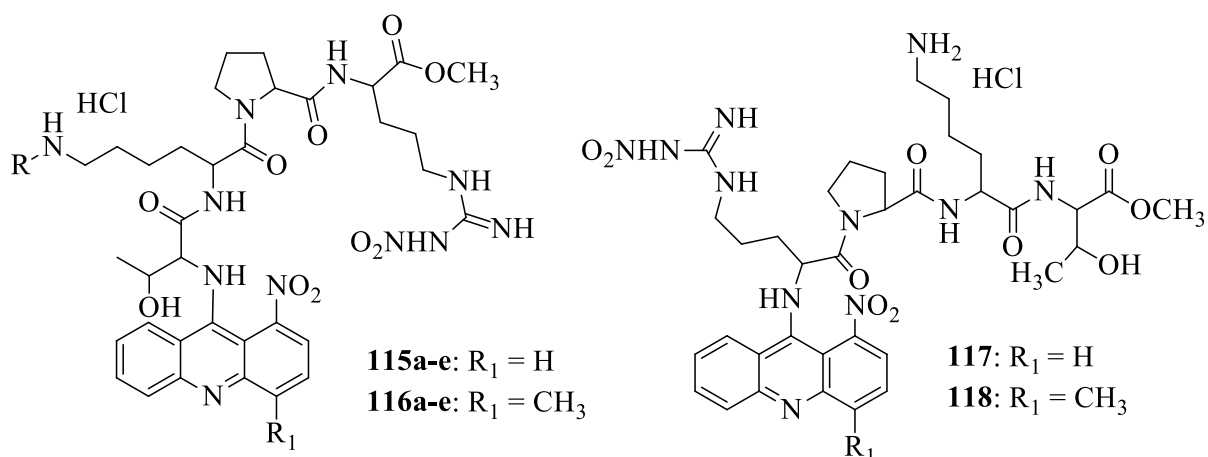


- badania żywotności komórek testem kolorymetrycznym XTT poddanych działaniu otrzymanych związków (**115a-e, 116a-e, 117, 118, 119a-e, 120a-e**) wobec amelanotycznych Ab i melanotycznych Ma komórek czerniaka i dwóm postaciom neuroblastomy SH-SY5Y: cholinergicznej DC i dopaminergicznej NC;
- badania apoptozy komórek czerniaka i neuroblastomy jako aktywację kaspaz i eksternalizację fosfatydyloseryny w błonie komórkowej, a także uszkodzone komórki w fazie sub-G1 dla pochodnej (**117**).

Prace syntetyczne wykonałam w Katedrze Chemii Organicznej Politechniki Gdańskiej pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Krystyny Dzierzbickiej.

Badanie aktywności biologicznej na linii komórkowej Jurkat i PBMC przeprowadziłam samodzielnie w Zakładzie Immunologii Klinicznej i Transplantologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem prof. dr hab. med. Piotra Trzonkowskiego.

Badanie aktywności biologicznej na liniach komórkowych czerniaka i neuroblastomy zostały wykonane w Zakładzie Embriologii GUMed przez zespół dr hab. med. Mirosławy Cichorek, prof. nadzw. oraz dr n. med. Annę Ronowską z Zakładu Medycyny Laboratoryjnej GUMed.



**115a, 116a, 117, 118, 119a, 120a:**  $R = H$

**115b, 116b, 119b, 120b:**  $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$

**115c, 116c, 119c, 120c:**  $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$

**115d, 116d, 119d, 120d:**  $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{CH}(\text{CH}_3)\text{NH}_2$

**115e, 116e, 119e, 120e:**  $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$

**Rys. 21.** Struktury chemiczne otrzymanych pochodnych 1-nitroakrydyny (**115a-e, 117**), 4-metylo-1-nitroakrydyny (**116a-e, 118**) oraz 4-nitro-9(10H)-akrydonu (**119a-e, 120a-e**).

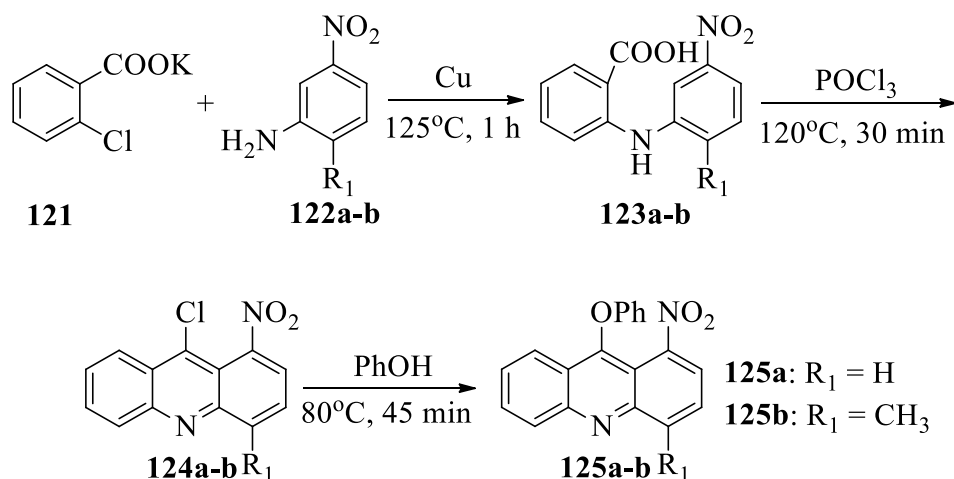
### 3. WYNIKI WŁASNE

#### 3.1. Prace syntetyczne

Część syntetyczna pracy obejmowała otrzymanie 9-fenoksy-1-nitroakrydyny (**125a**), 9-fenoksy-4-metylo-1-nitroakrydyny (**125b**), 1-chloro-4-nitro-9(10*H*)-akrydonu (**130**), pochodnych tuftsyny (**143a-d**, **154**) oraz retro-tuftsyny (**153a-d**, **155**) (pochodnej tuftsyny o odwróconej sekwencji). Następnie odpowiednie peptydy połączyłam z cząsteczkami akrydyny i akrydonu otrzymując zaplanowane związki (**115a-e**, **116a-e**, **117**, **118**, **119a-e**, **120a-e**) (Rys. 21).

##### 3.1.1. Synteza pochodnych akrydyny (**125a-b**)

Synteza 9-fenoksy-1-nitroakrydyny (**125a**) oraz 9-fenoksy-4-metylo-1-nitroakrydyny (**125b**) obejmowała trzy etapy: reakcję Ullmanna, cyklizację kwasów antranilowych (**123a-b**) oraz przeprowadzenie 9-chloroakrydyn (**124a-b**) w stabilniejsze 9-fenoksyakrydyny (**125a-b**) (Schemat 16) [26,96].

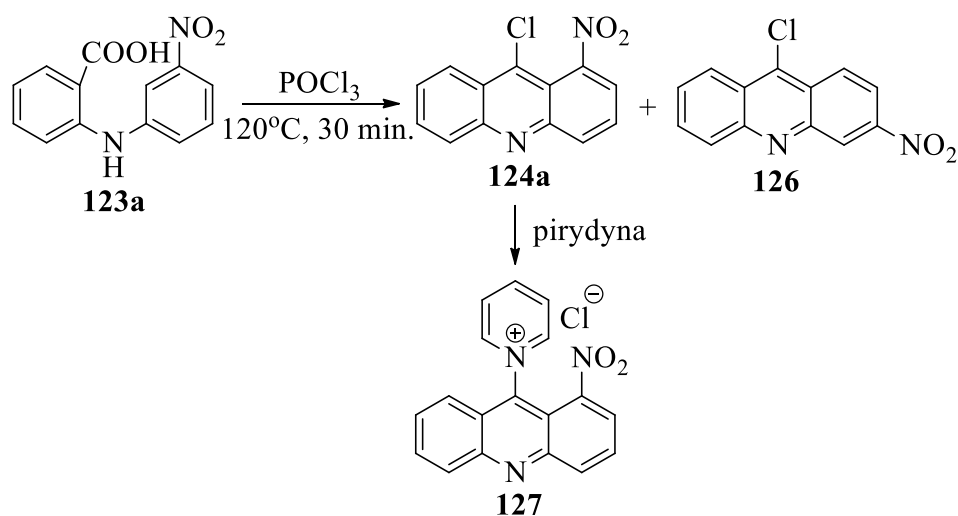


Schemat 16. Synteza pochodnych 9-fenoksyakrydyny (**125a-b**).

W pierwszym etapie syntezy analogów akrydyny otrzymałam kwas *N*-(3'-nitrofenylo)antranilowy (**123a**) oraz kwas *N*-(2'-metylo-5'-nitrofenylo)antranilowy (**123b**). Z uwagi na fakt, iż użycie soli potasowej kwasu *o*-chlorobenzoesowego (**121**), prowadzenie reakcji w stopie, a także stosowanie świeżo strąconej miedzi jako katalizatora

wpływają na wzrost wydajności kondensacji Ullmanna, dlatego też warunki te zastosowałam w przeprowadzonej przeze mnie syntezie analogów kwasu antranilowego (**123a-b**).

W następnych etapach pochodne kwasu antranilowego (**123a-b**) przeprowadziłam w 9-chloroakrydyny (**124a-b**). Jako czynnik cyklizujący zastosowałam POCl<sub>3</sub>, który użyty w nadmiarze dodatkowo pełnił rolę środowiska reakcji [27,96]. Po zakończeniu reakcji oddestylowałam POCl<sub>3</sub> pod zmniejszonym ciśnieniem, następnie otrzymane masy rozcieńczyłam chloroformem i przemyłam mieszaniną amoniak:chloroform (1:3, v/v) w celu usunięcia pozostałości odczynnika kondensującego. Po rozdzieleniu faz, warstwy organiczne wysuszyłam za pomocą bezw. MgSO<sub>4</sub>, a rozpuszczalnik oddestylowałam do sucha. W przypadku kwasu *N*-(3'-nitrofenylo)antranilowego (**123a**) otrzymałam osad będący mieszaniną izomerów: 9-chloro-1-nitroakrydyny (**124a**) oraz 9-chloro-3-nitroakrydyny (**126**) (Schemat 17). Izomery rozdzieliłam wykorzystując ich różnice rozpuszczalności w pirydynie [97]. Izomer (**124a**) tworzy rozpuszczalny kompleks, podczas gdy związek (**126**) jest nierozpuszczalny w zastosowanym rozpuszczalniku. W reakcji cyklizacji kwasu *N*-(3'-nitrofenylo)antranilowego (**123a**) izomery 9-chloro-1-nitroakrydyny (**124a**) i 9-chloro-3-nitroakrydyny (**126**) powstają odpowiednio w stosunku 7:3.



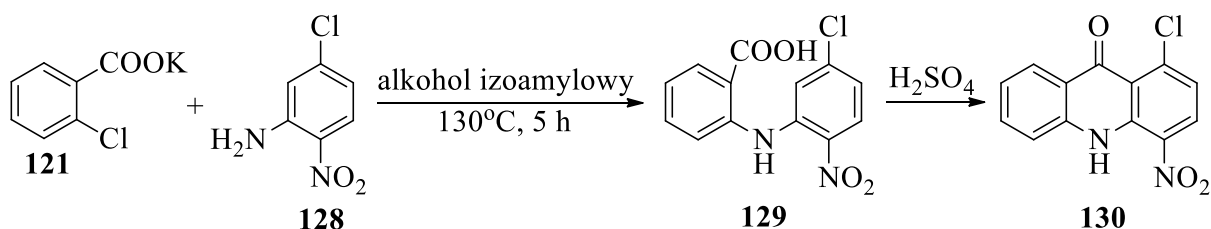
**Schemat 17.** Synteza 9-chloro-1-nitroakrydyny (**124a**).

9-Chloroakrydyny są związkami nietrwałymi [27], dlatego też **124a-b** bezpośrednio po wyizolowaniu poddałam reakcji z trzykrotnym nadmiarem fenolu otrzymując stabilne 9-fenoksy pochodne (**125a-b**). W celu usunięcia nadmiaru fenolu, gorące roztwory wylałam do mieszaniny benzen:5% KOH (1:1, v/v), warstwy rozdzieliłam i fazy organiczne wysuszyłam bezw. MgSO<sub>4</sub>. Po oddestylowaniu pod zmniejszonym ciśnieniem benzenu otrzymane masy zalałam eterem dietylowym, w wyniku czego wypadły osady produktów (**125a-b**).

### 3.1.2. Synteza pochodnej akrydonu (130)

1-Chloro-4-nitro-9(10*H*)-akrydon (**130**) otrzymałam w dwóch etapach (Schemat 18). Podobnie jak w przypadku pochodnej akrydyny, reakcja Ullmanna stanowiła pierwszy etap syntezy [27,96]. Jako substraty wyjściowe zastosowałam sól potasową kwasu *o*-chlorobenzoowego (**121**) i 5-chloro-2-nitroanilinę (**128**). Reakcję prowadziłam w świeżo przedestylowanym alkoholu izoamylovym w obecności katalitycznej ilości pyłu miedzi. Po zakończeniu syntezy i oddestylowaniu z parą wodną alkoholu, z pozostałości podestylacyjnej za pomocą rozcieńczonego kwasu solnego wytraciłam kwas *N*-(5'-chloro-2'-nitrofenylo) antranilowy (**129**).

Drugi etap polegał na cyklizacji związku (**129**) w środowisku kwasu siarkowego, w wyniku czego otrzymałam pożądaną 1-chloro-4-nitro-9(10*H*)-akrydon (**130**).



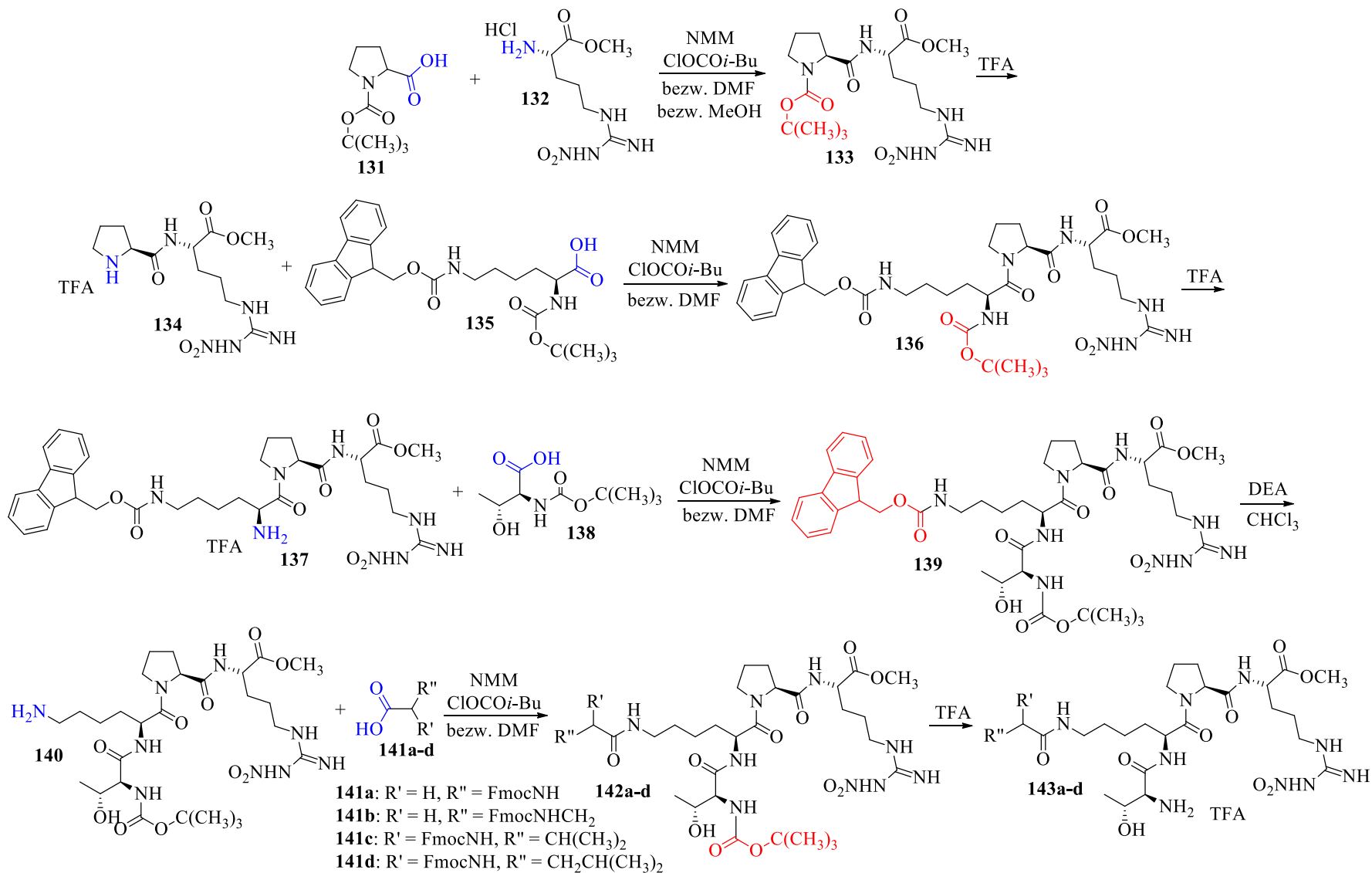
Schemat 18. Synteza 1-chloro-4-nitro-9(10*H*)-akrydonu (**130**).

### 3.1.3. Synteza odpowiednio chronionych pochodnych tuftsyny (143a-d)

Syntezę odpowiednio chronionych pochodnych tuftsyny (**143a-d**) przeprowadziłam za pomocą metody mieszanych bezwodników (Schemat 19). W tym celu *N*-chroniony aminokwas w temp. -20°C w obecności NMM poddałam reakcji z chloromrówczanem izobutyli, w wyniku której w ciągu kilku minut utworzył się mieszany bezwodnik aminokwasowo-węglanowy, który częściowo aminokwasową zdolny był acylować *C*-chroniony aminokomponent wprowadzony po kilku minutach do mieszaniny reakcyjnej.

Syntezę rozpoczęłam od ochrony grupy aminowej proliny za pomocą osłony Boc. Grupę Boc wprowadziłam przy użyciu pirowęglału di-*tert*-butylu [98]. L-Prolinę rozpuściłam w mieszaninie wody i dioksanu, całość umieściłam w łaźni lodowej. Po ochłodzeniu, do mieszaniny reakcyjnej wprowadzałam pirowęglan, utrzymując pH w granicach 9-10 poprzez dodawanie odpowiedniej ilości 1 mol/dm<sup>3</sup> roztworu NaOH. Po zakończeniu reakcji dioksan oddestylowałam pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce rotacyjnej, a warstwę wodną zakwasiłam 10% roztworem wodorosiarczanu potasu do pH 2-3. Następnie warstwę wodną

ekstrahowałam octanem etylu. Warstwy octanowe połączyłam i suszyłam bezw.  $\text{MgSO}_4$ . Rozpuszczalnik oddestylowałam pod zmniejszonym ciśnieniem uzyskując Boc-Pro-OH (**131**). Tak przygotowany związek (**131**) poddałam kondensacji z  $\text{HCl} \times \text{Arg}(\text{NO}_2)\text{-OCH}_3$  (**132**) otrzymując dipeptyd (**133**), z którego za pomocą TFA zdjęłam osłonę Boc z grupy aminowej. Następnie w wyniku reakcji Boc-Lys(Fmoc)-OH (**135**) z C-chronionym dipeptydem (**134**) uzyskałam Boc-Lys(Fmoc)-Pro-Arg( $\text{NO}_2$ )- $\text{OCH}_3$  (**136**). W przypadku syntezy tripeptydu użyłam lizynę z ochroną Fmoc na grupie  $\epsilon$ -aminowej. Zdecydowałam się na tą osłonę, ponieważ ulega ona rozszczepieniu w środowisku zasadowym, natomiast trwała jest w warunkach kwasowych, w przeciwieństwie do osłony Boc [98]. W kolejnym etapie tripeptyd (**136**) poddałam działaniu TFA w celu deprotekcji grupy Boc. Następnie w wyniku kondensacji Boc-Thr-OH (**138**) z  $\text{TFA} \times \text{Lys}(\text{Fmoc})\text{-Pro}(\text{NO}_2)\text{-OCH}_3$  (**137**) otrzymałam Boc-Thr-Lys(Fmoc)-Pro-Arg- $\text{OCH}_3$  (**139**). Kolejno za pomocą 30% roztworu dietyloaminy w chloroformie usunęłam osłonę Fmoc w celu wprowadzenia wybranych aminokwasów (**141a-d**) do łańcucha bocznego  $\epsilon$ -lizyny. W ostatnim etapie pentapeptydy (**142a-d**) zalałam kwasem trifluoroctowym uzyskując pochodne (**143a-d**) (Schemat 19). Otrzymane związki (**143a-d**) oczyściłam za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym i preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej.



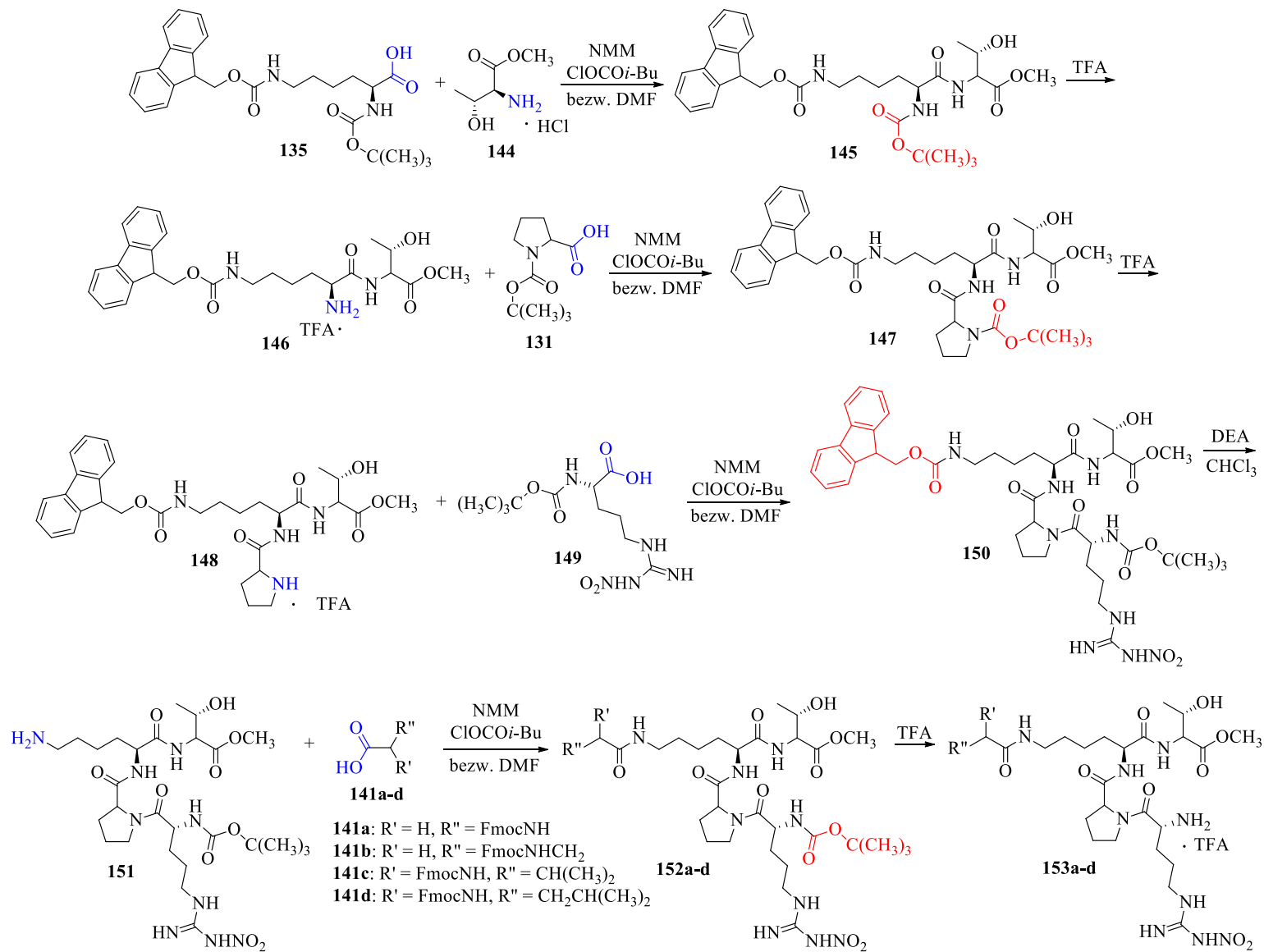
**Schemat 19.** Synteza odpowiednio chronionych pochodnych tuftsyny (**143a-d**).

### 3.1.4. Synteza odpowiednio chronionych pochodnych retro-tuftsyny (153a-d)

Odpowiednio chronione pochodne retro-tuftsyny (**153a-d**) otrzymałam również wykorzystując metodę mieszanych bezwodników (Schemat 20).

Syntezę rozpoczęłam od reakcji kondensacji Boc-Lys(Fmoc)-OH (**135**) z HCl×Thr-OCH<sub>3</sub> (**144**) otrzymując dipeptyd (**145**), który poddałam działaniu TFA. Po deprotekcji osłony Boc związek (**146**) połączyłam z Boc-Pro-OH (**131**) uzyskując Boc-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> (**147**). Tripeptyd (**147**) zalałam kwasem trifluorooctowym w celu odszczepienia grupy Boc. W kolejnym etapie w wyniku kondensacji Boc-Arg(NO<sub>2</sub>)-OH (**149**) z C-chronionym tripeptydem (**148**) otrzymałam liniowy łańcuch tuftsyny o odwróconej sekwencji Boc-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> (**150**). Następnie za pomocą 30% roztworu dietyloaminy w chloroformie usunęłam osłonę Fmoc w celu wprowadzenia wybranych aminokwasów (**141a-d**) do łańcucha bocznego ε-lizyny. W ostatnim etapie pentapeptydy (**152a-d**) zalałam kwasem trifluorooctowym otrzymując związki (**153a-d**) (Schemat 20). Analogi (**153a-d**) oczyściłam za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym i preparatywnej chromatografii cienkowsarstwowej.



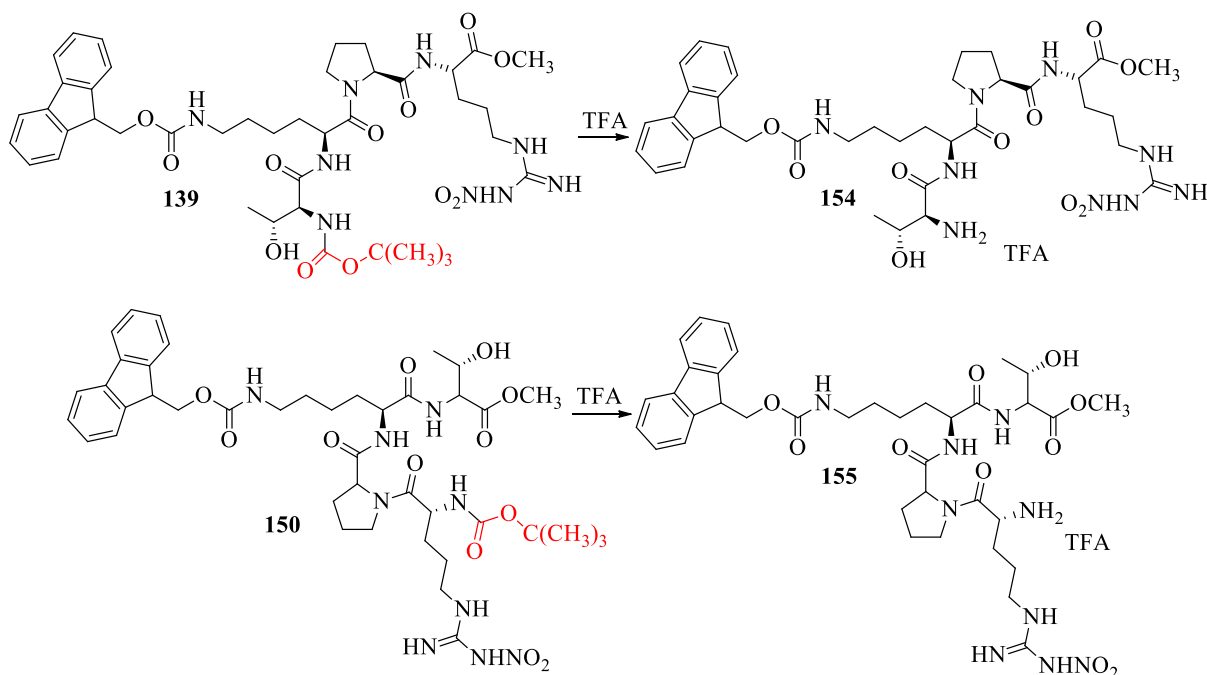


**Schemat 20.** Synteza odpowiednio chronionych pochodnych retro-tuftosyny (**153a-d**).

### 3.1.5. Synteza peptydowych pochodnych 1-nitroakrydyny (**115a-e**, **117**) oraz 4-metylo-1-nitroakrydyny (**116a-e**, **118**)

W celu otrzymania peptydowych pochodnych 1-nitroakrydyny (**115a-e**, **117**) oraz 4-metylo-1-nitroakrydyny (**116a-e**, **118**) przeprowadziłam reakcje przedstawione na Schematach 22 i 23.

Syntezę rozpoczęłam od otrzymania tetrapeptydowych pochodnych akrydyny. W tym celu peptydy Boc-Thr-Lys(Fmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> (**139**) oraz Boc-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> (**150**) poddałam deprotekcji osłony Boc (Schemat 21).



**Schemat 21.** Deprotekcja osłony Boc z odpowiednio chronionych tetrapeptydów.

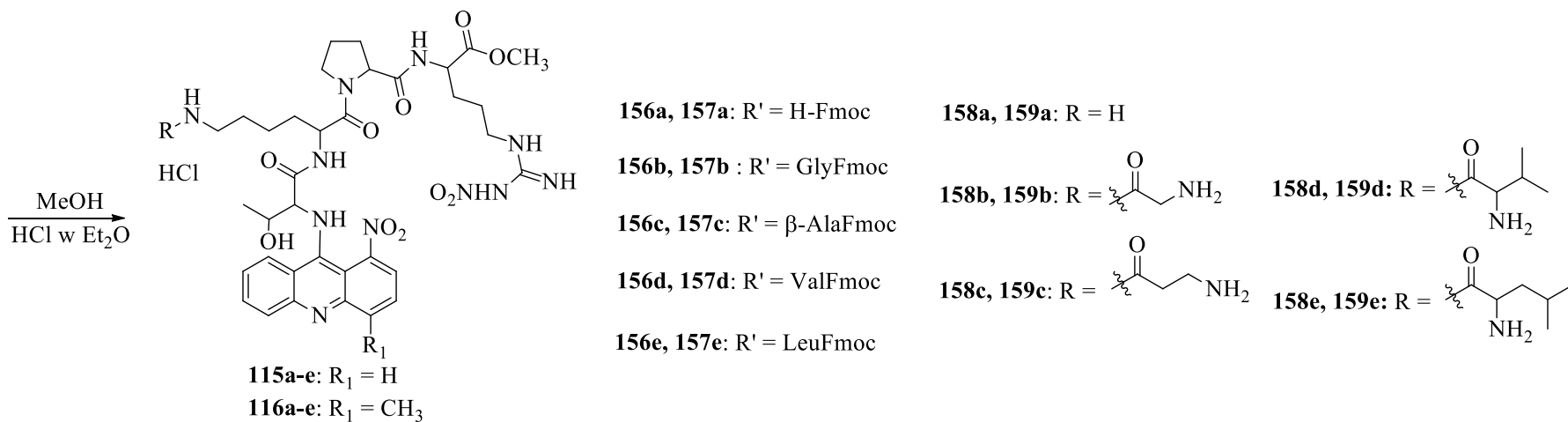
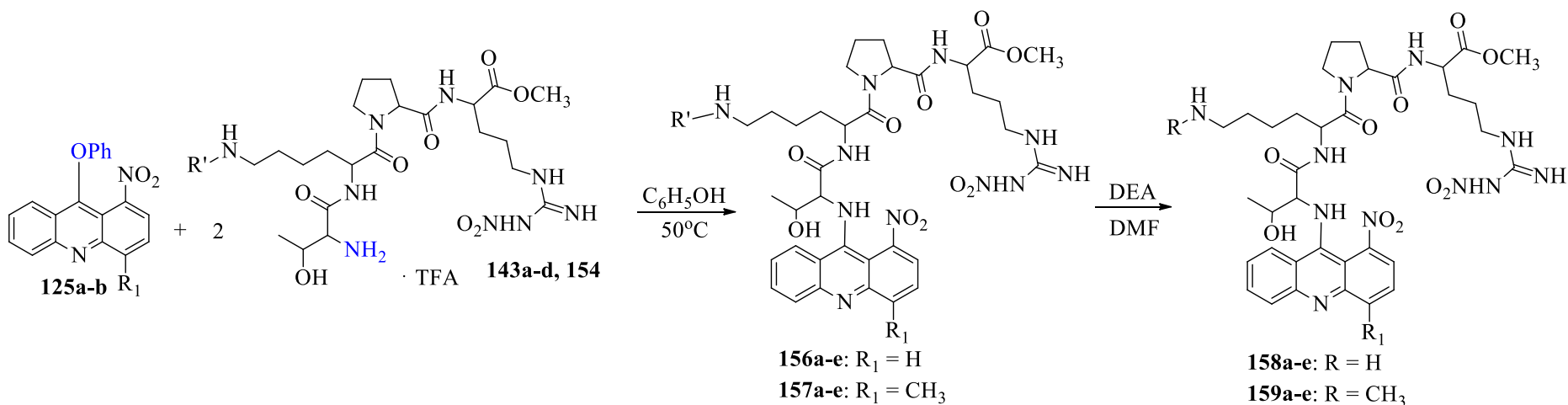
Następnie cząsteczki (**154**, **155**) wprowadziłam w pozycję C9 pochodnych akrydyny (**125a-b**) poprzez utworzenie wiązania węgiel-azot w reakcji substytucji nukleofilowej (Schemat 22, 23). Reakcje prowadziłam w fenolu w temp. 50°C. Temperatura reakcji uwarunkowana jest temp. topnienia fenolu. Najlepsze rezultaty uzyskałam stosując dwukrotny nadmiar tetrapeptydu w stosunku do pochodnej akrydyny (Tabela 1). Po zakończeniu syntezy, mieszaniny reakcyjne ochłodziłam i rozcieńczyłam octanem etylu. Następnie zneutralizowałam fenol za pomocą 5% roztworu KOH. Otrzymane warstwy rozdzieliłam, a fazy organiczne wysuszyłam bezw. MgSO<sub>4</sub>. Po oddestylowaniu rozpuszczalnika pod obniżonym ciśnieniem otrzymane produkty (**156a**, **157a**, **160**, **161**) oczyściłam preparatywnie na płytkach TLC. Następnie za pomocą DEA usunęłam osłonę Fmoc. W ostatnim etapie, w celu zwiększenia

rozpuszczalności oraz biodostępności pochodne (**158a**, **159a**, **162**, **163**) przeprowadziłam w odpowiednie chlorowodorki otrzymując zaprojektowane związki (**115a**, **116a**, **117**, **118**) (Schemat 22, 23). Analogi akrydyny (**115a**, **116a**, **117**, **118**) oczyściłam za pomocą preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej.

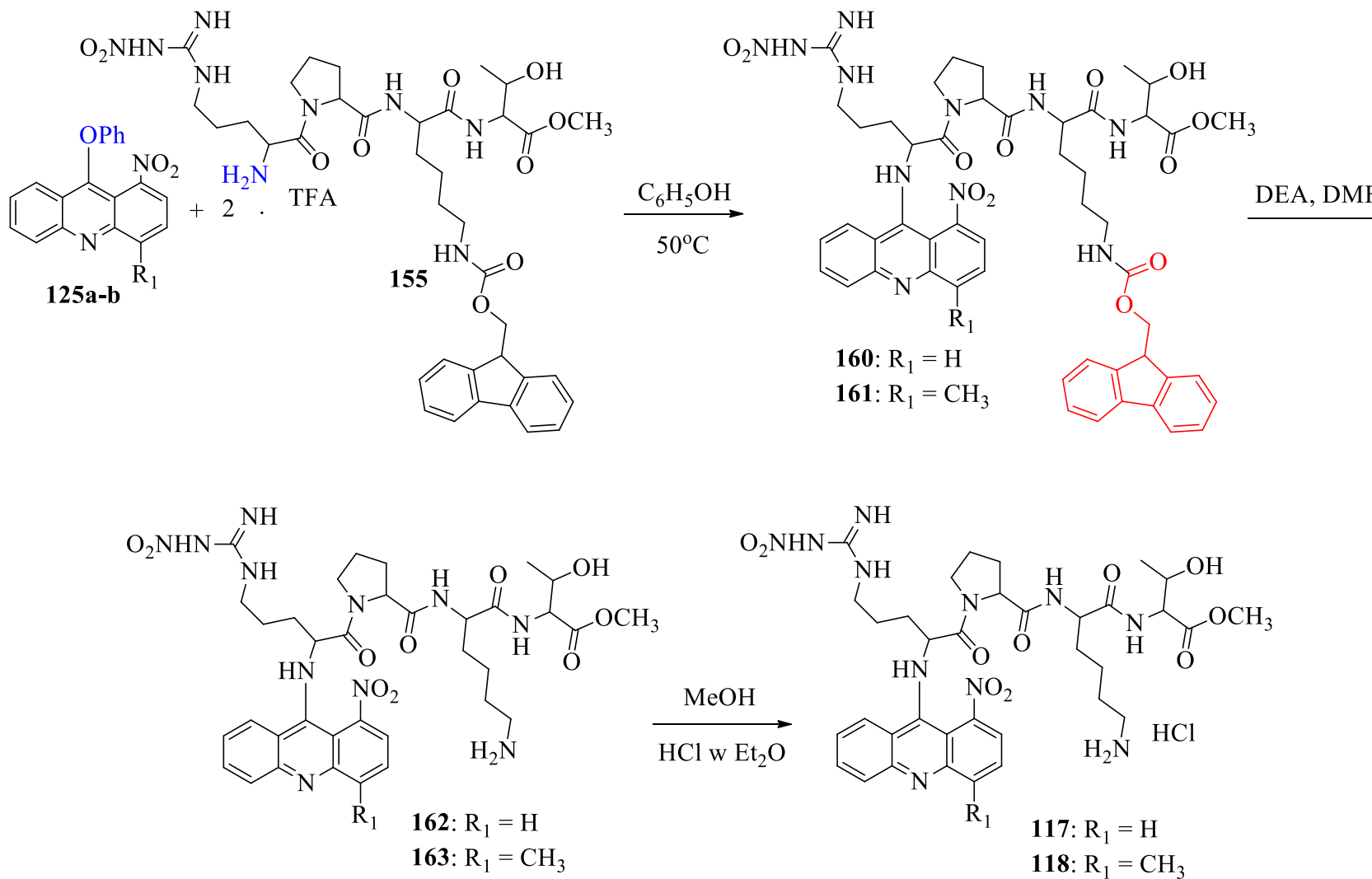
Kolejno analogicznie otrzymałam pentapeptydowe pochodne 1-nitroakrydyny (**115b-e**) oraz 4-metylo-1-nitroakrydyny (**116b-e**) (Schemat 22).

**Tabela 1.** Porównanie wydajności metod otrzymywania tetrapeptydowych pochodnych 1-nitroakrydyny (**156a**, **160**) i 4-metylo-1-nitroakrydyny (**157a**, **161**).

Nr związku	Stosunek molowy - tetrapeptyd : akrydyna	Rozpuszczalnik	Wydajność %
<b>156a</b>	1:1	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH	25
<b>156a</b>	2:1	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH	<b>54</b>
<b>156a</b>	1:1	DMF	<10
<b>156a</b>	2:1	DMF	<10
<b>160</b>	1:1	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH	21
<b>160</b>	2:1	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH	<b>48</b>
<b>157a</b>	1:1	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH	38
<b>157a</b>	2:1	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH	<b>69</b>
<b>161</b>	1:1	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH	37
<b>161</b>	2:1	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH	<b>63</b>



**Schemat 22.** Synteza pochodnych 1-nitro (**115a-e**)/4-metylo-nitroakrydyny (**116a-e**) z analogami tuftsyny.



**Schemat 23.** Synteza koniugatów 1-nitro (**117**)/4-metylo-1-nitroakrydyny (**118**) z pochodną retro-tuftsyny.



### 3.1.6. Synteza peptydowych pochodnych akrydonu (119a-e, 120a-e)

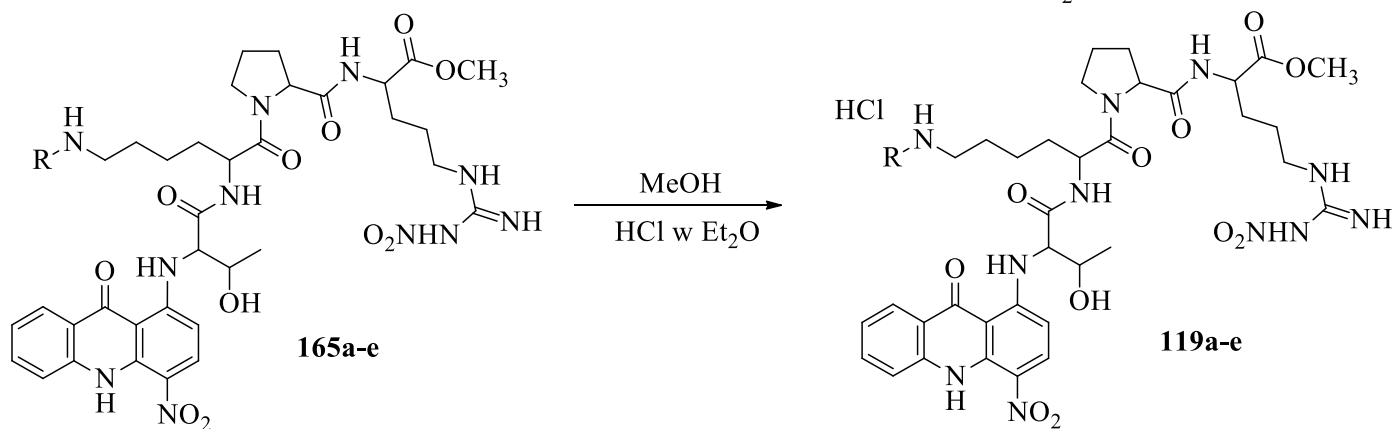
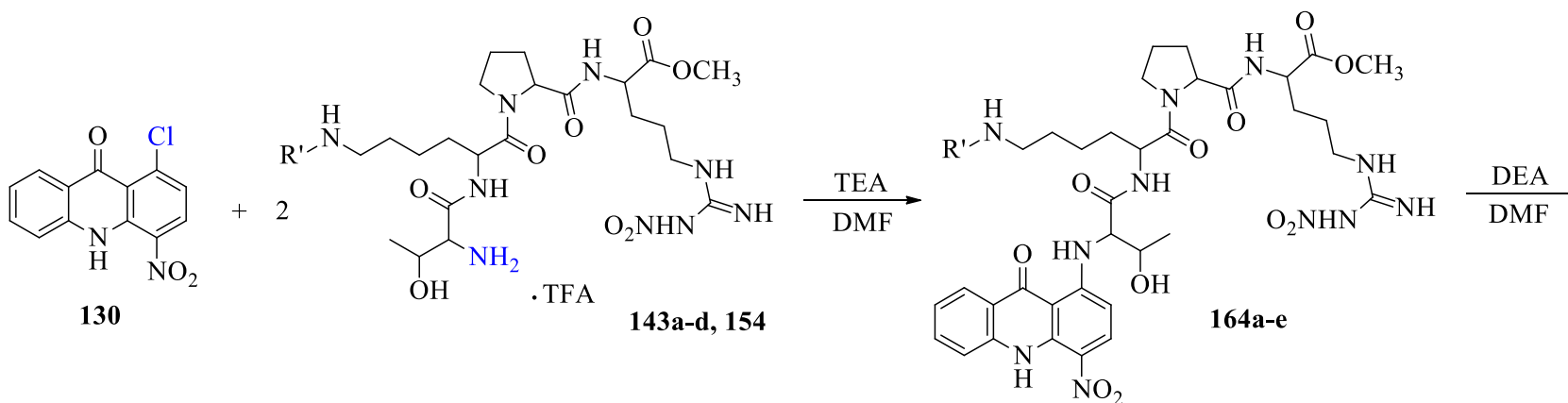
Peptydowe pochodne akrydonu (**119a-e**, **120a-e**) zsyntetyzowałam zgodnie z procedurą przedstawioną na Schematach 24 i 25.

Syntezę rozpoczęłam od otrzymania tetrapeptydowych pochodnych akrydonu (**119a**, **120a**). W wyniku reakcji 1-chloro-4-nitro-9(10*H*)-akrydonu (**130**) z TFAxThr-Lys(Fmoc)-Pro-Arg-OCH<sub>3</sub> (**154**) lub TFAxArg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> (**155**) w bezw. DMF, w obecności TEA otrzymałam pochodne (**164a**, **166a**). Najlepsze rezultaty uzyskałam stosując dwukrotny nadmiar tetrapeptydu w stosunku do pochodnej akrydonu (Tabela 2). Reakcję prowadziłam do dnia następnego. Po tym czasie DMF oddestylowałam pod zmniejszonym ciśnieniem, a produkty (**164a**, **166a**) oczyściłam za pomocą preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej. W kolejnym etapie za pomocą 30% roztworu DEA w DMF przeprowadziłam deprotekcję osłony Fmoc, a otrzymane związki (**165a**, **167a**) przeprowadziłam w odpowiednie chlorowodorki (**119a**, **120a**) (Schemat 24, 25). Pochodne (**119a**, **120a**) oczyściłam na płytkach TLC.

Następnie analogicznie otrzymałam pentapeptydowe analogi akrydonu (**119b-e**, **120b-e**) w wyniku reakcji 1-chloro-4-nitro-9(10*H*)-akrydonu (**130**) z odpowiednimi pochodnymi tuftsyny (**143a-d**) i retro-tuftsyny (**153a-d**) acylowanymi na grupie ε-aminowej lizyny aminokwasami: Gly, β-Ala, Val, Leu (Schemat 24, 25).

**Tabela 2.** Porównanie wydajności metod otrzymywania tetrapeptydowych pochodnych akrydonu (**164a**, **166a**).

Nr związku	Stosunek molowy - tetrapeptyd : akrydon	Wydajność %
<b>164a</b>	1:1	46
<b>164a</b>	2:1	<b>73</b>
<b>166a</b>	1:1	38
<b>166a</b>	2:1	<b>64</b>



**164a:** R' = H-Fmoc

**164b:** R' = GlyFmoc

**164c:** R' =  $\beta$ -AlaFmoc

**164d:** R' = ValFmoc

**164e:** R' = LeuFmoc

**165a:** R = H

**165b:** R = CC(=O)CN

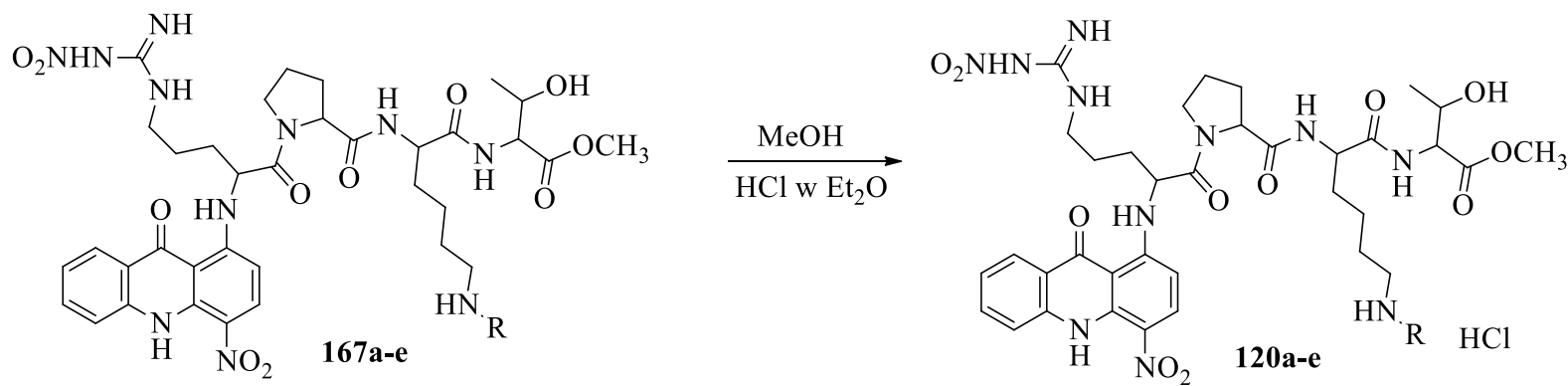
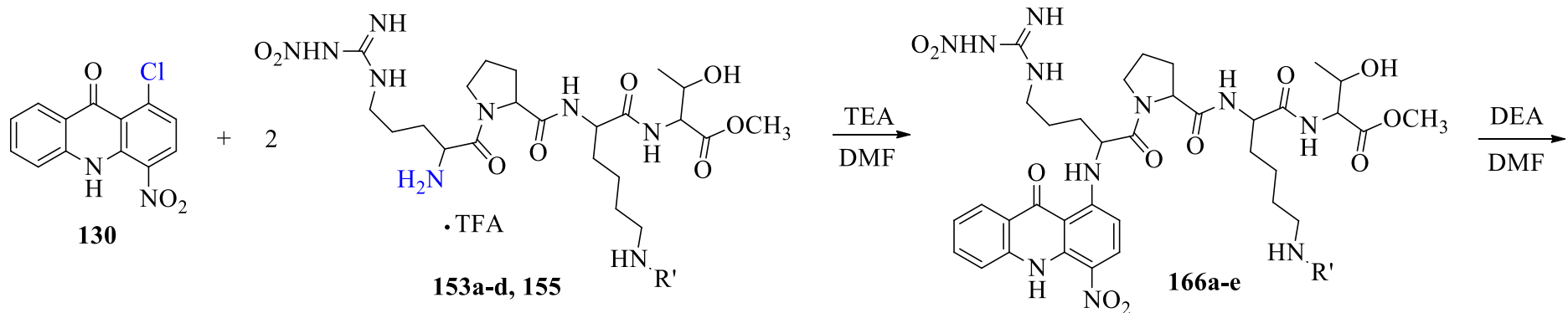
**165c:** R = CCCC(=O)N

**165d:** R = CC(C)C(=O)N

**165e:** R = CC(C)CC(=O)N

**Schemat 24.** Synteza koniugatów 4-nitro-9(10H)-akrydonu z pochodnymi tuftsyny (**119a-e**).





**166a:** R' = H-Fmoc

**166b:** R' = GlyFmoc

**166c:** R' =  $\beta$ -AlaFmoc

**166d:** R' = ValFmoc

**166e:** R' = LeuFmoc

**167a:** R = H

**167b:** R =  $\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$

**167c:** R =  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$

**167d:** R =  $\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{CH}(\text{CH}_3)\text{NH}_2$

**167e:** R =  $\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{NH}_2$

**Schemat 23.** Synteza peptydowych pochodnych akrydonu (**122a-e**, **123a-e**).



### 3.2. Badania biologiczne

W celu zbadania aktywności biologicznej potencjalnych związków przeciwnowotworowych w pierwszym etapie wykonuje się testy *in vitro* służące określeniu wpływu pochodnych na żywotność i proliferację komórek. Testy żywotności polegają na wykrywaniu integralności błony komórkowej i mierzeniu aktywności metabolicznej komórek [99]. Integralność błony komórkowej wykrywa się m.in. dzięki błękitowi trypanu, który barwi tylko martwe komórki lub barwnikom fluorescencyjnym, takim jak: EtBr i PI przechodzącymi przez uszkodzoną błonę i akumulującymi się jedynie w martwych komórkach w wyniku specyficznego wiązania się z DNA. Utrata integralności błony prowadzi również do wycieku enzymu dehydrogenazy mleczanowej, co można zmierzyć spektrofotometrycznie. W metodach kolorymetrycznych, które służą do pomiaru aktywności metabolicznej, najczęściej stosowanymi odczynnikami są MTT i XTT. Odczynniki te pod wpływem enzymów mitochondrialnych ulegają redukcji do barwnych formazanów [100,101]

W ramach niniejszej pracy doktorskiej:

- oszacowano cytotoksyczność zsyntetyzowanych analogów (**115a-e**, **116a-e**, **117**, **118**, **119a-e**, **120a-e**) wobec amelanotycznych Ab i melanotycznych Ma komórek czerniaka i dwóm postaciom neuroblastomy SH-SY5Y: cholinergicznej DC i dopaminergicznej NC za pomocą testu XTT;
- dla pochodnej (**117**) zbadano zmiany apoptotyczne jako aktywację kaspaz i eksternalizację fosfatydyloseryny w błonie komórkowej, a także uszkodzone komórki w fazie sub-G1 w ww. komórkach nowotworowych;
- oraz dla otrzymanych związków (**115a-e**, **116a-e**, **117**, **118**, **119a-e**, **120a-e**) samodzielnie przeprowadziłam test cytotoksyczności MTT na limfoidalnej linii komórkowej Jurkat oraz PBMC.

Wszystkie testy przeprowadzono w trzykrotnych powtórzeniach. W przypadku komórek czerniaka i neuroblastomy zastosowano analogi w stężeniach 0,1-150  $\mu\text{M}$ . Roztwory stosowane w eksperymentach przygotowano z odpowiednim podłożem do hodowli komórkowej, a podstawowy roztwór rozpuszczono w wodzie zawierającej 5% DMSO (Sigma-Aldrich). Natomiast w przypadku komórek Jurkat i PBMC testowałam pochodne w stężeniach 0,1-250  $\mu\text{M}$ . W tym celu związki rozpuszczałam w 10  $\mu\text{L}$  DMSO, następnie uzupełniałam odpowiednią ilością pożywki otrzymując podstawowy roztwór.

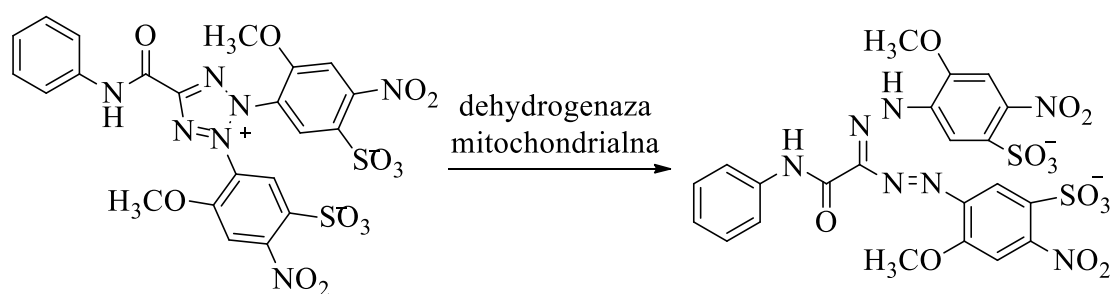
### 3.2.1. Analiza przeżywalności komórek czerniaka i neuroblastomy metodą XTT

Zarówno czerniak, jak i neuroblastoma nie są jednorodnymi typami nowotworów, ponieważ posiadają różne warianty biologiczne. Skuteczność potencjalnego chemioterapeutyku ocenionego wobec jednej formy nowotworów nie zawsze powoduje takie same skutki w przypadku innych odmian choroby. W dzisiejszych czasach onkologia poszukuje indywidualnych terapii przeciwko określonym typom nowotworu. Czerniak i neuroblastoma rozwijają się z prawidłowych komórek (melanocytów, neuronów) o tym samym pochodzeniu zarodkowym - neuroektoderma. SH-SY5Y to linia neuroblastopodobna o fenotypie dopaminergicznym (wariant NC: SH-SY5Y-NC, głównie wykorzystuje dopaminę neuroprzekaźnikową), ale może być różnicowana do fenotypu cholinergicznego *in vitro* (wariant DC: SH-SY5Y-DC, głównie wykorzystuje neuroprzekaźnik acetylocholino). Model czerniaka chomika Bomirskiego posiada dwie podstawowe formy: melanotyczną Ma (produkuje melaninę) i amelanotyczną Ab (brak produkcji melaniny) [102].

Cytotoksyczność zsyntetyzowanych analogów oszacowano za pomocą testu XTT. Jako standardowe leki odniesienia zastosowano: dla czerniaka - dakarbazynę i neuroblastomy - cisplatynę.

Test XTT umożliwia wyselekcjonowanie związku o najniższym stopniu toksyczności w stosunku do badanych komórek. W teście tym wyznaczana jest wartość  $IC_{50}$  (stężenie związku, przy którym proliferacja komórek zostaje zahamowana w 50% w stosunku do komórek kontrolnych), która umożliwia określenie potencjalnej dawki jaką można byłoby zastosować, jeśli związek zostałby użyty w celach terapeutycznych.

Zastosowany test badania cytotoksyczności polega na spektrofotometrycznym odczycie barwnej reakcji redukcji soli tetrazolowych XTT w formazan (rozpuszczalny w wodzie) w wyniku działania komórkowej dehydrogenazy mitochondrialnej (Schemat 26) [103].



**Schemat 26.** Redukcja soli tetrazolowej (XTT) przez dehydrogenazę mitochondrialną do formazanu.

### 3.2.1.1. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej metodą XTT nowych pochodnych akrydyny/akrydonu wobec amelanotycznych Ab i melanotycznych Ma komórek czerniaka i dwóm postaciom neuroblastomy SHSY5Y: cholinergicznej DC i dopaminergicznej NC

Jak pokazano w Tabeli 3 tylko pochodne (**117**) i (**118**) zmniejszyły żywotność komórek nowotworowych w stężeniach, które pozwoliły na oszacowanie wartości  $IC_{50}$ , po 72 godz. inkubacji komórek z związkami. W przypadku pozostałych koniugatów obliczono % przeżywalności w najwyższym badanym stężeniu (150  $\mu$ M). Analog (**115b**) wydawał się wpływać na linię czerniaka Ab, z kolei pochodna (**119b**) na SH-SY5Y-DC, ale tylko przy najwyższej dawce - 50% komórek hamowało aktywność mitochondrialną. Dla pochodnej (**117**) wartości  $IC_{50}$  były równe 61  $\mu$ M, 96  $\mu$ M i 48  $\mu$ M wobec czerniaka Ab, neuroblastomy SH-SY5Y-NC i SH-SY5Y-DC, odpowiednio. Z kolei analog (**118**) posiadający pierścień akrydyny dodatkowo podstawiony grupą  $-CH_3$  w pozycji C4, wykazywał skuteczność cytotoksyczną wobec czerniaka Ab i neuroblastomy SH-SY5Y-DC z  $IC_{50} = 88$  i 116  $\mu$ M, odpowiednio. W przypadku komórek czerniaka Ma inkubowanych z najwyższą dawką analogu (**117**) około 60% komórek nadal żyło (aktywność mitochondrialna nie była hamowana). Warto podkreślić, że dawka  $IC_{50}$  dakarbazyny wobec amelanotycznych komórek linii czerniaka Ab (69  $\mu$ M) była podobna do analogu (**117**) (61  $\mu$ M) i nieznacznie wyższa w porównaniu z pochodną (**118**) (88  $\mu$ M). Pod wpływem najwyższej (150  $\mu$ M) dawki dakarbazyny tylko około 30% komórek linii czerniaka Ma wykazywało hamowanie aktywności mitochondrialnej, podczas gdy związek (**117**) hamował około 40% tych komórek. Cisplatyna jako lek przeciwnowotworowy wykazał skuteczne działanie wobec cholinergicznych komórek neuroblastomy SH-SY5Y-DC, a po 48 godz. wartość  $IC_{50}$  wynosiła około 2  $\mu$ M, podczas gdy dla analogu (**117**) po 72 godz.  $IC_{50}$  było równe 48  $\mu$ M. Z kolei w przypadku dopaminergicznych komórek neuroblastomy  $IC_{50} = 2,5$   $\mu$ M dla cisplatyny po 72 godz. Tak więc, analog (**117**) hamował amelaniczną postać czerniaka, porównywalnie do działania dakarbazyny. **117** również wykazywał cytotoksyczność wobec wariantów dopaminergicznych i cholinergicznych neuroblastomy, z wyższą czułością ostatniego. Aktywność pochodnej (**117**) przeciwko neuroblastomy była niższa niż cisplatyny, ale odnosząc się do poważnych skutków ubocznych tego chemioterapeutyka mogła to być obiecująca cecha biologiczna. Zatem, związek (**117**) został wybrany do dalszych badań nad apoptozą komórek.

**Tabela 3.** Wpływ analogów na żywotność komórek czerniaka i neuroblastomy za pomocą testu XTT po 72 godz. inkubacji. Wartości są średnimi  $\pm$  odchylenie standardowe z co najmniej 3 doświadczeń.

Związek	Czerniak			Neuroblastoma			
	linia Ma	linia Ab		SH-SY5Y-NC		SH-SY5Y-DC	
	żywotność [%]	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]	żywotność [%]	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]	żywotność [%]	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]	żywotność [%]
<b>115a</b>	94		>100		70		64
<b>115b</b>	>100		<b>50</b>		96		88
<b>115c</b>	>100		91		98		77
<b>115d</b>	>100		>100		>100		>100
<b>115e</b>	>100		>100		>100		>100
<b>116a</b>	58		55		64		54
<b>116b</b>	75		65		55		79
<b>116c</b>	71		66		54		76
<b>116d</b>	>100		>100		>100		>100
<b>116e</b>	>100		>100		>100		>100
<b>117</b>	57	<b>61<math>\pm</math>41,1</b>		<b>95,5<math>\pm</math>5,8</b>		<b>48,3<math>\pm</math>6,8</b>	
<b>118</b>	65	<b>87,5<math>\pm</math>25</b>			83	<b>116<math>\pm</math>15,7</b>	
<b>119a</b>	91		88		>100		>100
<b>119b</b>	77		60		72		<b>49</b>
<b>119c</b>	76		78		>100		>100
<b>119d</b>	85		92		>100		>100
<b>119e</b>	>100		>100		>100		>100
<b>120a</b>	73		97		>100		>100
<b>120b</b>	>100		>100		>100		>100
<b>120c</b>	>100		>100		>100		>100
<b>120d</b>	>100		>100		>100		>100
<b>120e</b>	>100		>100		>100		>100
<b>Dakarbazyne</b>	69	<b>47,5<math>\pm</math>9,7</b>					
<b>Cisplatyna</b>				<b>2,5<math>\pm</math>0,6</b>		<b>1,8<math>\pm</math>0,9*</b>	

\* IC<sub>50</sub> wyznaczone po 48 godz. inkubacji

### 3.2.2. Apoptoza

Apoptoza to programowana śmierć komórek. Jest ona najbardziej powszechną formą śmierci komórek podczas rozwoju i dojrzewania wielokomórkowych organizmów, a także w procesach ich prawidłowego funkcjonowania. Rozróżnienie apoptozy od nekrotycznej śmierci komórek przeprowadza się na podstawie specyficznych zmian morfologicznych i biochemicznych tj. zmiany objętości komórek oraz integralności błony plazmatycznej,

asymetrii lipidów, powstawania ciałek apoptotycznych, zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia, fragmentacji DNA i degradacji białek komórkowych [104].

**Tabela 4.** Procent komórek czerniaka Ma i Ab oraz neuroblastomy NC i DC wykazujących cechy apoptozy takie jak: aktywacja kaspaz, eksternalizacja fosfatydyloseryny (suma komórek wczesno An+PI- i późnoapoptycznych An+PI+) oraz obniżona zawartość DNA (sub G0) po inkubacji bez (kontrola) i ze związkiem (+117). Wartości są średnimi ± odchylenie standardowe z co najmniej 3 doświadczeń.

Linia komórkowa	Czas inkubacji [h]	Procent komórek z/w					
		Aktywacja kaspaz		Eksternalizacja fosfatydyloseryny		Sub-G1	
		Kontrola	+ 117	Kontrola	+ 117	Kontrola	+ 117
<b>Czerniak Ma</b>	48	9,8±8,8	9,8±2,4	28,8±8,8	32,7±8,9	16,0±7,7	14,9±13,3
<b>Czerniak Ab</b>	48	9,9±5,6	<b>31,5±7,1</b>	24,7±11,6	<b>54,2±9,6</b>	16,5±7,1	<b>41,3±8,8</b>
<b>SH-SY5Y-NC</b>	72	7,1±2,6	<b>16,2±8,4</b>	7,8±4,6	<b>13,3±3,8</b>	0,8±0,1	1,6±0,5
<b>SH-SY5Y-DC</b>	72	8,8±2,1	<b>27,2±2,7</b>	7,4±2,3	<b>14,5±5,4</b>	1,2±0,5	1,4±0,5

### 3.2.2.1. Eksternalizacja fosfatydyloseryny

Podczas apoptotycznej śmierci komórek błona plazmatyczna zachowuje integralność, pomimo zachodzących w niej zmian, obejmujących zarówno właściwości strukturalne jak i funkcjonalne. Podczas procesu apoptozy w błonie plazmatycznej obserwowana jest eksternalizacja fosfatydyloseryny (PS). Translokacja PS z wewnętrznej warstwy fosfolipidów do zewnętrznej spowodowana jest wzrostem aktywności skramblazy aktywowanej przez jony  $Ca^{2+}$ , a także spadkiem aktywności translokazy aminofosfolipidów [104].

Związek (117) indukuje zmiany w strukturze błony plazmatycznej czerniaka Ab jako eksternalizację fosfatydyloseryny (komórki An+). Po 48 godz. 54% komórek czerniaka Ab było An+, znacznie więcej niż w kontrolnych komórkach inkubowanych bez (117) (Tabela 4). Po 72 godz. inkubacji z (117) aż 14% komórek obu linii neuroblastomy wykazywało zmiany w strukturze błony komórkowej An+, dwa razy więcej niż w komórkach inkubowanych bez (117) (Tabela 4).

### 3.2.2.2. Aktywacja kaspaz

Kaspazy są głównymi enzymami biorącymi udział w procesie apoptozy. Są to specyficzne dla kwasu asparaginowego proteazy cysteinowe powstające z nieaktywnych prokaspaz. Do ich aktywacji dochodzi na drodze hydrolizy wiązania peptydowego w miejscu kwasu asparaginowego, co powoduje uruchomieniem proteolitycznej kaskady kaspaz [105].

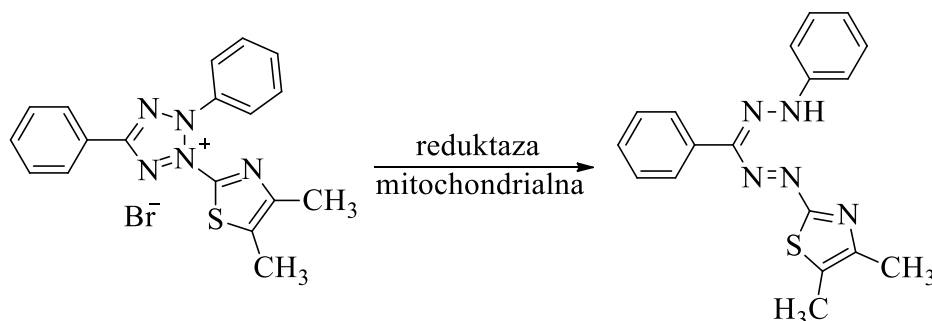
Analog (**117**) znacznie zwiększył zawartość komórek z aktywowanymi kaspazami (C+), szczególnie w komórkach czerniaka Ab i neuroblastomy SH-SY5Y-DC. Po 48 godz. około 32% komórek czerniaka Ab stanowiły komórki C+. W przypadku czerniaka Ma zaobserwowano jedynie około 10% komórek z aktywowanymi kaspazami, podobnie jak w grupie kontrolnej bez (**117**) (Tabela 4). Z kolei po 72 godz. inkubacji komórek SH-SY5Y-DC i SH-SY5Y-NC ze związkem (**117**) odnotowano około 27% i 16% komórek C+, odpowiednio (Tabela 4). Odsetek komórek z aktywowanymi kaspazami (C+) w przypadku SH-SY5Y-NC podwoił się, podczas gdy w SH-SY5Y-DC potroił się w porównaniu do kontroli (Tabela 4). Podobny poziom komórek C+ czerniaka Ab w porównaniu do SH-SY5Y-DC został osiągnięty po krótszym czasie (48 godz.) (Tabela 4). Obserwacja ta wykazała, że apoptoza indukowana analogiem (**117**) w neuroblastomie zachodzi wolniej niż w komórkach czerniaka Ab.

### 3.2.2.3. Uszkodzone komórki w obszarze sub-G1

Zawartość komórek w fazie sub-G1 ilustruje skuteczność działania związku (**117**) wobec badanych linii komórkowych (Tabela 4), gdyż w tym obszarze znajdują się komórki z obniżoną zawartością DNA/uszkodzone np. ciała apoptyczne. Ponad 40% komórek czerniaka Ab i tylko 15% czerniaka Ma inkubowanych z analogiem (**117**) przez 48 godz. znajdowało się w obszarze sub-G1. W przypadku czerniaka Ab związek (**117**) powodował śmierć komórek drogą apoptozy (aktywacja kaspaz, eksternalizacja PS), co skutkowało wzrostem odsetka komórek uszkodzonych w sub-G1. Pochodna (**117**) nie zwiększa istotnie poziomu komórek neuroblastomy w obszarze sub-G1, mimo iż obserwowano inne cechy apoptozy (eksternalizacja fosfatydyloseryny, aktywacja kaspaz). Zatem wydaje się, że komórki neuroblastomy potrzebują więcej niż 72 godz. do zajścia ostatecznego efektu śmierci tj. fragmentacji na ciała apoptyczne, co świadczy o innej, w porównaniu do czerniaka, dynamice procesów apoptozy indukowanych analogiem (**117**).

### 3.2.3. Analiza przeżywalności komórek Jurkat i PBMC metodą MTT

W celu wyznaczenia cytotoksyczności nowych peptydowych analogów akrydyny/akrydonu wobec komórek Jurkat i PBMC osobiście przeprowadziłam test MTT. Podobnie jak w przypadku metody XTT, jest to test kolorymetryczny umożliwiający wyznaczenie wartości  $IC_{50}$  badanych związków. Opiera się on na reakcji redukcji bromku tetrazoliowego (MTT) do fioletowego formazanu w wyniku działania dehydrogenazy bursztynianowej (Schemat 27) występującej jedynie w żywych komórkach [106]. Formazan wytrąca się w podłożu jako szarofioletowe kryształki, które rozpuszczane są za pomocą izopropanolu. Intensywność zabarwienia mierzona spektrofotometrycznie jest miarą żywotności komórek.



**Schemat 27.** Redukcja bromu tetrazoliowego (MTT) przez dehydrogenazę bursztynianową.

#### 3.2.3.1. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej metodą MTT nowych pochodnych akrydyny/akrydonu wobec komórek Jurkat oraz aktywowanych limfocytów

Linie komórkową Jurkat inkubowałam na 96-dołkowych płytkach (w temp. 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) z otrzymanymi przeze mnie związkami w dziewięciu różnych stężeniach (250; 150; 100; 50; 40; 20; 10; 1; 0,1 μM) przez 48 godz. Następnie dodawałam roztwór MTT i kontynuowałam inkubację przez 4 godz. W przypadku ludzkich limfocytów inkubację prowadziłam przez 72 godz. i po tym czasie dodawałam odczynnik MTT (prowadząc dalej inkubację przez 4 godz.). Dodatkowo proliferacja PBMC stymulowana była przeciwciałami anti-CD3/anti-CD28. Wytrącone kryształy formazanu rozpuszczałam 0,4 N HCl w izopropanolu i dokonywałam pomiaru absorbancji przy długości fali 570 nm. Na podstawie uzyskanych wyników wyznaczałam wartości  $IC_{50}$  badanych związków. Na Wykresie 1 przedstawiłam uzyskane przykładowe krzywe zależności absorbancji od stężenia badanych związków (**116a-b**, **118**) (dla komórek Jurkat). Wykresy 2 (**118** wobec Jurkat) i 3 (**117**, **118** wobec PBMC) przedstawiają % zahamowania wzrostu komórek pod wpływem testowanych związków w porównaniu do wzorca (etopozyd). Z kolei na Wykresie 4 zaprezentowałam

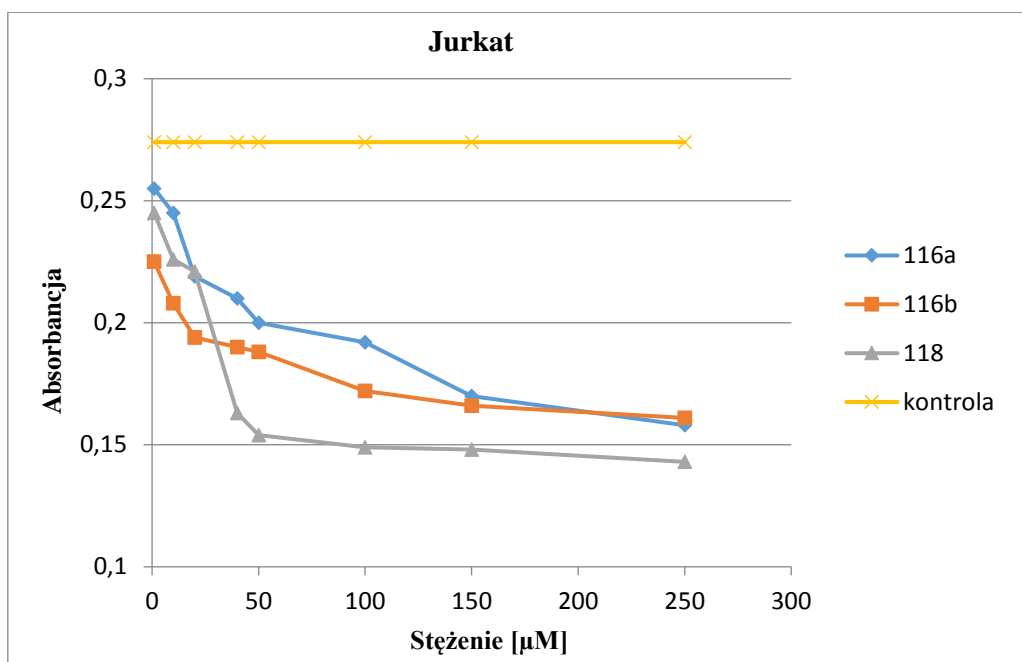
% zahamowania wzrostu komórek dla najbardziej aktywnego związku (**118**), odniesionych do komórek kontrolnych. Tabela 5 zawiera wartości  $IC_{50}$  uzyskane na podstawie krzywych zależności absorbancji od stężenia badanego związku. Wartości cytotoksyczności wyrażałam jako  $IC_{50}$ , co odpowiada zmniejszeniu żywotności komórek o 50% w stosunku do kontroli. W przypadku niektórych związków nie udało się uzyskać zmniejszenia żywotności do 50% , stąd w takich przypadkach w Tabeli 5 wstawiono wartość procentową najniższej uzyskanej żywotności (uzyskiwanej zwykle przy najwyższym stosowanym stężeniu badanego związku).



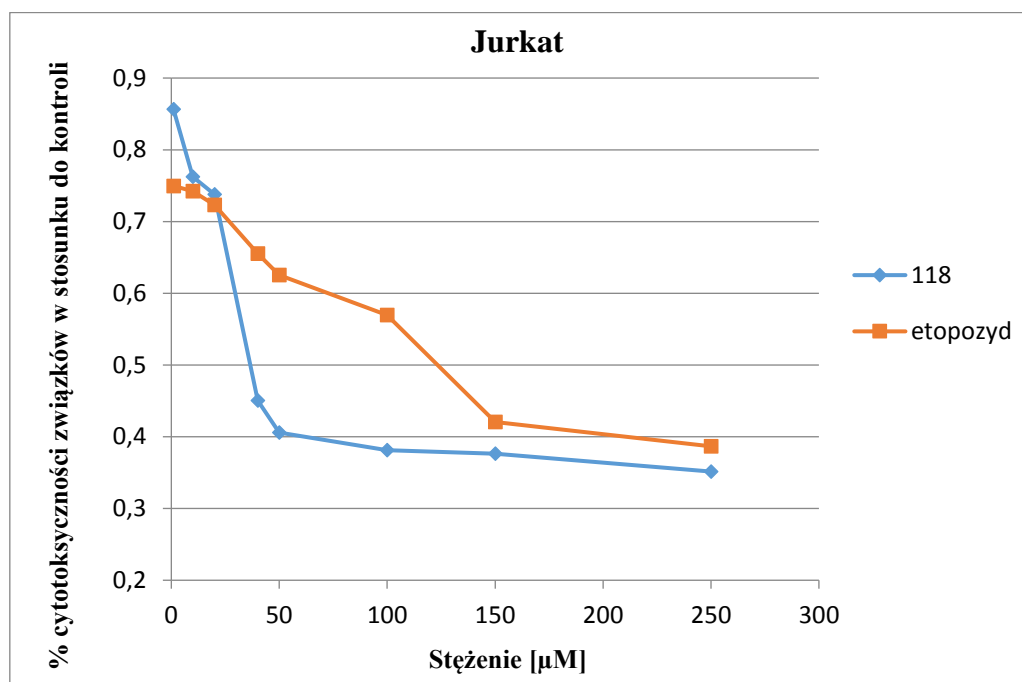
**Tabela 5.** Wartości IC<sub>50</sub> obliczone na podstawie testu MTT dla związków (**115a-e, 116a-e, 117, 118, 119a-e, 120a-e**) (μM; mediana±SD);  
<sup>1</sup> - związek najbardziej aktywny w serii; <sup>2</sup> - najniższa uzyskana żywotność dla związków, w przypadku których nie udało się wyznaczyć IC<sub>50</sub>.

Związek Nr	Jurkat				PBMC			
	IC <sub>50</sub> [μM]	żywotność [%] <sup>2</sup>	p	F	IC <sub>50</sub> [μM]	żywotność [%] <sup>2</sup>	p	F
<b>115a</b>		70				82		
<b>115b</b>	127,26±0,004		<0,05	98173		85		
<b>115c</b>	140,57±0,007		<0,05	134644		86		
<b>115d</b>		76				71		
<b>115e</b>		>100				>100		
<b>117</b>	124,72±0,125		<0,05	1,0176E+09	147,62±0,020		<0,05	11500
<b>116a</b>	111,00±0,0332		<0,05	63274		83		
<b>116b</b>	91,62±0,031		<0,05	86473		76		
<b>116c</b>		74				71		
<b>116d</b>		>100				>100		
<b>116e</b>		>100				>100		
<b>118</b>	<b>28,31±0,007<sup>1</sup></b>		<0,05	930	<b>107,35±0,022<sup>1</sup></b>		<0,05	1977454
<b>119a</b>		84				72		
<b>119b</b>		58				95		
<b>119c</b>		89				87		
<b>119d</b>		71				>100		
<b>119e</b>		70				>100		
<b>120a</b>		88				96		
<b>120b</b>		92				91		
<b>120c</b>		72				92		
<b>120d</b>		>100				97		
<b>120e</b>		>100				93		
<b>Etopozyd</b>	115,31±0,004				9,07±0,045			

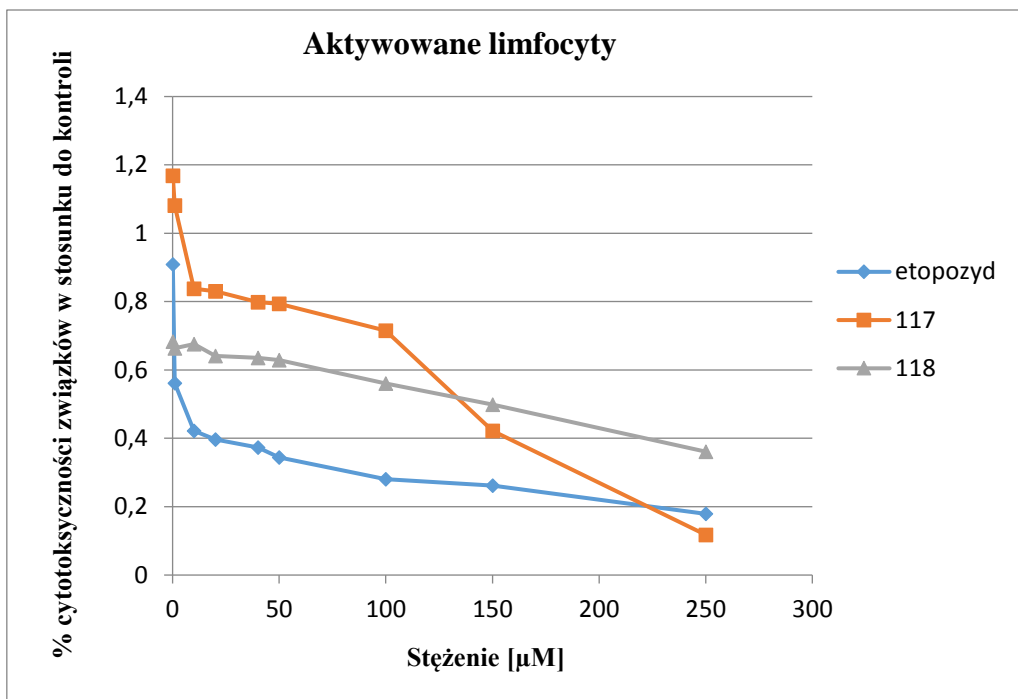
p – istotność statystyczna różnicy, F – test Fishera dla porównania związek: etopozyd



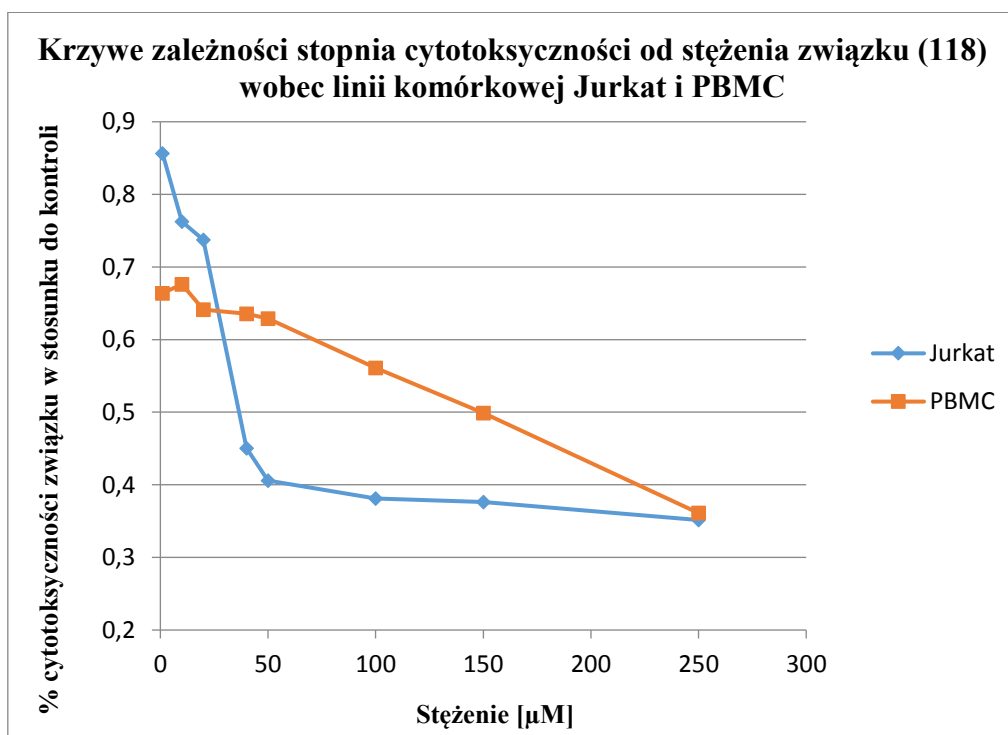
Wykres 1. Krzywe zależności cytotoksyczności od stężenia związków (**116a-b, 118**) wobec komórek Jurkat w teście MTT (wykres przykładowy).



Wykres 2. Krzywe zależności cytotoksyczności od stężenia związków (**118, etopozyd**) wobec linii komórkowej Jurkat.



Wykres 3. Krzywe zależności cytotoksyczności od stężenia związków (117, 118, etopozyd) wobec aktywowanych limfocytów.



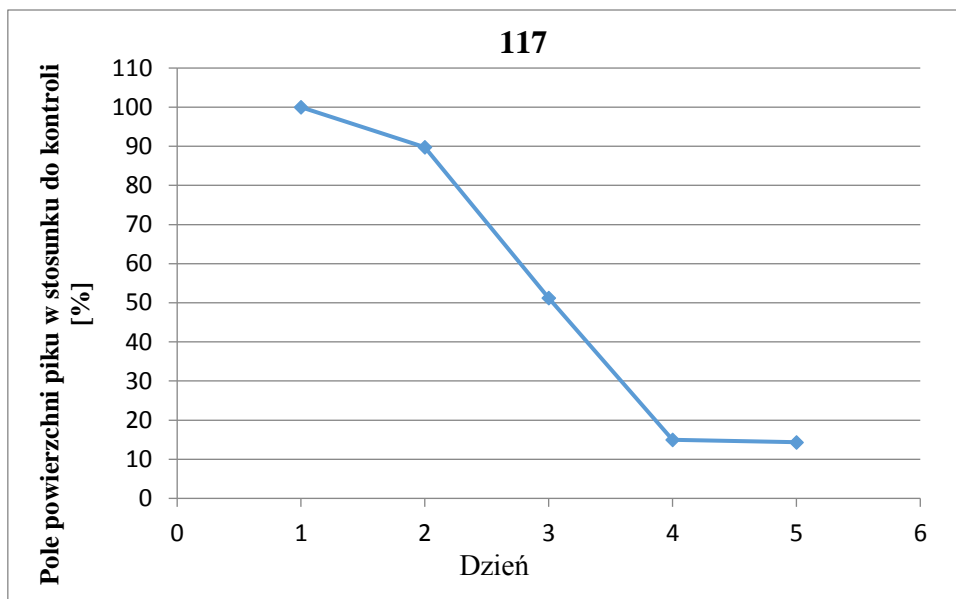
Wykres 4. Krzywe zależności cytotoksyczności od stężenia związku (118) wobec różnych linii komórkowej Jurkat i aktywowanych limfocytów.

Wyniki zaprezentowane w Tabeli 5 wskazują, że pochodne 4-metylo-1-nitroakrydyny były bardziej aktywne w porównaniu do analogów 1-nitroakrydyny. Z kolei koniugaty arydonu nie wykazywały żadnej cytotoxycznosci. W przypadku związków, dla których nie było możliwe wyznaczenie wartosci IC<sub>50</sub> obliczyłam przeżywalność w najwyższym badanym stężeniu (250 μM) (Tabela 5). Związek (**118**) okazał się najbardziej aktywny zarówno wobec komórek Jurkat, jak i PBMC, gdzie IC<sub>50</sub> = 28,31 i 107,35 μM, odpowiednio. W przypadku linii Jurkat pochodna (**118**) wykazała czterokrotnie wyższą cytotoxycznosc w porównaniu do związku odniesienie, ale jednocześnie około 12 razy mniejszą toksycznosc w stosunku do aktywowanych komórek PBMC. Związki (**115b**, **115c**, **116a** i **116b**) przejawiały inhibicję wobec komórek Jurkat (IC<sub>50</sub> = 91,62 - 140,57 μM), równocześnie nie posiadając aktywnosci wobec ludzkich limfocytów. Można zauważyć, że im dłuższy łańcuch peptydowy pochodnych, tym posiadały one mniejszą toksycznosc. Ponadto, zarówno koniugaty 4-metylo-1-nitroakrydyny i 1-nitroakrydyny z retro-tuftsyną (**117**, **118**) charakteryzowały się wyższą cytotoxycznoscia w porównaniu do pochodnych akrydyn połączonych z tuftsyną (**115a**, **116a**). Dodatkowo wykonałam test MTT dla użytej ilości do rozpuszczenia związków DMSO. Uzyskane wyniki pokazały, że zastosowane stężenie DMSO nie wpływało na żywotność komórek (danych nie umieszczono w pracy).

#### **3.2.4. Oznaczenie szybkości zużywania związków przez komórki Jurkat na przykładzie związku (**117**) z wykorzystaniem chromatografii HPLC**

W celu określenia szybkości zużywania związków przez komórki Jurkat w trakcie hodowli wykonałam test HPLC. Komórki inkubowałam przez 5 dni z dodatkiem badanego związku (**117**) o stężeniu IC<sub>50</sub> wyznaczonym podczas wcześniejszych testów. Następnie każdego dnia pobierałam próbkę do testu HPLC. Do odpowiedniego dołka dodawałam wody. Tak przygotowany roztwór pobierałam do próbki i odwirowywałam. Następnie zbierałam nadsącz i przechowywałam w zamrażalniku do zakończenia testu.

Jako wynik otrzymałam pola powierzchni badanego piku. Pole piku otrzymanego pierwszego dnia oznaczałam jako 100% związku.



**Wykres 5.** Zawartość związku (**117**) w czasie 5-cio dniowej inkubacji.

Jak można zauważyć na Wykresie 5 już trzeciego dnia w dołku znajdowało się jedynie ok. 50% związku. W związku z powyższym w trakcie inkubacji komórek przez okres dłuższy niż 4 dni należy dodać ponownie związku podczas pasażowania hodowli.

## 4. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

### 4.1. Materiały i metody stosowane podczas syntezy

#### A. Cienkwarstwowa chromatografia cieczowa (TLC)

Przebieg wszystkich reakcji kontrolowałam za pomocą chromatografii cienkwarstwowej, do której używałam płytek aluminiowych pokrytych żelem krzemionkowym Silica gel 60 F<sub>254</sub> firmy Sigma-Aldrich.

**Układ A** – chloroform : metanol (9:1 v/v)

**Układ B** – chloroform : metanol : amoniak (5:1:0,01 v/v/v)

**Układ C** – chloroform : metanol : amoniak (7:1:0,01 v/v/v)

#### B. Cieczowa chromatografia kolumnowa (LC)

Do chromatografii kolumnowej stosowałam żel krzemionkowy Silica gel 60 firmy Sigma-Aldrich o średnicy ziaren 70-230 mesh.

**Układ D** – chloroform : metanol (30:1 v/v)

**Układ E** – chloroform : metanol (20:1 v/v)

#### C. Preparatywna chromatografia cienkwarstwowa (PTLC)

Wszystkie otrzymane pochodne tuftsyny/retro-tuftsyny oraz peptydowe analogi akrydyny/akrydonu oczyszczałam za pomocą preparatywnej chromatografii cienkwarstwowej, używając do tego celu płytek aluminiowych pokrytych żelem krzemionkowym Silica gel 60 F<sub>254</sub> firmy Sigma-Aldrich.

**Układ A** – chloroform : metanol (9:1 v/v)

**Układ B** – chloroform : metanol : amoniak (5:1:0,01 v/v/v)

**Układ C** – chloroform : metanol : amoniak (7:1:0,01 v/v/v)

**Układ E** – chloroform: metanol (20:1 v/v)

#### D. Temperatura topnienia (T.t.)

Temperatury topnienia mierzyłam na aparacie Melting Point SMP30 i nie były one korygowane.

#### E. Spektrometria mas (MS)

Analizę MS przeprowadzono na aparacie BIFLEX III Bruker, z zastosowaniem CCA lub DHB jako matrycy w Katedrze Chemii Analitycznej Politechniki Gdańskiej.

#### F. Spektroskopia NMR

Widma  $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR zostały wykonane za pomocą aparatu Varian Unity Plus 500 MHz w Gdańskim Międzyuczelnianym Laboratorium NMR lub Bruker Avance III HD 400 MHz w Katedrze Chemii Nieorganicznej Politechniki Gdańskiej w  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$  lub DMSO.

Widmo DQF-COSY zarejestrowano na matrycy 4096 x 600 i przetworzono na matrycy 4K x 1K.

Widmo HMBC uzyskano w trybie wartości bezwzględnej. Okna spektralne dla osi  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  wynosiły odpowiednio 4 646 Hz i 25 133 Hz. Dane zarejestrowano na matrycy 2048 x 250 i przetworzono na matrycy 2K x 1K.

Widmo HSQC uzyskano w trybie zależnym od fazy. Okna spektralne dla osi  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  wynosiły odpowiednio 4 646 Hz i 20 110 Hz. Dane zebrano w macierzy 2048 x 200 i przetworzono w matrycy 2K x 1K.

Widmo ROESY uzyskano w matrycy 4424 x 450 i przetworzono w matrycy 4K x 1K przy maksymalnym czasie 300 ms.

Widmo TOCSY uzyskano w matrycy 4424 x 400 i przetworzono w matrycy 4K x 1K.

#### G. HPLC

Oznaczenia HPLC-MS/MS wykonywane były na aparacie Agilent 1290 Infinity LC with an Agilent 6540 Accurate Mass Q-TOF LC/MS System w Katedrze Chemii Analitycznej Politechniki Gdańskiej. Warunki rozdziału i detekcji chromatograficznej HPLC badanych związków: kolumna - Poroshell EC-C18 (3,0 x 150 mm) / 2,7 mm, Agilent Technologies;

temperatura kolumny: 40 ° C; objętość wtrysku: 2 µL; szybkość przepływu: 0,4 mL/min; eluenty: (A) 0,1% HCOOH w wodzie, (B) 0,1% HCOOH w ACN / CH<sub>3</sub>OH (1: 1, v / v).

#### H. Spektrofotometria

Pomiary spektrofotometryczne wykonane zostały za pomocą spektrofotometru Perkin Elmer 2030 Multilabel Reader Victor TMX4, natomiast pomiary cytometryczne wykonywane były z wykorzystaniem analizatora komórek BD LSRFortessa™ w Zakładzie Immunologii Klinicznej i Transplantologii.

#### I. IC<sub>50</sub>

Wartości IC<sub>50</sub> wyznaczone były za pomocą programu SigmaPlot 11.

#### J. Istotność statystyczna i test Fishera

Wartości p i F wyznaczone były z wykorzystaniem programu STATISTICA 11.0.



## 4.2. Synteza 9-fenoksy-1-nitroakrydyny (125a)

### 4.2.1. Synteza soli potasowej kwasu *o*-chlorobenzoesowego (121)

20 g (127,7 mmoli) kwasu *o*-chlorobenzoesowego rozpuściłam w wodzie destylowanej, następnie dodawałam KOH do uzyskania odczynu obojętnego (około 7,8 g; 139 mmoli). Po zobojętnieniu roztworu rozpuszczalnik oddestylowałam na wyparce rotacyjnej. Otrzymałam 22,6 g (114,8 mmola) soli potasowej kwasu *o*-chlorobenzoesowego (**121**) z wydajnością 90%.

### 4.2.2. Synteza kwasu *N*-(3'-nitrofenylo)antranilowego (123a)

W kolbie kulistej umieściłam 12,35 g (62,5 mmola) soli potasowej kwasu *o*-chlorobenzoesowego, 25,9 g (187,5 mmola) *m*-nitroaniliny i 0,12 g świeżo strąconego pyłu miedzi. Mieszaninę umieściłam w łaźni olejowej na mieszadle magnetycznym i ogrzewałam w temp. 125°C przez 1 godz. Następnie gorący stop wylałam do 0,3 dm<sup>3</sup> intensywnie mieszającego się gorącego 5% roztworu węglanu potasu. Mieszaninę ogrzewałam do wrzenia z dodatkiem węgla aktywnego, przesączyłam. Po oziębieniu odsączyłam wytrącony nadmiar *m*-nitroaniliny. Przesącz zakwasiłam stęż. HCl do pH = 5-6. Osad odsączyłam i przemyłam gorącą wodą. Następnie surowy produkt krystalizowałam z etanolu, otrzymując 6,9 g kwasu *N*-(3'-nitrofenylo)antranilowego (**123a**) z wydajnością 42%.

T.t. = 215-216°C; lit. [106] = 215-216°C.

### 4.2.3. Synteza 9-chloro-1-nitroakrydyny (124a) i 9-fenoksy-1-nitroakrydyny (125a)

6,9 g (26,6 mmola) kwasu *N*-(3'-nitrofenylo)antranilowego oraz 40,8 ml (266 mmola) POCl<sub>3</sub> ogrzewałam pod chłodnicą zwrotną w temp. 80-120°C. Po 20 min. nadmiar POCl<sub>3</sub> oddestylowałam pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce rotacyjnej. Do pozostałości dodałam niewielką ilość chloroformu, następnie roztwór wylałam intensywnie mieszając do mieszaniny amoniak:chloroform (1:3), schłodzonej do -70°C. Warstwy od siebie rozdzieliłam. Warstwę organiczną wysuszyłam bezw. MgSO<sub>4</sub>, przesączyłam i oddestylowałam rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Do powstałego osadu dodałam pirydynę, wytrącony osad odsączyłam i przemyłam pirydyną. Następnie przesącz ogrzewałam w temp. 60°C przez 20 min. Po oziębieniu wytrącony osad 9-chloro-1-nitroakrydyny (**124a**) odsączyłam i przemyłam eterem dietylowym. Surowy produkt przenieśliśmy do kolby kulistej, dodałam

fenol. Następnie mieszaninę reakcyjną umieściłam w łaźni olejowej na mieszadle magnetycznym i ogrzewałam w temp. 80°C przez 45 min. Po zakończeniu reakcji, roztwór ochłodziłam i wylałam do mieszaniny benzen:5% KOH (1:1, v/v). Warstwy rozdzieliłam, a fazę organiczną wysuszyłam bezw. MgSO<sub>4</sub>. Po odsączeniu środka suszącego rozpuszczalnik oddestylowałam pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymałam 5,4 g (17 mmola) związku (**125a**) z wydajnością 64%.

T.t. = 193-197°C; lit.[107] = 191-197°C;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 8.46 (m, 1H, OPh), 8.27 (m, 1H, OPh), 8.07 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, 4), 7.96 (m, 2H, OPh), 7.82 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, 2), 7.60 (m, 1H, 6), 7.31 (m, 2H, 3, 5), 7.11 (m, 1H, 7), 6.81 (m, 2H, 8, OPh).

### 4.3. Synteza 9-fenoksy-4-metylo-1-nitroakrydyny (**125b**)

#### 4.3.1. Synteza kwasu *N*-(2'-metylo-5'-nitrofenylo)antranilowego (**123b**)

W kolbie kulistej umieściłam 12,35 g (62,5 mmola) soli potasowej kwasu *o*-chlorobenzoowego, 28,5 g (187,5 mmola) 2-metylo-5-nitroaniliny i 0,12 g świeżo strąconego pyłu miedzi. Mieszaninę umieściłam w łaźni olejowej na mieszadle magnetycznym i ogrzewałam w temp. 125°C przez 1 godz. Następnie gorący stop wylałam do 0,3 dm<sup>3</sup> intensywnie mieszającego się gorącego 5% roztworu węglanu potasu. Mieszaninę ogrzewałam do wrzenia z dodatkiem węgla aktywnego, przesączyłam. Po oziębieniu odsączyłam wytrącony nadmiar 2-metylo-5-nitroaniliny. Przesącz zakwaśiłam stęż. HCl do pH = 5-6. Osad odsączyłam i przemyłam gorącą wodą. Następnie surowy produkt krystalizowałam z etanolu, otrzymując 11 g (40,4 mmola) kwasu *N*-(2'-metylo-5'-nitrofenylo)antranilowego (**123b**) z wydajnością 64%.

#### 4.3.2. Synteza 9-chloro-4-metylo-1-nitroakrydyny (**124b**) i 9-fenoksy-4-metylo-1-nitroakrydyny (**125b**)

11 g (40,4 mmola) kwasu *N*-(2'-metylo-5'-nitrofenylo)antranilowego oraz 62 ml (403,9 mmola) POCl<sub>3</sub> ogrzewałam pod chłodnicą zwrotną w temp. 80-120°C. Po 20 min. nadmiar POCl<sub>3</sub> oddestylowałam pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce rotacyjnej. Do pozostałości dodałam niewielką ilość chloroformu, następnie roztwór wylałam intensywnie mieszając do mieszaniny amoniak:chloroform (1:3), schłodzonej do -70°C. Warstwy od siebie

rozdzieliłam. Warstwę organiczną wysuszyłam bezw.  $\text{MgSO}_4$ , przesączyłam i oddestylowałam rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Do surowego produktu dodałam fenol. Następnie mieszaninę reakcyjną umieściłam w łaźni olejowej na mieszadle magnetycznym i ogrzewałam w temp.  $80^\circ\text{C}$  przez 45 min. Po zakończeniu reakcji, roztwór ochłodziłam i wylałam do mieszaniny benzen: 5% KOH (1:1, v/v). Warstwy rozdzieliłam w rozdzielaczu, a fazę organiczną wysuszyłam bezw.  $\text{MgSO}_4$ . Po odsączeniu środka suszącego rozpuszczalnik oddestylowałam pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymałam 9,6 g (29 mmola) związku (**125b**) z wydajnością 72%.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta = 8.31$  (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H, OPh), 7.95 (m, 2H, OPh), 7.84 (m, 2H, 2, OPh), 7.61 (m, 1H, 6), 7.30 (m, 2H, 3, 5), 7.10 (m, 1H, 7), 6.78 (m, 2H, 8, OPh), 2.94 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

#### 4.4. Synteza 1-chloro-4-nitro-9(10*H*)-akrydonu (**130**)

##### 4.4.1. Synteza kwasu *N*-(5'-chloro-2'-nitrofenylo)antranilowego (**129**)

W kolbie kulistej sporządziłam roztwór 10 g (51,4 mmola) soli potasowej kwasu *o*-chlorobenzoowego, 8,9 g (51,4 mmola) 5-chloro-2-nitroaniliny i katalitycznej ilości świeżo strąconego pyłu miedzi w alkoholu izoamyłowym. Mieszaninę umieściłam w płaszczu grzejnym na mieszadle magnetycznym i ogrzewałam pod chłodnicą zwrotną w temp. wrzenia przez 5 godz. Po tym czasie rozpuszczalnik oddestylowałam z parą wodną. Do pozostałości destylacyjnej dodałam rozc. kwas solny. Wytrącony osad odsączyłam i przemyłam kilkakrotnie wodą. Po wysuszeniu otrzymałam 11,1 g (37,9 mmola) kwasu *N*-(5'-chloro-2'-nitrofenylo)antranilowego (**129**) z wydajnością 74%.

T.t. =  $227\text{-}228^\circ\text{C}$ ; lit.[108] =  $228^\circ\text{C}$ .

##### 4.4.2. Synteza 1-chloro-4-nitro-9(10*H*)-akrydonu (**130**)

11,1 g (37,9 mmola) kwasu *N*-(5'-chloro-2'-nitrofenylo)antranilowego rozpuściłam w 31 ml stęż. kwasu siarkowego. Całość ogrzewałam w temp.  $95^\circ\text{C}$  przez 1,5 godz. pod chłodnicą zwrotną. Wytrącony osad odsączyłam, przemyłam kilkakrotnie wodą. Po wysuszeniu otrzymałam 8,6 g (31,3 mmola) produktu końcowego (**130**) z wydajnością 83%.

T.t. =  $248\text{-}250^\circ\text{C}$ ; lit.[109] =  $248\text{-}249^\circ\text{C}$ ;

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 7.41 (m, 2H, 7, 2), 7.71 (m, 1H, 6), 8.00 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H, 5), 8.19 (m, 1H, 8), 8.56 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 1H, 3).

#### 4.4. Synteza pochodnych tuftsyny/retro-tuftsyny

Procedura otrzymywania tri-, tetra- i pentapeptydów jest analogiczna jak w przypadku syntezy dipeptydu (**133**). Postęp reakcji każdego z etapów kontrolowałam za pomocą TLC w układzie A.

##### 4.4.1. Synteza tuftsyny (**140**)

###### 4.4.1.1. Synteza Boc-Pro-OH (**131**)

10 g (86,9 mmola) L-proliny rozpuściłam w 100 ml wody i 226 ml dioksanu. Następnie dodawałam 1 mol/dm<sup>3</sup> roztwór NaOH do uzyskania pH = 9-10. Całość schłodziłam w lodzie i mieszając na mieszadle magnetycznym dodawałam porcjami 20 g (91,6 mmola) pirowęglaanu di-*tert*-butylu, utrzymując przez cały czas pH w granicy 9-10. Następnie mieszaninę reakcyjną mieszałam w temp. pokojowej do dnia następnego. Po tym czasie dioksan oddestylowałam pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość ekstrahowałam heksanem. Warstwy rozdzieliłam, fazę wodą ochłodziłam w lodzie, zakwasiłam 10% roztworem wodorosiarczany potasu do pH = 2-3 i ekstrahowałam 3-krotnie octanem etylu. Warstwy octanowe połączyłam, przemyłam wodą i suszyłam bezw. MgSO<sub>4</sub>. Po oddestylowaniu octanu etylu otrzymałam 13,7 g (63,6 mmola) Boc-Pro-OH (**131**) z wydajnością 73%.

T.t. = 133-136°C; lit.[110] = 133-135°C.

###### 4.4.1.2. Synteza Boc-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> (**133**)

3,2 g (14,8 mmola) Boc-Pro-OH rozpuściłam w 5 ml bezw. DMF i ochłodziłam do -15°C, następnie dodałam 1,5 ml (14,8 mmola) NMM i 2 ml (14,8 mmola) chloromrówczanu izobutylu. Po pięciu minutach mieszania dodałam ochłodzony roztwór 3,98 g (14,8 mmola) HClxArg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> w 5 ml bezw. metanolu i 1,5 ml (14,8 mmola) NMM. Całość mieszałam na mieszadle magnetycznym w temp. -15°C przez 4 godz., a następnie w temp. pokojowej do dnia następnego. Po tym czasie oddestylowałam DMF, pozostałość rozpuściłam w octanie etylu i przemywałam kolejno: 5% HCl (2×), H<sub>2</sub>O (2×), NaCl<sub>nas</sub>, NaHCO<sub>3nas</sub>, H<sub>2</sub>O, NaCl<sub>nas</sub>. Warstwę organiczną wysuszyłam bezw. MgSO<sub>4</sub>, a rozpuszczalnik oddestylowałam do sucha, otrzymując

4,8 g (11,6 mmola) Boc-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> (**133**) z wydajnością 79%. Obecność oraz czystość produktu sprawdzałam za pomocą TLC w układzie A.

MS znaleziono:  $m/z$  430,98 [M+H]<sup>+</sup>; obliczone dla C<sub>17</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub> 430,46.

#### 4.4.1.3. Synteza Boc-Lys(Fmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> (**136**)

Wychodząc z 2,1 g (4,5 mmola) Boc-Lys(Fmoc)-OH, 2 x 4 ml bezw. DMF, 0,45 ml (4,5 mmola) NMM, 0,6 ml (4,5 mmola) chloromrówczanu izobutyli, 2 g (4,5 mmola) TFA×Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> oraz 0,45 ml (4,5 mmola) TEA otrzymałam 2,3 g (3 mmole) Boc-Lys(Fmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> (**136**) z wydajnością 68%.

MS znaleziono:  $m/z$  781,39 [M+H]<sup>+</sup>; obliczone dla C<sub>38</sub>H<sub>51</sub>N<sub>7</sub>O<sub>10</sub> 780,87.

#### 4.4.1.4. Synteza Boc-Thr-Lys(Fmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> (**139**)

Wychodząc z 0,6 g (2,7 mmola) Boc-Thr-OH, 2 x 3 ml bezw. DMF, 0,28 ml (2,7 mmola) NMM, 0,37 ml (2,7 mmola) chloromrówczanu izobutyli, 2,2 g (2,7 mmola) TFA×Lys(Fmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> i 0,28 ml (2,7 mmola) TEA otrzymałam 1,4 g (1,55 mmola) Boc-Thr-Lys(Fmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> (**139**) z wydajnością 57%.

R<sub>f</sub> = 0,65 (układ A);

T.t. = 119-124°C;

MS znaleziono:  $m/z$  882,44 [M+H]<sup>+</sup>; obliczone dla C<sub>42</sub>H<sub>59</sub>N<sub>9</sub>O<sub>12</sub> 881,97;

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.12 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 3H, γ-T4), 1.37 (m, 2H, γ-K4), 1.408 (m, 11H, Boc-CH<sub>3</sub>, δ-K5), 1.51 (m, 2H, γ-R4), 1.53 (m, 1H, β-K3b), 1.62 (m, 2H, β-R3b, β-K3a), 1.74 (m, 2H, β-R3a, β-P3b), 1.97 (m, 1H, γ-P4b), 2.04 (m, 1H, β-P3a), 2.13 (m, 1H, γ-P4a), 2.20 (m, 1H, β-P3a), 3.12 (m, 2H, ε-K6), 3.23 (m, 2H, δ-R5), 3.62 (m, 1H, δ-P5b), 3.66 (s, 3H, R-COOCH<sub>3</sub>), 3.71 (m, 1H, δ-P5a), 3.86 (m, 1H, β-T3), 4.21 (m, 1H, Fmoc-CH), 4.26 (m, 1H, α-R2), 4.31 (m, 1H, α-P2), 4.39 (m, 3H, Fmoc-CH<sub>2</sub>, α-T2), 4.67 (m, 2H, T-OH, T-α-K2), 5.73 (m, 1H, α-TaN), 7.05 (m, 1H, α-RaN), 7.30 (m, 2H, Fmoc-Ph-H), 7.38 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 2H, Fmoc-Ph-H), 7.61 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 2H, Fmoc-Ph-H), 7.85 (m, 2H, ε-KeN, α-KaN), 7.75 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 2H, Fmoc-Ph-H), 8.44 (m, 1H, δ-RcN).

#### 4.4.1.5. Synteza Boc-Thr-Lys-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> (140)

1 g (1,1 mmola) Boc-Thr-Lys(Fmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> rozpuściłam w 3 ml chloroformu i dodałam 1 ml DEA. Całość pozostawiłam do dnia następnego. Po tym czasie odparowałam rozpuszczalnik, a uzyskany olej zalałam bezw. eterem dietylowym otrzymując 0,64 g (1 mmol) produktu (**140**) z wydajnością 86%.

#### 4.4.2. Synteza pochodnych tuftsyny (142a-d)

##### 4.4.2.1. Synteza Boc-Thr-Lys(GlyFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> (142a)

Wychodząc z 86 mg (0,302 mmola) Fmoc-Gly-OH, 2 x 2 ml bezw. DMF, 30 µl (0,302 mmola) NMM, 42 µl (0,302 mmola) chloromrówczanu izobutyli, 200 mg (0,302 mmola) Boc-Thr-Lys-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> otrzymałam 132 mg (0,140 mmola) związku (**142a**) z wydajnością 47%.

R<sub>f</sub> = 0,43 (układ A);

MS znaleziono: *m/z* 939,46 [M+H]<sup>+</sup>; obliczone dla C<sub>44</sub>H<sub>62</sub>N<sub>10</sub>O<sub>13</sub> 939,02.

##### 4.4.2.2. Synteza Boc-Thr-Lys(β-AlaFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> (142b)

Wychodząc z 92 mg (0,296 mmola) Fmoc-β-Ala-OH, 2 x 2 ml bezw. DMF, 30 µl (0,296 mmola) NMM, 40 µl (0,296 mmola) chloromrówczanu izobutyli i 196 mg (0,296 mmola) Boc-Thr-Lys-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> otrzymałam 128 mg (0,134 mmola) związku (**142b**) z wydajnością 45%.

R<sub>f</sub> = 0,45 (układ A);

MS znaleziono: *m/z* 953,47 [M+H]<sup>+</sup>; obliczone dla C<sub>45</sub>H<sub>64</sub>N<sub>10</sub>O<sub>13</sub> 953,05;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 1.03 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, γ-T4), 1.06 (m, 2H, γ-K4), 1.38 (m, 11H, Boc-CH<sub>3</sub>, δ-K5), 1.50 (m, 2H, γ-R4), 1.57 (m, 1H, β-K3b), 1.63 (m, 2H, β-R3b, β-K3a), 1.76 (m, 2H, β-R3a, β-P3b), 1.82 (m, 1H, γ-P4b), 1.85 (m, 1H, β-P3a), 1.91 (m, 1H, γ-P4a), 2.06 (m, 1H, β-P3a), 2.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, α-A2), 2.38 (m, 2H, β-A3), 3.01 (m, 2H, ε-K6), 3.19 (m, 3H, δ-R5, δ-P5b), 3.62 (s, 3H, R-COOCH<sub>3</sub>), 3.65 (m, 1H, δ-P5a), 3.88 (m, 1H, β-T3), 4.22 (m, 1H, Fmoc-CH), 4.28 (m, 2H, α-R2, α-P2), 4.39 (m, 3H, Fmoc-CH<sub>2</sub>, α-T2), 4.51 (m, 1H, T-α-K2), 4.71 (m, 1H, T-OH), 6.42 (m, 1H, α-TaN), 7.28 (m, 1H, α-RaN), 7.33 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, Fmoc-Ph-H), 7.42 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, Fmoc-Ph-H), 7.69 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H,

Fmoc-Ph-H), 7.80 (m, 1H,  $\epsilon$ -KeN) 7.85 (m, 2H,  $\alpha$ -KaN), 7.89 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H, Fmoc-Ph-H), 8.29 (m, 1H,  $\beta$ -AbN), 8.50 (m, 1H,  $\delta$ -RcN).

#### 4.4.2.3. Synteza Boc-Thr-Lys(ValFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> (142c)

Wychodząc z 110 mg (0,324 mmola) Fmoc-Val-OH, 2 x 2 ml bezw. DMF, 32  $\mu$ l (0,324 mmola) NMM, 44  $\mu$ l (0,324 mmola) chloromrówczanu izobutyli, 214 mg (0,324 mmola) Boc-Thr-Lys-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> otrzymałam 144 mg (0,146 mmola) związku (142c) z wydajnością 45%.

$R_f = 0,47$  (układ A);

MS znaleziono:  $m/z$  981,50 [M+H]<sup>+</sup>; obliczone dla C<sub>47</sub>H<sub>68</sub>N<sub>10</sub>O<sub>13</sub> 981,10;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 1.03$  (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H,  $\gamma$ -T4), 1.06 (m, 2H,  $\gamma$ -K4), 0.85 (m, 6H,  $\gamma$ 1-V4,  $\gamma$ 2-V5), 0.90 (m, 1H,  $\beta$ -V3), 1.38 (m, 11H, Boc-CH<sub>3</sub> +  $\delta$ -K5), 1.51 (m, 2H,  $\gamma$ -R4), 1.57 (m, 1H,  $\beta$ -K3b), 1.62 (m, 2H,  $\beta$ -R3b +  $\beta$ -K3a), 1.74 (m, 2H,  $\beta$ -R3a +  $\beta$ -P3b), 1.82 (m, 1H,  $\gamma$ -P4b), 1.87 (m, 1H,  $\beta$ -P3a), 1.9 (m, 1H,  $\gamma$ -P4a), 2.06 (m, 1H,  $\beta$ -P3a), 2.97 (m, 2H,  $\epsilon$ -K6), 3.09 (m, 1H,  $\delta$ -P5b), 3.15 (m, 2H,  $\delta$ -R5), 3.62 (s, 3H, R-COOCH<sub>3</sub>), 3.64 (m, 1H,  $\delta$ -P5a), 3.78 (m, 1H,  $\alpha$ -V2), 3.88 (m, 1H,  $\beta$ -T3), 4.25 (m, 3H, Fmoc-CH,  $\alpha$ -R2,  $\alpha$ -P2), 4.34 (m, 3H, Fmoc-CH<sub>2</sub>,  $\alpha$ -T2), 4.51 (m, 1H, T- $\alpha$ -K2) 4.70 (m, 1H, T-OH), 6.39 (m, 1H,  $\alpha$ -TaN), 7.28 (m, 3H,  $\alpha$ -RaN, Fmoc-Ph-H), 7.42 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H, Fmoc-Ph-H), 7.75 (d,  $J = 7.4$  Hz, 2H, Fmoc-Ph-H), 7.88 (m, 5H,  $\epsilon$ -KeN,  $\alpha$ -KaN, Fmoc-Ph-H), 8.27 (m, 1H,  $\alpha$ -VaN), 8.50 (m, 1H,  $\delta$ -RcN).

#### 4.4.2.4. Synteza Boc-Thr-Lys(LeuFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> (142d)

Wychodząc z 112 mg (0,314 mmola) Fmoc-Leu-OH, 2 x 2 ml bezw. DMF, 32  $\mu$ l (0,314 mmola) NMM, 42  $\mu$ l (0,314 mmola) chloromrówczanu izobutyli, 206 mg (0,314 mmola) Boc-Thr-Lys-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> otrzymałam 128 mg (0,129 mmola) związku (142d) z wydajnością 41%.

$R_f = 0,49$  (układ A);

MS znaleziono:  $m/z$  995,52 [M+H]<sup>+</sup>; obliczone dla C<sub>48</sub>H<sub>70</sub>N<sub>10</sub>O<sub>13</sub> 995,13.

### 4.4.3. Synteza retro-tuftsyny (151)

#### 4.4.3.1. Synteza Boc-Lys(Fmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> (145)

Wychodząc z 2 g (4,3 mmola) Boc-Lys(Fmoc)-OH, 2 x 5 ml bezw. DMF, 0,43 ml (4,3 mmola) NMM, 0,58 ml (4,3 mmola) chloromrówczanu izobutyli, 0,72 g (4,3 mmola) HClxThr-OCH<sub>3</sub> i 0,43 ml (4,3 mmola) NMM otrzymałam 1,9 g (3,3 mmola) Boc-Lys(Fmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> (**145**) z wydajnością 78%.

MS znaleziono:  $m/z$  584,13 [M+H]<sup>+</sup>; obliczone dla C<sub>31</sub>H<sub>41</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub> 583,67.

#### 4.4.3.2. Synteza Boc-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> (147)

Wychodząc z 0,7 g (3,3 mmola) Boc-Pro-OH, 2 x 3 ml bezw. DMF, 0,33 ml (3,3 mmola) NMM, 0,45 ml (3,3 mmola) chloromrówczanu izobutyli, 2 g (3,3 mmola) TFAxLys(Fmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> i 0,33 ml (3,3 mmola) TEA otrzymałam 1,4 g (3 mmola) Boc-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> (**147**) z wydajnością 62%.

MS znaleziono:  $m/z$  703,34 [M+H]<sup>+</sup>; obliczone dla C<sub>36</sub>H<sub>48</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub> 680,79.

#### 4.4.3.3. Synteza Boc-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> (150)

Wychodząc z 0,6 g (1,9 mmola) Boc-Arg(NO<sub>2</sub>)-OH, 2 x 3 ml bezw. DMF, 0,19 ml (1,9 mmola) NMM, 0,26 ml (1,9 mmola) chloromrówczanu izobutyli, 1,3 g (1,9 mmola) TFAxPro-Lys(Fmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> i 0,19 ml (1,9 mmola) TEA otrzymałam 1,1 g (1,3 mmola) Boc-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> (**150**) z wydajnością 66%.

R<sub>f</sub> = 0,60 (układ A);

T.t. = 106-110°C;

MS znaleziono:  $m/z$  882,44 [M+H]<sup>+</sup>; obliczone dla C<sub>42</sub>H<sub>59</sub>N<sub>9</sub>O<sub>12</sub> 881,97;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 1.23 (m, 3H, γ-T4), 1.25 (m, 2H, γ-K4), 1.33 (m, 9H, Boc-CH<sub>3</sub>), 1.39 (m, 2H, δ-K5), 1.42 (m, 1H, β-K3b), 1.46 (m, 1H, β-R3b), 1.72 (m, 4H, β-K3a, γ-R4, γ-P4b), 1.93 (m, 2H, β-P3b, γ-P4a), 2.07 (m, 1H, β-P3a), 2.21 (m, 1H, β-R3a), 2.42 (m, 2H, ε-K6), 3.13 (m, 1H, δ-P5b), 3.25 (m, 3H, δ-R5, δ-P5a), 3.72 (s, 3H, R-COOCH<sub>3</sub>), 4.22 (m, 2H, β-T3, α-P2), 4.35 (m, 1H, α-T2), 4.39 (m, 3H, α-K2, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 4.49 (m, 1H, α-R2), 5.56 (m, 1H, T-OH), 7.28 (m, 2H, Fmoc-Ph-H), 7.38 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H,



Fmoc-Ph-H), 7.58 (d,  $J = 7.4$  Hz, 2H, Fmoc-Ph-H), 7.75 (d,  $J = 7.4$  Hz, 2H, Fmoc-Ph-H), 7.85 (m, 1H,  $\alpha$ -TaN), 8.73 (m, 1H,  $\alpha$ -KaN).

#### 4.4.3.4. Synteza Boc-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys-Thr-OCH<sub>3</sub> (151)

Postępując zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.4.1.5. otrzymałam związek (151) z wydajnością 81%.

#### 4.4.4. Synteza pochodnych retro-tuftsyny (153a-d)

##### 4.4.4.1. Synteza Boc-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(GlyFmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> (153a)

Wychodząc z 89 mg (0,300 mmola) Fmoc-Gly-OH, 2 x 2ml bezw. DMF, 30  $\mu$ l (0,300 mmola) NMM, 42  $\mu$ l (0,300 mmola) chloromrówczanu izobutyli, 200 mg (0,300 mmola) Boc-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys-Thr-OCH<sub>3</sub> otrzymałam 134 mg (0,142 mmola) związku (153a) z wydajnością 48%.

R<sub>f</sub> = 0,45 (układ A);

MS znaleziono:  $m/z$  939,46 [M+H]<sup>+</sup>; obliczone dla C<sub>44</sub>H<sub>62</sub>N<sub>10</sub>O<sub>13</sub> 939,02.

##### 4.4.4.2. Synteza Boc-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys( $\beta$ -AlaFmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> (153b)

Wychodząc z 93 mg (0,300 mmola) Fmoc- $\beta$ -Ala-OH, 2 x 2 ml bezw. DMF, 30  $\mu$ l (0,300 mmola) NMM, 42  $\mu$ l (0,300 mmola) chloromrówczanu izobutyli i 200 mg (0,300 mmola) Boc-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys-Thr-OCH<sub>3</sub> otrzymałam 132 mg (0,138 mmola) związku (153b) z wydajnością 46%.

R<sub>f</sub> = 0,45 (układ A);

MS znaleziono:  $m/z$  953,47 [M+H]<sup>+</sup>; obliczone dla C<sub>45</sub>H<sub>64</sub>N<sub>10</sub>O<sub>13</sub> 953,05.

##### 4.4.4.3. Synteza Boc-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(ValFmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> (153c)

Wychodząc z 102 mg (0,300 mmola) Fmoc-Val-OH, 2 x 2 ml bezw. DMF, 30  $\mu$ l (0,300 mmola) NMM, 42  $\mu$ l (0,30 mmola) chloromrówczanu izobutyli i 200 mg (0,300 mmola) Boc-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys-Thr-OCH<sub>3</sub> otrzymałam 128 mg (0,13 mmola) związku (153c) z wydajnością 43%.

$R_f = 0,48$  (układ A);

MS znaleziono:  $m/z$  981,51  $[M+H]^+$ ; obliczone dla  $C_{47}H_{68}N_{10}O_{13}$  981,10.

#### 4.4.4.4. Synteza Boc-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(LeuFmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> (153d)

Wychodząc z 106 mg (0,300 mmola) Fmoc-Leu-OH, 2 x 2 ml bezw. DMF, 30  $\mu$ l (0,300 mmola) NMM, 42  $\mu$ l (0,300 mmola) chloromrówczanu izobutyli i 200 mg (0,300 mmola) Boc-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys-Thr-OCH<sub>3</sub> otrzymałam 120 mg (0,120 mmola) związku (**153d**) z wydajnością 40%.

$R_f = 0,51$  (układ A);

MS znaleziono:  $m/z$  995,52  $[M+H]^+$ ; obliczone dla  $C_{48}H_{70}N_{10}O_{13}$  995,13.

#### 4.4.5. Deprotekcja osłony Boc z chronionych peptydów

W przypadku wszystkich peptydów osłonę Boc usuwałam zgodnie z procedurą 4.4.5.1. Obecność oraz czystość produktu sprawdzałam za pomocą TLC w układzie B.

##### 4.4.5.1. Synteza TFAxPro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> (134)

4,8 g (11,6 mmola) Boc-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> zalałam 20 ml TFA i pozostawiłam na 1 godz. Po tym czasie kwas trifluoroctowy oddestylowałam pod zmniejszonym ciśnieniem, a osad przemyłam kilkakrotnie bezw. eterem dietylowym. Otrzymałam 4,9 g (11,1 mmola) TFAxPro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> (**134**) z wydajnością 96%.

##### 4.4.5.2. Synteza TFAxLys(Fmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> (137)

Wychodząc z 2,3 g (3 mmole) Boc-Lys(Fmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> i 10 ml TFA i otrzymałam 2,2 g (2,7 mmola) TFAxLys(Fmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> (**137**) z wydajnością 91%.

#### 4.4.5.3. Synteza TFAxThr-Lys(Fmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> (154)

Wychodząc z 200 mg (0,227 mmola) Boc-Thr-Lys(Fmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> i 2 ml TFA otrzymałam 190 mg (0,212 mmola) TFAxThr-Lys(Fmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> (**154**) z wydajnością 94%.

R<sub>f</sub> = 0,56 (układ B);

T.t. = 165-169°C.

#### 4.4.5.4. Synteza TFAxThr-Lys(GlyFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> (143a)

Wychodząc z 100 mg (0,106 mmola) Boc-Thr-Lys(GlyFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> i 1 ml TFA otrzymałam 94 mg (0,106 mmola) TFAxThr-Lys(GlyFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> (**143a**) z wydajnością 94%.

R<sub>f</sub> = 0,58 (układ B).

#### 4.4.5.5. Synteza TFAxThr-Lys(β-AlaFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> (143b)

Wychodząc z 128 mg (0,134 mmola) Boc-Thr-Lys(β-AlaFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> i 2 ml TFA otrzymałam 114 mg (0,118 mmola) TFAxThr-Lys(β-AlaFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> (**143b**) z wydajnością 87%.

R<sub>f</sub> = 0,59 (układ B).

#### 4.4.5.6. Synteza TFAxThr-Lys(ValFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> (143c)

Wychodząc z 144 mg (0,146 mmola) Boc-Thr-Lys(ValFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> i 2 ml TFA otrzymałam 140 mg (0,140 mmola) TFAxThr-Lys(ValFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> (**143c**) z wydajnością 96%.

R<sub>f</sub> = 0,61 (układ B).

#### 4.4.5.7. Synteza TFAxThr-Lys(LeuFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> (143d)

Wychodząc z 100 mg (0,100 mmola) Boc-Thr-Lys(LeuFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> i 1 ml TFA otrzymałam 90 mg (0,90 mmola) TFAxThr-Lys(ValFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> (**143d**) z wydajnością 89%.

$R_f = 0,64$  (układ B).

#### 4.4.5.8. Synteza TFAxLys(Fmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> (146)

Wychodząc z 1,93 g (3,3 mmola) Boc-Lys(Fmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> i 10 ml TFA otrzymałam 1,95 g (3,3 mmola) TFAxLys(Fmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> (**146**) z wydajnością 99%.

#### 4.4.5.9. Synteza TFAxPro-Lys(Fmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> (148)

Wychodząc z 1,37 g (3 mmole) Boc-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> i 8 ml TFA otrzymałam 1,3 g (1,9 mmola) TFAxPro-Lys(Fmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> (**148**) z wydajnością 93%.

#### 4.4.5.10. Synteza TFAxArg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> (155)

Wychodząc z 200 mg (0,227 mmola) Boc-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> i 2 ml TFA otrzymałam 190 mg (0,212 mmola) TFAxArg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> (**155**) z wydajnością 94%.

$R_f = 0,55$  (układ B);

T.t = 162-166°C;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 1.06$  (m, 3H,  $\gamma$ -T4), 1.31 (m, 2H,  $\gamma$ -K4), 1.39 (m, 2H,  $\delta$ -K5), 1.49 (m, 1H,  $\beta$ -K3b), 1.55 (m, 1H,  $\beta$ -R3b), 1.60 (m, 1H,  $\beta$ -K3a), 1.65 (m, 2H,  $\gamma$ -R4), 1.67 (m, 1H,  $\gamma$ -P4b), 1.84 (m, 1H,  $\beta$ -P3b), 1.87 (m, 1H,  $\gamma$ -P4a), 1.93 (m, 1H,  $\beta$ -P3a), 2.07 (m, 1H,  $\beta$ -R3a), 2.51 (m, 2H,  $\epsilon$ -K6), 2.98 (m, 1H,  $\delta$ -P5b), 3.17 (m, 3H,  $\delta$ -R5,  $\delta$ -P5a), 3.61 (s, 3H, R-COOCH<sub>3</sub>), 4.11 (m, 2H,  $\beta$ -T3,  $\alpha$ -P2), 4.21 (m, 1H,  $\alpha$ -T2), 4.29 (m, 3H,  $\alpha$ -K2, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 4.41 (m, 1H,  $\alpha$ -R2), 5.08 (m, 1H, T-OH), 7.32 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H, Fmoc-Ph-H), 7.42 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H, Fmoc-Ph-H), 7.67 (d,  $J = 7.4$  Hz, 2H, Fmoc-Ph-H), 7.89 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H, Fmoc-Ph-H), 8.13 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H,  $\alpha$ -TaN), 8.48 (m, 1H,  $\alpha$ -KaN);

<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 172.61$  (C-K1), 172.53 (C-P1), 171.79 (C-T1), 171.45 (C-R1), 159.76 (C-COOH), 156.55 (C-Fmoc-CO), 144.39 (C-Fmoc-Ph), 143.02 (C-Fmoc-Ph), 141.18 (C-Fmoc-Ph), 139.87 (C-Fmoc-Ph), 137.88 (C-Fmoc-Ph), 129.39 (C-Fmoc-Ph), 128.06 (C-Fmoc-Ph), 127.75 (C-Fmoc-Ph), 125.63 (C-Fmoc-Ph), 121.84 (C-Fmoc-Ph), 120.56 (C-Fmoc-Ph), 120.48 (C-Fmoc-Ph), 110.21 (C-CF<sub>3</sub>), 66.82 (C-Fmoc-CH<sub>2</sub>), 66.75 (C-T3), 65.71 (C-R2), 59.75 (C-P2), 58.26 (C-T2), 53.01 (C-K2), 52.26

(C-OCH<sub>3</sub>), 51.68 (C-P5), 47.23 (C-Fmoc-CH), 40.54 (C-R5), 40.20 (C-K6), 32.17 (C-K3), 32.00 (C-R3), 29.60 (C-K5), 29.50 (C-P3), 24.96 (C-R5, C-P4), 22.47 (C-K4), 20.48 (C-T4).

#### 4.4.5.11. Synteza TFAxArg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(GlyFmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> (153a)

Wychodząc z 134 mg (0,142 mmola) Boc-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(GlyFmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> i 2 ml TFA otrzymałam 124 mg (0,132 mmola) TFAxArg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(GlyFmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> (**153a**) z wydajnością 93%.

R<sub>f</sub> = 0,56 (układ B).

#### 4.4.5.12. Synteza TFAxArg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(β-AlaFmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> (153b)

Wychodząc z 132 mg (0,138 mmola) Boc-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(β-AlaFmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> i 2 ml TFA otrzymałam 120 mg (0,118 mmola) TFAxArg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(β-AlaFmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> (**153b**) z wydajnością 92%.

R<sub>f</sub> = 0,57 (układ B).

#### 4.4.5.13. Synteza TFAxArg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(ValFmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> (153c)

Wychodząc z 128 mg (0,130 mmola) Boc-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(ValFmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> i 2 ml TFA otrzymałam 114 mg (0,116 mmola) TFAxArg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(ValFmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> (**153c**) z wydajnością 89%.

R<sub>f</sub> = 0,61 (układ B).

#### 4.4.5.14. Synteza TFAxArg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(FmocLeu)-Thr-OCH<sub>3</sub> (153d)

Wychodząc z 120 mg (0,12 mmola) Boc-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(FmocLeu)-Thr-OCH<sub>3</sub> i 2 ml TFA otrzymałam 102 mg (0,102 mmola) TFAxArg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(FmocLeu)-Thr-OCH<sub>3</sub> (**153d**) z wydajnością 86%.

R<sub>f</sub> = 0,63 (układ B).

## 4.5. Synteza peptydowych pochodnych 1-nitroakrydyny (156a-e, 160)

### 4.5.1. Synteza 9-[Thr-Lys(Fmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>]-1-nitroakrydyny (156a)

W kolbie kulistej umieściłam 20 mg (0,066 mmola) 9-fenoksy-1-nitroakrydyny, 120 mg (0,134 mmola) TFA×H<sub>2</sub>N-Thr-Lys(Fmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>, 14 µl (0,134) TEA i fenolu. Całość ogrzałam w łaźni olejowej w temp. 50°C przez 24 godz., w atmosferze azotu. Po tym czasie mieszaninę ochłodziłam i rozcieńczyłam octanem etylu. Fenol zneutralizowałam schłodzonym 5% roztworem KOH, warstwy rozdzieliłam. Warstwę organiczną wysuszyłam bezw. MgSO<sub>4</sub>, środek suszący odsączyłam, a rozpuszczalnik oddestylowałam do sucha. Surowy produkt oczyściłam za pomocą preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej wykorzystując układ E. Otrzymałam 34 mg (0,034 mmola) produktu (**156a**) z wydajnością 54%.

R<sub>f</sub> = 0,36 (układ A);

MS znaleziono: *m/z* 1004,43 [M+H]<sup>+</sup>; obliczone dla C<sub>50</sub>H<sub>57</sub>N<sub>11</sub>O<sub>12</sub> 1004,05.

### 4.5.2. Synteza 9-[Thr-Lys(GlyFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>]-1-nitroakrydyny (156b)

W kolbie kulistej umieściłam 18 mg (0,057 mmola) 9-fenoksy-1-nitroakrydyny, 120 mg (0,114 mmola) TFA×Thr-Lys(GlyFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>, 12 µl (0,114 mmola) DEA i fenolu. Postępując analogicznie jak w przypadku syntezy związku (**156a**) (procedura pkt. 4.5.1.) otrzymałam 33 mg (0,03 mmola) produktu (**156b**) z wydajnością 54%.

R<sub>f</sub> = 0,43 (układ A);

MS znaleziono: *m/z* 1061,45 [M+H]<sup>+</sup>; obliczone dla C<sub>52</sub>H<sub>60</sub>N<sub>12</sub>O<sub>13</sub> 1061,11;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 1.05 (m, 3H, γ-T4), 1.44 (m, 2H, γ-K4), 1.49 (m, 2H, δ-K5), 1.51 (m, 2H, γ-R4), 1.56 (m, 1H, β-K3b), 1.59 (m, 1H, β-R3b), 1.66 (m, 1H, β-K3a), 1.69 (m, 1H, β-R3a), 1.77 (m, 1H, β-P3b), 1.85 (m, 2H, γ-P4), 2.02 (m, 1H, β-P3a), 3.10 (m, 4H, ε-K6, α-G2), 3.36 (m, 2H, δ-R5), 3.54 (m, 1H, δ-P5b), 3.58 (s, 3H, R-COOCH<sub>3</sub>), 3.64 (m, 1H, δ-P5a), 3.79 (m, 1H, β-T3), 4.15 (m, 1H, α-R2), 4.21 (m, 1H, Fmoc-CH), 4.29 (m, 4H, α-P2, α-T2, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 4.54 (m, 1H, α-K2), 6.83 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 8), 7.11 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, 7), 7.34 (m, 2H, 3, 5), 7.38 (m, 2H, Fmoc-Ph-H), 7.41 (m, 2H, Fmoc-Ph-H), 7.46 (m, 1H, 4), 7.59 (m, 3H, 2, 6, α-RaN), 7.72 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, Fmoc-Ph-H), 7.80 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, α-GN), 7.90 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Fmoc-Ph-H), 8.19 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, α-KaN), 11.16 (m, 1H, α-TaN).

#### 4.5.3. Synteza 9-[Thr-Lys( $\beta$ -AlaFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>]-1-nitroakrydyny (156c)

W kolbie kulistej umieściłam 16 mg (0,052 mmola) 9-fenoksy-1-nitroakrydyny, 100 mg (0,103 mmola) TFA $\times$ Thr-Lys( $\beta$ -AlaFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>, 10  $\mu$ l (0,103 mmola) DEA i fenolu. Postępując zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.5.1. otrzymałam 28 mg (0,026 mmola) produktu (**156c**) z wydajnością 52%.

R<sub>f</sub> = 0,42 (układ A);

MS znaleziono:  $m/z$  1075,46 [M+H]<sup>+</sup>; obliczone dla C<sub>53</sub>H<sub>62</sub>N<sub>12</sub>O<sub>13</sub> 1075,13;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 1.05 (m, 3H,  $\gamma$ -T4), 1.43 (m, 2H,  $\gamma$ -K4), 1.49 (m, 2H,  $\delta$ -K5), 1.53 (m, 2H,  $\gamma$ -R4), 1.56 (m, 1H,  $\beta$ -K3b), 1.59 (m, 1H,  $\beta$ -R3b), 1.68 (m, 1H,  $\beta$ -K3a), 1.77 (m, 1H,  $\beta$ -R3a), 1.84 (m, 1H,  $\beta$ -P3b), 1.88 (m, 2H,  $\gamma$ -P4), 2.01 (m, 1H,  $\beta$ -P3a), 2.26 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 2H,  $\alpha$ -A2), 2.05 (m, 2H,  $\beta$ -A3), 3.10 (m, 2H,  $\epsilon$ -K6), 3.20 (m, 2H,  $\delta$ -R5), 3.52 (m, 1H,  $\delta$ -P5b), 3.59 (s, 3H, R-COOCH<sub>3</sub>), 3.65 (m, 1H,  $\delta$ -P5a), 3.78 (m, 1H,  $\beta$ -T3), 4.14 (m, 1H,  $\alpha$ -R2), 4.18 (m, 1H, Fmoc-CH), 4.28 (m, 4H,  $\alpha$ -P2,  $\alpha$ -T2, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 4.54 (m, 1H,  $\alpha$ -K2), 6.83 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H, 8), 7.11 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 1H, 7), 7.33 (m, 2H, 3, 5), 7.38 (m, 2H, Fmoc-Ph-H), 7.40 (m, 2H, Fmoc-Ph-H), 7.45 (m, 1H, 4), 7.59 (m, 3H, 2, 6,  $\alpha$ -RaN), 7.69 (d,  $J$  = 7.4 Hz, 2H, Fmoc-Ph-H), 7.82 (m, 1H,  $\beta$ -AbN), 7.89 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 2H, Fmoc-Ph-H), 8.19 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 1H,  $\alpha$ -KN), 11.16 (m, 1H,  $\alpha$ -TaN).

#### 4.5.4. Synteza 9-[Thr-Lys(ValFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>]-1-nitroakrydyny (156d)

W kolbie kulistej umieściłam 20 mg (0,064 mmola) 9-fenoksy-1-nitroakrydyny, 126 mg (0,126 mmola) TFA $\times$ Thr-Lys(ValFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>, 13  $\mu$ l (0,126 mmola) DEA i fenolu. Postępując analogicznie jak w przypadku syntezy związku (**156a**) (procedura pkt. 4.5.1.) otrzymałam 36 mg (0,032 mmola) produktu (**156d**) z wydajnością 51%.

R<sub>f</sub> = 0,45 (układ A);

MS znaleziono:  $m/z$  1103,50 [M+H]<sup>+</sup>; obliczone dla C<sub>55</sub>H<sub>66</sub>N<sub>12</sub>O<sub>13</sub> 1103,19.

#### 4.5.5. Synteza 9-[Thr-Lys(LeuFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>]-1-nitroakrydyny (156e)

W kolbie kulistej umieściłam 18 mg (0,056 mmola) 9-fenoksy-1-nitroakrydyny, 110 mg (0,108 mmola) TFA $\times$ Thr-Lys(LeuFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>, 11  $\mu$ l (0,108 mmola) i fenolu. Postępując zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.5.1. otrzymałam 30 mg (0,026 mmola) produktu (**156e**) z wydajnością 47%.

$R_f = 0,49$  (układ A);

MS znaleziono:  $m/z$  1117,89  $[M+H]^+$ ; obliczone dla  $C_{56}H_{68}N_{12}O_{13}$  1117,21.

#### 4.5.6. Synteza 9-[Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub>]-1-nitroakrydyny (160)

W kolbie kulistej umieściłam 16 mg (0,048 mmola) 9-fenoksy-1-nitroakrydyny, 80 mg (0,088 mmola) TFA×Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub>, 9 µl (0,088 mmola) DEA i fenolu. Postępując zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.5.1. otrzymałam 36 mg (0,036 mmola) produktu (**160**) z wydajnością 48%.

$R_f = 0,35$  (układ A);

MS znaleziono:  $m/z$  1004,42  $[M+H]^+$ ; obliczone dla  $C_{50}H_{57}N_{11}O_{12}$  1004,05.

#### 4.6. Deprotekcja osłony Fmoc z peptydowych pochodnych 1-nitroakrydyny

W przypadku wszystkich peptydowych pochodnych akrydyny/akrydonu osłonę Fmoc usuwałam zgodnie z procedurą 4.6.1. Obecność oraz czystość produktu sprawdzałam za pomocą TLC w układzie B.

##### 4.6.1. Synteza HClx9-[Thr-Lys-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>]-1-nitroakrydyny (115a)

34 mg (0,034 mmola) pochodnej 1-nitroakrydyny z tuftsyną rozpuściłam w 1 ml DMF i dodałam 0,3 ml DEA. Mieszaninę reakcyjną pozostawiłam na 1 godz. Po tym czasie oddestylowałam rozpuszczalnik do sucha, a surowy produkt (**158a**) oczyściłam przy użyciu preparatywnej chromatografii cienkowsarstwowej w układzie B. Następnie pochodną (**158a**) rozpuściłam w metanolu i dodałam 2 ml eteru dietylowego nasyconego kwasem chlorowodorowym. Rozpuszczalnik odparowałam na wyparce obrotowej. Surowy produkt oczyściłam za pomocą preparatywnej chromatografii cienkowsarstwowej wykorzystując układ B. Otrzymałam 23 mg (0,028 mmola) produktu (**115a**) z wydajnością 82%.

$R_f = 0,44$  (układ B);

T.t. = 194-198°C (rozkład);

MS znaleziono:  $m/z$  816,32  $[M-2H]^-$ ; obliczone dla  $C_{35}H_{48}ClN_{11}O_{10}$  818,28;

HPLC-MS: 99,15% czystości;

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 1.01$  (d,  $J = 5.8$  Hz, 3H,  $\gamma$ -T4), 1.41 (m, 2H,  $\gamma$ -K4), 1.46 (m, 2H,  $\delta$ -K5), 1.51 (m, 2H,  $\gamma$ -R4), 1.54 (m, 1H,  $\beta$ -K3b), 1.57 (m, 1H,  $\beta$ -R3b), 1.66 (m, 1H,



$\beta$ -K3a), 1.70 (m, 1H,  $\beta$ -R3a), 1.76 (m, 1H,  $\beta$ -P3b), 1.85 (m, 2H,  $\gamma$ -P4), 2.02 (m, 1H,  $\beta$ -P3a), 2.69 (m, 2H,  $\epsilon$ -K6), 3.09 (m, 2H,  $\delta$ -R5), 3.54 (m, 1H,  $\delta$ -P5b), 3.58 (s, 3H, R-COOCH<sub>3</sub>), 3.65 (m, 1H,  $\delta$ -P5a), 3.78 (m, 1H,  $\beta$ -T3), 4.13 (m, 1H,  $\alpha$ -R2), 4.27 (m, 1H,  $\alpha$ -P2), 4.29 (m, 1H,  $\alpha$ -T2), 4.53 (m, 1H,  $\alpha$ -K2), 6.81 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, 8), 7.09 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H, 7), 7.38 (m, 2H, 3, 5), 7.47 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H, 4), 7.58 (m, 3H, 2, 6,  $\alpha$ -RaN), 8.24 (d,  $J = 7.1$  Hz, 1H,  $\alpha$ -KaN), 11.20 (m, 1H,  $\alpha$ -TaN);

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta = 173.07$  (C-R1), 173.02 (C-P1), 172.13 (C-K1), 170.70 (C-T1), 155.45 (C-9), 149.21 (C-1), 140.77 (C-4a), 140.47 (C-5a), 131.66 (C-6), 129.88 (C-2), 127.58 (C-8), 120.16 (C-7), 118.67 (C-4), 116.51 (C-5), 116.14 (C-8a), 114.98 (C-3), 113.16 (C-1a), 70.64 (C-T3), 70.25 (C-T2), 60.14 (C-P2), 51.90 (C-O CH<sub>3</sub>), 51.43 (C-R2), 51.01 (C-K2), 48.47 (C-P5), 39.26 (C-R5), 39.15 (C-K6), 30.22 (C-K3), 29.17 (C-P3), 28.08 (C-K5), 26.72 (C-R3), 24.74 (C-R5, C-P4), 22.02 (C-K4), 19.07 (C-T4).

#### 4.6.2. Synteza HClx9-[Thr-Lys(Gly)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>]-1-nitroakrydyny (**115b**)

Postępując zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.6.1. otrzymałam związek (**115b**) z wydajnością 80% jako jasnopomarańczowy, krystaliczny produkt.

R<sub>f</sub> = 0,44 (układ B);

T.t. = 185-190°C (rozkład);

MS znaleziono:  $m/z$  873.34 [M-2H]<sup>-</sup>; obliczone dla C<sub>37</sub>H<sub>51</sub>ClN<sub>12</sub>O<sub>11</sub> 875,33;

HPLC-MS: 97,85% czystości;

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 1.03$  (m, 3H,  $\gamma$ -T4), 1.40 (m, 2H,  $\gamma$ -K4), 1.43 (m, 2H,  $\delta$ -K5), 1.47 (m, 2H,  $\gamma$ -R4), 1.53 (m, 1H,  $\beta$ -K3b), 1.57 (m, 1H,  $\beta$ -R3b), 1.65 (m, 1H,  $\beta$ -K3a), 1.69 (m, 1H,  $\beta$ -R3a), 1.77 (m, 1H,  $\beta$ -P3b), 1.85 (m, 2H,  $\gamma$ -P4), 2.01 (m, 1H,  $\beta$ -P3a), 3.09 (m, 2H,  $\epsilon$ -K6), 3.13 (m, 2H,  $\alpha$ -G2), 3.15 (m, 2H,  $\delta$ -R5), 3.54 (m, 1H,  $\delta$ -P5b), 3.58 (s, 3H, R-COOCH<sub>3</sub>), 3.64 (m, 1H,  $\delta$ -P5a), 3.76 (m, 1H,  $\beta$ -T3), 4.13 (m, 1H,  $\alpha$ -R2), 4.27 (m, 2H,  $\alpha$ -P2,  $\alpha$ -T2), 4.51 (m, 1H,  $\alpha$ -K2), 6.82 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, 8), 7.09 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H, 7), 7.37 (m, 2H, 3, 5), 7.45 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, 4), 7.58 (m, 3H, 2, 6,  $\alpha$ -RaN), 8.20 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H,  $\alpha$ -KaN), 11.12 (m, 1H,  $\alpha$ -TaN);

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta = 173.16$  (C-R1), 172.95 (C-P1), 172.14 (C-K1), 171.72 (C-G1), 170.98 (C-T1), 155.33 (C-9), 149.27 (C-1), 140.78 (C-4a), 140.47 (C-5a), 131.61 (C-6), 129.85 (C-2), 127.69 (C-8), 120.11 (C-7), 118.56 (C-4), 116.43 (C-5), 116.10 (C-8a), 115.01 (C-3), 113.18 (C-1a), 70.75 (C-T3), 70.28 (C-T2), 60.11 (C-P2), 51.82 (C-OCH<sub>3</sub>), 51.39

(C-R2), 51.22 (C-K2), 48.19 (C-P5), 42.88 (C-G2), 40.17 (C-R5), 38.67 (C-K6), 30.43 (C-K3), 29.08 (C-P3), 28.55 (C-K5), 28.16 (C-R3), 24.74 (C-R5, C-P4), 22.62 (C-K4), 19.09 (C-T4).

#### 4.6.3. Synteza HClx9-[Thr-Lys( $\beta$ -Ala)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>]-1-nitroakrydyny (**115c**)

Postępując zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.6.1. otrzymałam związek (**115c**) z wydajnością 81% jako jasnopomarańczowy, krystaliczny produkt.

R<sub>f</sub> = 0,36 (układ B);

T.t. = 188-194°C (rozkład);

MS znaleziono: *m/z* 887.35 [M-2H]<sup>-</sup>; obliczone dla C<sub>38</sub>H<sub>53</sub>ClN<sub>12</sub>O<sub>11</sub> 889,35;

HPLC-MS: 99,78% czystości;

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 1.02 (m, 3H,  $\gamma$ -T4), 1.41 (m, 2H,  $\gamma$ -K4), 1.44 (m, 2H,  $\delta$ -K5), 1.47 (m, 2H,  $\gamma$ -R4), 1.52 (m, 1H,  $\beta$ -K3b), 1.56 (m, 1H,  $\beta$ -R3b), 1.65 (m, 1H,  $\beta$ -K3a), 1.68 (m, 1H,  $\beta$ -R3a), 1.76 (m, 1H,  $\beta$ -P3b), 1.85 (m, 2H,  $\gamma$ -P4), 2.01 (m, 1H,  $\beta$ -P3a), 2.40 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H,  $\alpha$ -A2), 2.94 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H,  $\beta$ -A3), 3.05 (m, 2H,  $\epsilon$ -K6), 3.09 (m, 2H,  $\delta$ -R5), 3.52 (m, 1H,  $\delta$ -P5b), 3.58 (s, 3H, R-COOCH<sub>3</sub>), 3.64 (m, 1H,  $\delta$ -P5a), 3.77 (m, 1H,  $\beta$ -T3), 4.12 (m, 1H,  $\alpha$ -R2), 4.27 (m, 2H,  $\alpha$ -P2,  $\alpha$ -T2), 4.51 (m, 1H,  $\alpha$ -K2), 6.81 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 8), 7.09 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, 7), 7.38 (m, 2H, 3, 5), 7.47 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, 4), 7.58 (m, 3H, 2, 6,  $\alpha$ -RaN), 8.05 (t, *J* = 5.4 Hz, H,  $\beta$ -AbN), 8.23 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H,  $\alpha$ -KN), 11.23 (m, 1H,  $\alpha$ -TaN);

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  = 173.10 (C-R1), 172.97 (C-P1), 172.14 (C-K1), 171.74 (C-A1), 170.98 (C-T1), 155.39 (C-9), 149.30 (C-1), 140.81 (C-4a), 140.57 (C-5a), 131.63 (C-6), 129.87 (C-2), 127.69 (C-8), 120.12 (C-7), 118.55 (C-4), 116.43 (C-5), 116.11 (C-8a), 115.02 (C-3), 113.21 (C-1a), 70.74 (C-T3), 70.28 (C-T2), 60.11 (C-P2), 51.83 (C-OCH<sub>3</sub>), 51.39 (C-R2), 51.25 (C-K2), 48.11 (C-P5), 40.16 (C-R5), 38.72 (C-K6), 36.71 (C-A3), 34.45 (C-A2), 30.41 (C-K3), 29.07 (C-P3), 28.49 (C-K5), 28.15 (C-R3), 24.74 (C-R5, C-P4), 22.69 (C-K4), 19.08 (C-T4).

#### 4.6.4. Synteza HClx9-[Thr-Lys(Val)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>]-1-nitroakrydyny (**115d**)

Postępując zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.6.1. otrzymałam związek (**115d**) z wydajnością 86% jako jasnopomarańczowy, krystaliczny produkt.

R<sub>f</sub> = 0,63 (układ B);

T.t. = 191-197°C (rozkład);

MS znaleziono:  $m/z$  915,45 [M-2H]<sup>-</sup>; obliczone dla C<sub>40</sub>H<sub>57</sub>ClN<sub>12</sub>O<sub>11</sub> 917,41;

HPLC-MS: 100% czystości;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 0.81 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 3H,  $\gamma$ 1-V4), 0.87 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 3H,  $\gamma$ 2-V5), 1.04 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 3H,  $\gamma$ -T4), 1.41 (m, 1H,  $\beta$ -V3), 1.45 (m, 2H,  $\gamma$ -K4), 1.47 (m, 2H,  $\delta$ -K5), 1.51 (m, 2H,  $\gamma$ -R4), 1.55 (m, 1H,  $\beta$ -K3b), 1.57 (m, 1H,  $\beta$ -R3b), 1.68 (m, 1H,  $\beta$ -K3a), 1.77 (m, 1H,  $\beta$ -R3a), 1.84 (m, 1H,  $\beta$ -P3b), 1.88 (m, 2H,  $\gamma$ -P4), 2.03 (m, 1H,  $\beta$ -P3a), 2.99 (m, 1H,  $\alpha$ -V2), 3.06 (m, 2H,  $\epsilon$ -K6), 3.17 (m, 2H,  $\delta$ -R5), 3.54 (m, 1H,  $\delta$ -P5b), 3.60 (s, 3H, R-COOCH<sub>3</sub>), 3.65 (m, 1H,  $\delta$ -P5a), 3.79 (m, 1H,  $\beta$ -T3), 4.15 (m, 1H,  $\alpha$ -R2), 4.30 (m, 2H,  $\alpha$ -P2,  $\alpha$ -T2), 4.53 (m, 1H,  $\alpha$ -K2), 6.84 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H, 8), 7.10 (m, 1H, 7), 7.40 (m, 1H, 3), 7.50 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, 5), 7.58 (m, 3H, 6, 2,  $\alpha$ -RaN), 7.89 (m, 1H,  $\beta$ -AbN), 8.22 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 1H,  $\alpha$ -KN), 11.27 (m, 1H,  $\alpha$ -TaN);

<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 173.96 (C-V1), 172.83 (C-R1), 172.22 (C-P1), 171.15 (C-K1), 169.86 (C-T1), 159.78 (C-R6), 153.62 (C-9), 149.45 (C-1), 141.12 (C-4a), 140.84 (C-5a), 132.30 (C-4), 130.80 (C-6), 128.26 (C-2), 120.71 (C-8), 119.22 (C-7), 117.16 (C-5), 116.64 (C-8a), 115.34 (C-3), 113.49 (C-1a), 71.04 (C-T3), 70.30 (C-T2), 60.25 (C-V2), 59.29 (C-P2), 52.25 (C-OCH<sub>3</sub>), 50.45 (C-R2), 49.05 (C-K2), 47.20 (C-P5), 38.68 (C-R5), 31.81 (C-K6), 31.27 (C-V3), 29.46 (C-K3), 29.29 (C-P3), 28.38 (C-K5), 24.84 (C-R3), 22.84 (C-R5, C-P4), 20.26 (C-K4), 19.87 (C-T4), 17.76 (C-V5), 17.67 (C-V4).

#### 4.6.5. Synteza HClx9-[Thr-Lys(Leu)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>]-1-nitroakrydyny (**115e**)

Postępując zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.6.1. otrzymałam związek (**115e**) z wydajnością 83% jako jasnopomarańczowy, krystaliczny produkt.

R<sub>f</sub> = 0,63 (układ B);

T.t. = 189-192°C (rozkład);

MS znaleziono:  $m/z$  929,41 [M-2H]<sup>-</sup>; obliczone dla C<sub>41</sub>H<sub>59</sub>ClN<sub>12</sub>O<sub>11</sub> 931,43;

HPLC-MS: 100% czystości;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 0.88 (m, 6H,  $\delta$ 1-L5,  $\delta$ 2-L6), 1.04 (m,  $J$  = 6.0 Hz, 3H,  $\gamma$ -T4), 1.29 (m, 1H,  $\gamma$ -L4), 1.42 (m, 2H,  $\gamma$ -K4), 1.45 (m, 2H,  $\delta$ -K5), 1.48 (m, 2H,  $\gamma$ -R4), 1.50 (m, 1H,  $\beta$ -L3), 1.54 (m, 1H,  $\beta$ -K3b), 1.58 (m, 1H,  $\beta$ -R3b), 1.66 (m, 1H,  $\beta$ -K3a), 1.69 (m, 1H,  $\beta$ -R3a), 1.78 (m, 1H,  $\beta$ -P3b), 1.87 (m, 2H,  $\gamma$ -P4), 2.03 (m, 1H,  $\beta$ -P3a), 3.10 (m, 4H,  $\epsilon$ -K6,  $\delta$ -R5), 3.25 (m, 1H,  $\alpha$ -L2), 3.54 (m, 1H,  $\delta$ -P5b), 3.60 (s, 3H, R-COOCH<sub>3</sub>), 3.67 (m, 1H,  $\delta$ -P5a), 3.78 (m, 1H,  $\beta$ -T3), 4.21 (m, 1H,  $\alpha$ -R2), 4.30 (m, 2H,  $\alpha$ -P2,  $\alpha$ -T2), 4.53 (m, 1H,  $\alpha$ -K2), 6.83 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H, 8), 7.11 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 1H, 7), 7.40 (m, 1H, 3), 7.48 (d,

$J = 8.4$  Hz, 1H, 5), 7.60 (m, 3H, 6, 2,  $\alpha$ -RaN), 7.99 (m, 1H,  $\beta$ -AbN), 8.20 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H,  $\alpha$ -KN), 11.19 (m, 1H,  $\alpha$ -TaN);

$^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 174.85$  (C-V1), 173.15 (C-R1), 172.96 (C-P1), 172.13 (C-K1), 171.02 (C-T1), 159.31 (C-R6), 155.36 (C-9), 149.30 (C-1), 140.80 (C-4a), 140.49 (C-5a), 131.63 (C-4), 129.87 (C-6), 127.70 (C-2), 120.13 (C-8), 118.57 (C-7), 116.47 (C-5), 116.11 (C-8a), 115.04 (C-3), 113.21 (C-1a), 70.77 (C-T3), 70.33 (C-T2), 60.14 (C-V2), 56.93 (C-P2), 52.95 (C-OCH<sub>3</sub>), 51.81 (C-R2), 51.40 (C-K2), 51.27 (C-P5), 40.17 (C-R5), 38.79 (C-K6), 30.48 (C-V3), 29.06 (C-K3), 28.55 (C-P3), 28.17 (C-K5), 24.75 (C-R3), 24.45 (C-R5, C-P4), 22.73 (C-K4), 21.15 (C-T4), 19.13 (C-V5), 16.99 (C-V4).

#### 4.6.6. Synteza HClx9-[Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys-Thr-OCH<sub>3</sub>]-1-nitroakrydyny (117)

Postępując zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.6.1. otrzymałam związek (117) z wydajnością 86% jako jasnopomarańczowy, krystaliczny produkt.

$R_f = 0,43$  (układ B);

T.t.=183-187°C (rozkład);

MS znaleziono:  $m/z$  816,32 [M-2H]<sup>-</sup>; obliczone dla C<sub>35</sub>H<sub>48</sub>ClN<sub>11</sub>O<sub>10</sub> 818,28;

HPLC-MS: 99,35% czystości;

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 1.00$  (d,  $J = 5.4$  Hz, 3H,  $\gamma$ -T4), 1.30 (m, 2H,  $\gamma$ -K4), 1.40 (m, 2H,  $\delta$ -K5), 1.48 (m, 1H,  $\beta$ -K3b), 1.57 (m, 1H,  $\beta$ -R3b), 1.63 (m, 1H,  $\beta$ -K3a), 1.68 (m, 2H,  $\gamma$ -R4), 1.69 (m, 1H,  $\gamma$ -P4b), 1.72 (m, 1H,  $\beta$ -P3b), 1.76 (m, 1H,  $\gamma$ -P4a), 1.89 (m, 1H,  $\beta$ -P3a), 1.96 (m, 1H,  $\beta$ -R3a), 2.62 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H,  $\epsilon$ -K6), 3.07 (m, 1H,  $\delta$ -P5b), 3.19 (m, 3H,  $\delta$ -R5,  $\delta$ -P5a), 3.59 (s, 3H, R-COOCH<sub>3</sub>), 4.07 (m, 1H,  $\beta$ -T3), 4.11 (m, 1H,  $\alpha$ -P2), 4.21 (m, 1H,  $\alpha$ -T2), 4.25 (m, 1H,  $\alpha$ -K2), 4.79 (m, 1H,  $\alpha$ -R2), 7.11 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H, 7), 7.33 (m, 2H, 3, 5), 7.41 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H, 4), 7.52 (m, 2H, 2, 6), 7.65 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, 8), 7.82 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H,  $\alpha$ -TaN), 8.00 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H,  $\alpha$ -KaN), 10.96 (m, 1H,  $\alpha$ -RaN);

$^{13}\text{C}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 172.55$  (C-K1), 171.93 (C-P1), 171.43 (C-T1), 169.51 (C-R1), 152.25 (C-9), 149.44 (C-1), 141.27 (C-4a), 140.85 (C-5a), 131.67 (C-6), 130.25 (C-2), 127.41 (C-8), 120.50 (C-7), 118.78 (C-4), 116.94 (C-5), 116.57 (C-8a), 116.25 (C-3), 114.27 (C-1a), 66.69 (C-T3), 62.70 (C-R2), 59.84 (C-P2), 58.09 (C-T2), 52.67 (C-K2), 52.27 (C-OCH<sub>3</sub>), 46.60 (C-P5), 40.54 (C-R5), 40.20 (C-K6), 31.74 (C-K3), 30.53 (C-R3), 29.50 (C-K5), 29.19 (C-P3), 24.81 (C-R5, C-P4), 22.68 (C-K4), 20.47 (C-T4).

#### 4.7. Synteza peptydowych pochodnych 4-metylo-1-nitroakrydyny (157a-e, 161)

##### 4.7.1. Synteza 9-[Thr-Lys(Fmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>]-4-metylo-1-nitroakrydyny (157a)

W kolbie kulistej umieściłam 50 mg (0,152 mmola) 9-fenoksy-4-metylo-1-nitroakrydyny, 200 mg (0,304 mmola) TFA×H<sub>2</sub>N-Thr-Lys(Fmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> i fenolu. Postępując analogicznie jak w przypadku syntezy związku (156a) (procedura pkt. 4.5.1.) otrzymałam 106 mg (0,104 mmola) produktu (157a) z wydajnością 69%.

R<sub>f</sub> = 0,70 (układ A);

MS znaleziono: *m/z* 1018,52 [M+H]<sup>+</sup>; obliczone dla C<sub>51</sub>H<sub>59</sub>N<sub>11</sub>O<sub>12</sub> 1018,08.

##### 4.7.2. Synteza 9-[Thr-Lys(GlyFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>]-4-metylo-1-nitroakrydyny (157b)

W kolbie kulistej umieściłam 35 mg (0,107 mmola) 9-fenoksy-4-metylo-1-nitroakrydyny, 200 mg (0,214 mmola) TFA×Thr-Lys(GlyFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> i fenolu. Postępując analogicznie jak w przypadku syntezy związku (156a) (procedura pkt. 4.5.1.) otrzymałam 69 mg (0,064 mmola) produktu (157b) z wydajnością 61%.

R<sub>f</sub> = 0,72 (układ A);

MS znaleziono: *m/z* 1075,41 [M+H]<sup>+</sup>; obliczone dla C<sub>53</sub>H<sub>62</sub>N<sub>12</sub>O<sub>13</sub> 1075,13.

##### 4.7.3. Synteza 9-[Thr-Lys(β-AlaFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>]-4-metylo-1-nitroakrydyny (157c)

W kolbie kulistej umieściłam 34 mg (0,105 mmola) 9-fenoksy-4-metylo-1-nitroakrydyny, 200 mg (0,21 mmola) TFA×Thr-Lys(β-AlaFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> i fenolu. Postępując analogicznie jak w przypadku syntezy związku (156a) (procedura pkt. 4.5.1.) otrzymałam 63 mg (0,058 mmola) produktu (157c) z wydajnością 56%.

R<sub>f</sub> = 0,76 (układ A);

MS znaleziono: *m/z* 1089,58 [M+H]<sup>+</sup>; obliczone dla C<sub>53</sub>H<sub>62</sub>N<sub>12</sub>O<sub>13</sub> 1089,16.

#### 4.7.4. Synteza 9-[Thr-Lys(ValFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>]-4-metylo-1-nitroakrydyny (157d)

W kolbie kulistej umieściłam 34 mg (0,102 mmola) 9-fenoksy-4-metylo-1-nitroakrydyny, 200 mg (0,204 mmola) TFA×Thr-Lys(ValFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> i fenolu. Postępując analogicznie jak w przypadku syntezy związku (156a) (procedura pkt. 4.5.1.) otrzymałam 62 mg (0,055 mmola) produktu (157d) z wydajnością 54%.

R<sub>f</sub> = 0,79 (układ A);

MS znaleziono: *m/z* 1117,64 [M+H]<sup>+</sup>; obliczone dla C<sub>56</sub>H<sub>68</sub>N<sub>12</sub>O<sub>13</sub> 1117,21.

#### 4.7.5. Synteza 9-[Thr-Lys(LeuFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>]-4-metylo-1-nitroakrydyny (157e)

W kolbie kulistej umieściłam 33 mg (0,102 mmola) 9-fenoksy-4-metylo-1-nitroakrydyny, 200 mg (0,204 mmola) TFA×Thr-Lys(LeuFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> i fenolu. Postępując analogicznie jak w przypadku syntezy związku (156a) (procedura pkt. 4.5.1.) otrzymałam 59 mg (0,052 mmola) produktu (157e) z wydajnością 52%.

R<sub>f</sub> = 0,83 (układ A);

MS znaleziono: *m/z* 1131,82 [M+H]<sup>+</sup>; obliczone dla C<sub>57</sub>H<sub>70</sub>N<sub>12</sub>O<sub>13</sub> 1131,24.

#### 4.7.6. Synteza 9-[Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub>]-4-metylo-1-nitroakrydyny (161)

Sporządziłam roztwór 50 mg (0,152 mmola) 9-fenoksy-4-metylo-1-nitroakrydyny, 200 mg (0,304 mmola) TFA×Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> i fenolu. Postępując analogicznie jak w przypadku syntezy związku (156a) (procedura pkt. 4.5.1.) otrzymałam 97 mg (0,095 mmola) produktu (161) z wydajnością 63%.

R<sub>f</sub> = 0,71 (układ A);

MS znaleziono: *m/z* 1018,55 [M+H]<sup>+</sup>; obliczone dla C<sub>51</sub>H<sub>59</sub>N<sub>11</sub>O<sub>12</sub> 1018,08.

## 4.8. Deprotekcja osłony Fmoc z peptydowych pochodnych 4-metylo-1-nitroakrydyny

### 4.8.1. Synteza HClx9-[Thr-Lys-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>]-4-metylo-1-nitroakrydyny (**116a**)

Postępując zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.6.1. otrzymałam związek (**116a**) z wydajnością 89% jako jasnopomarańczowy, krystaliczny produkt.

R<sub>f</sub> = 0,40 (układ B);

T.t. = 185-189°C (rozkład);

HPLC-MS: 99,35% czystości;

MS znaleziono: *m/z* 830,32 [M-2H]<sup>-</sup>; obliczone dla C<sub>36</sub>H<sub>50</sub>ClN<sub>11</sub>O<sub>10</sub> 832,30;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 1.01 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, γ-T4), 1.44 (m, 2H, γ-K4), 1.49 (m, 2H, δ-K5), 1.58 (m, 2H, γ-R4), 1.60 (m, 1H, β-K3b), 1.62 (m, 1H, β-R3b), 1.67 (m, 1H, β-K3a), 1.71 (m, 1H, β-R3a), 1.79 (m, 1H, β-P3b), 1.88 (m, 2H, γ-P4), 2.04 (m, 1H, β-P3a), 2.54 (s, 3H, Ar-CH<sub>3</sub>), 2.77 (m, 2H, ε-K6), 3.12 (m, 2H, δ-R5), 3.56 (m, 1H, δ-P5b), 3.60 (s, 3H, R-COOCH<sub>3</sub>), 3.67 (m, 1H, δ-P5a), 3.79 (m, 1H, β-T3), 4.15 (m, 1H, α-R2), 4.28 (m, 1H, α-P2), 4.31 (m, 1H, α-T2), 4.54 (m, 1H, α-K2), 6.84 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, 8), 7.13 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, 7), 7.35 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, 3), 7.47 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, 5), 7.58 (m, 3H, 2, 6, α-RaN), 8.27 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, α-KaN), 10.03 (m, 1H, α-TaN);

<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 173.14 (C-R1), 173.11 (C-P1), 172.12 (C-K1), 170.66 (C-T1), 159.26 (C-R6), 156.35 (C-9), 147.74 (C-1), 140.85 (C-4a), 138.79 (C-5a), 131.54 (C-4), 130.22 (C-6), 128.18 (C-2), 127.31 (C-8), 120.45 (C-7), 117.16 (C-5), 116.18 (C-8a), 115.20 (C-3), 113.50 (C-1a), 70.78 (C-T3), 70.16 (C-T2), 60.15 (C-P2), 51.90 (C-OCH<sub>3</sub>), 51.41 (C-R2), 51.09 (C-K2), 48.46 (C-P5), 40.26 (C-R5), 39.16 (C-K6), 30.11 (C-K3), 29.15 (C-P3), 28.16 (C-K5), 26.74 (C-R3), 24.76 (C-R5, C-P4), 22.03 (C-K4), 19.07 (C-T4), 16.79 (Ar-CH<sub>3</sub>).

### 4.8.2. Synteza HClx9-[Thr-Lys(Gly)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>]-4-metylo-1-nitroakrydyny (**116b**)

Postępując zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.6.1. otrzymałam związek (**116b**) z wydajnością 92% jako jasnopomarańczowy, krystaliczny produkt.

R<sub>f</sub> = 0,43 (układ B);

T.t. = 181-187°C (rozkład);

HPLC-MS: 100% czystości;

MS znaleziono: *m/z* 887,29 [M-2H]<sup>-</sup>; obliczone dla C<sub>38</sub>H<sub>53</sub>ClN<sub>12</sub>O<sub>11</sub> 889,35;

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 1.02 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 3H,  $\gamma$ -T4), 1.40 (m, 2H,  $\gamma$ -K4), 1.45 (m, 2H,  $\delta$ -K5), 1.49 (m, 2H,  $\gamma$ -R4), 1.53 (m, 1H,  $\beta$ -K3b), 1.58 (m, 1H,  $\beta$ -R3b), 1.67 (m, 1H,  $\beta$ -K3a), 1.70 (m, 1H,  $\beta$ -R3a), 1.79 (m, 1H,  $\beta$ -P3b), 1.87 (m, 2H,  $\gamma$ -P4), 2.03 (m, 1H,  $\beta$ -P3a), 2.53 (s, 3H, Ar-CH<sub>3</sub>), 3.09 (m, 2H,  $\epsilon$ -K6), 3.11 (m, 2H,  $\alpha$ -G2), 3.17 (m, 2H,  $\delta$ -R5), 3.55 (m, 1H,  $\delta$ -P5b), 3.60 (s, 3H, R-COOCH<sub>3</sub>), 3.67 (m, 1H,  $\delta$ -P5a), 3.78 (m, 1H,  $\beta$ -T3), 4.16 (m, 1H,  $\alpha$ -R2), 4.27 (m, 1H,  $\alpha$ -P2), 4.30 (m, 2H,  $\alpha$ -T2), 4.53 (m, 1H,  $\alpha$ -K2), 6.84 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H, 8), 7.13 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 1H, 7), 7.36 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H, 3), 7.47 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H, 5), 7.58 (m, 1H,  $\alpha$ -RaN), 7.77 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H, 2), 7.83 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 1H, 6), 8.20 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 1H,  $\alpha$ -KaN), 9.96 (m, 1H,  $\alpha$ -TaN).

$^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  = 173.20 (C-R1), 172.96 (C-P1), 172.17 (C-K1), 171.22 (C-G1), 170.98 (C-T1), 159.27 (C-R6), 155.98 (C-9), 147.78 (C-1), 140.81 (C-4a), 138.71 (C-5a), 131.45 (C-4), 130.19 (C-6), 128.01 (C-2), 127.41 (C-8), 120.40 (C-7), 117.13 (C-5), 116.08 (C-8a), 115.19 (C-3), 113.45 (C-1a), 70.81 (C-T3), 70.24 (C-T2), 60.13 (C-P2), 51.90 (C-OCH<sub>3</sub>), 51.40 (C-R2), 51.31 (C-K2), 48.47 (C-P5), 43.46 (C-G2), 40.18 (C-R5), 38.67 (C-K6), 30.38 (C-K3), 29.08 (C-P3), 28.58 (C-K5), 28.14 (C-R3), 24.76 (C-R5, C-P4), 22.69 (C-K4), 19.08 (C-T4), 16.78 (Ar-CH<sub>3</sub>).

#### 4.8.3. Synteza HClx9-[Thr-Lys( $\beta$ -Ala)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>]-4-metylo-1-nitroakrydyny (116c)

Postępując zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.6.1. otrzymałam związek (116c) z wydajnością 88% jako jasnopomarańczowy, krystaliczny produkt.

$R_f$  = 0,49 (układ B);

T.t. = 190-196°C (rozkład);

HPLC-MS: 97,99% czystości;

MS znaleziono:  $m/z$  901,38 [M-2H]<sup>-</sup>; obliczone dla C<sub>39</sub>H<sub>55</sub>ClN<sub>12</sub>O<sub>11</sub> 903,38.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 1.02 (d,  $J$  = 6.1 Hz, 3H,  $\gamma$ -T4), 1.39 (m, 2H,  $\gamma$ -K4), 1.44 (m, 2H,  $\delta$ -K5), 1.51 (m, 2H,  $\gamma$ -R4), 1.54 (m, 1H,  $\beta$ -K3b), 1.59 (m, 1H,  $\beta$ -R3b), 1.68 (m, 1H,  $\beta$ -K3a), 1.70 (m, 1H,  $\beta$ -R3a), 1.79 (m, 1H,  $\beta$ -P3b), 1.85 (m, 2H,  $\gamma$ -P4), 2.03 (m, 1H,  $\beta$ -P3a), 2.29 (t,  $J$  = 6.5 Hz, 2H,  $\alpha$ -A2), 2.52 (s, 3H, Ar-CH<sub>3</sub>), 2.84 (m, 2H,  $\beta$ -A3), 3.07 (m, 2H,  $\epsilon$ -K6), 3.11 (m, 2H,  $\delta$ -R5), 3.55 (m, 1H,  $\delta$ -P5b), 3.60 (s, 3H, R-COOCH<sub>3</sub>), 3.66 (m, 1H,  $\delta$ -P5a), 3.78 (m, 1H,  $\beta$ -T3), 4.14 (m, 1H,  $\alpha$ -R2), 4.30 (m, 2H,  $\alpha$ -P2,  $\alpha$ -T2), 4.53 (m, 1H,  $\alpha$ -K2), 6.84 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 1H, 8), 7.13 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 1H, 7), 7.35 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 1H, 3), 7.46



(d,  $J = 7.8$  Hz, 1H, 5), 7.60 (m, 2H, 6,  $\alpha$ -RaN), 7.78 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H, 2), 7.97 (m, 1H,  $\beta$ -AbN), 8.23 (d,  $J = 7.0$  Hz, 1H,  $\alpha$ -KN), 9.99 (m, 1H,  $\alpha$ -TaN).

$^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 172.84$  (C-R1), 172.25 (C-P1), 171.16 (C-K1), 170.84 (C-A1), 169.86 (C-T1), 159.75 (C-R6), 154.27 (C-9), 147.89 (C-1), 141.20 (C-4a), 139.07 (C-5a), 132.00 (C-4), 130.90 (C-6), 128.36 (C-2), 127.83 (C-8), 121.05 (C-7), 118.09 (C-5), 116.58 (C-8a), 115.54 (C-3), 113.85 (C-1a), 71.02 (C-T3), 70.25 (C-T2), 59.29 (C-P2), 52.26 (C-OCH<sub>3</sub>), 50.46 (C-R2), 49.05 (C-K2), 47.21 (C-P5), 40.16 (C-R5), 38.75 (C-K6), 37.56 (C-A3), 36.59 (C-A2), 31.23 (C-K3), 29.47 (C-P3), 29.23 (C-K5), 28.37 (C-R3), 24.86 (C-R5, C-P4), 22.83 (C-K4), 20.25 (C-T4), 18.55 (Ar-CH<sub>3</sub>).

#### 4.8.4. Synteza HClx9-[Thr-Lys(Val)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>]-4-metylo-1-nitroakrydyny (116d)

Postępując zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.6.1. otrzymałam związek (116d) z wydajnością 92% jako jasnopomarańczowy, krystaliczny produkt.

$R_f = 0,43$  (układ E);

T.t. = 188-195°C (rozkład);

HPLC-MS: 99,65 % czystości;

MS znaleziono:  $m/z$  929,41 [M-2H]<sup>-</sup>; obliczone dla C<sub>41</sub>H<sub>59</sub>ClN<sub>12</sub>O<sub>11</sub> 931,43;

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 0.81$  (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H,  $\gamma$ 1-V4), 0.87 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H,  $\gamma$ 2-V5), 1.02 (m,  $J = 6.3$  Hz, 3H,  $\gamma$ -T4), 1.37 (m, 1H,  $\beta$ -V3), 1.43 (m, 2H,  $\gamma$ -K4), 1.45 (m, 2H,  $\delta$ -K5), 1.50 (m, 2H,  $\gamma$ -R4), 1.54 (m, 1H,  $\beta$ -K3b), 1.58 (m, 1H,  $\beta$ -R3b), 1.67 (m, 1H,  $\beta$ -K3a), 1.70 (m, 1H,  $\beta$ -R3a), 1.79 (m, 1H,  $\beta$ -P3b), 1.86 (m, 2H,  $\gamma$ -P4), 2.02 (m, 1H,  $\beta$ -P3a), 2.53 (s, 3H, Ar-CH<sub>3</sub>), 2.98 (m, 1H,  $\alpha$ -V2), 3.1 (m, 2H,  $\epsilon$ -K6), 3.17 (m, 2H,  $\delta$ -R5), 3.54 (m, 1H,  $\delta$ -P5b), 3.60 (s, 3H, R-COOCH<sub>3</sub>), 3.67 (m, 1H,  $\delta$ -P5a), 3.78 (m, 1H,  $\beta$ -T3), 4.16 (m, 1H,  $\alpha$ -R2), 4.29 (m, 2H,  $\alpha$ -P2,  $\alpha$ -T2), 4.52 (m, 1H,  $\alpha$ -K2), 6.84 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, 8), 7.13 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H, 7), 7.35 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H, 3), 7.47 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, 5), 7.58 (m, 2H, 6,  $\alpha$ -RaN), 7.76 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H, 2), 7.87 (m, 1H,  $\beta$ -AbN), 8.20 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H,  $\alpha$ -KN), 9.95 (m, 1H,  $\alpha$ -TaN);  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 174.45$  (C-V1), 173.19 (C-R1), 172.97 (C-P1), 172.16 (C-K1), 170.96 (C-T1), 159.27 (C-R6), 155.88 (C-9), 147.75 (C-1), 140.77 (C-4a), 138.66 (C-5a), 131.44 (C-4), 130.18 (C-6), 127.98 (C-2), 127.39 (C-8), 120.41 (C-7), 117.17 (C-5), 116.06 (C-8a), 115.17 (C-3), 113.41 (C-1a), 70.80 (C-T3), 70.31 (C-T2), 60.23 (C-V2), 60.13 (C-P2), 51.91 (C-OCH<sub>3</sub>), 51.43 (C-R2), 51.29 (C-K2), 48.49 (C-P5), 40.19 (C-R5), 38.70

(C-K6), 31.86 (C-V3), 30.42 (C-K3), 29.10 (C-P3), 28.60 (C-K5), 28.13 (C-R3), 24.76 (C-R5, C-P4), 22.80 (C-K4), 19.12 (C-T4), 18.37 (C-V5), 16.84 (Ar-CH<sub>3</sub>), 16.66 (C-V4).

#### 4.8.5. Synteza HClx9-[Thr-Lys(Leu)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>]-4-metylo-1-nitroakrydyny (116e)

Postępując zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.6.1. otrzymałam związek (116e) z wydajnością 82% jako jasnopomarańczowy, krystaliczny produkt.

R<sub>f</sub> = 0,49 (układ E);

T.t. = 192-199°C (rozkład);

HPLC-MS: 99,03% czystości;

MS znaleziono: *m/z* 943,40 [M-2H]<sup>-</sup>; obliczone dla C<sub>42</sub>H<sub>61</sub>ClN<sub>12</sub>O<sub>11</sub> 945,46;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 0.86 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, δ1-L5), 0.89 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, δ2-L6), 1.02 (m, *J* = 6.3 Hz, 3H, γ-T4), 1.26 (m, 1H, γ-L4), 1.38 (m, 2H, γ-K4), 1.42 (m, 2H, δ-K5), 1.45 (m, 2H, γ-R4), 1.50 (m, 1H, β-L3), 1.53 (m, 1H, β-K3b), 1.58 (m, 1H, β-R3b), 1.66 (m, 1H, β-K3a), 1.71 (m, 1H, β-R3a), 1.79 (m, 1H, β-P3b), 1.86 (m, 2H, γ-P4), 2.02 (m, 1H, β-P3a), 2.52 (s, 3H, Ar-CH<sub>3</sub>), 3.10 (m, 2H, ε-K6), 3.17 (m, 2H, δ-R5), 3.21 (m, 1H, α-L2), 3.54 (m, 1H, δ-P5b), 3.60 (s, 3H, R-COOCH<sub>3</sub>), 3.67 (m, 1H, δ-P5a), 3.78 (m, 1H, β-T3), 4.16 (m, 1H, α-R2), 4.29 (m, 2H, α-P2, α-T2), 4.52 (m, 1H, α-K2), 6.83 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, 8), 7.13 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, 7), 7.35 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, 3), 7.47 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, 5), 7.58 (m, 2H, 6, α-RaN), 7.76 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, 2), 7.92 (m, 1H, β-AbN), 8.20 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, α-KN), 9.96 (m, 1H, α-TaN);

<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 175.52 (C-L1), 173.18 (C-R1), 172.97 (C-P1), 172.16 (C-K1), 170.96 (C-T1), 159.25 (C-R6), 155.83 (C-9), 147.74 (C-1), 140.76 (C-4a), 138.65 (C-5a), 131.45 (C-4), 130.17 (C-6), 127.98 (C-2), 127.39 (C-8), 120.42 (C-7), 117.18 (C-5), 116.05 (C-8a), 115.17 (C-3), 113.40 (C-1a), 70.79 (C-T3), 70.31 (C-T2), 60.13 (C-P2), 53.09 (C-L2), 51.91 (C-OCH<sub>3</sub>), 51.44 (C-R2), 51.28 (C-K2), 48.50 (C-P5), 43.59 (C-L3), 40.21 (C-R5), 38.78 (C-K6), 30.45 (C-K3), 29.10 (C-P3), 28.57 (C-K5), 28.14 (C-R3), 24.76 (C-R5, C-P4), 24.49 (C-L4), 22.78 (C-K4), 22.01 (C-L6), 21.21 (C-L5), 19.15 (C-T4), 16.88 (Ar-CH<sub>3</sub>).

#### 4.8.6. Synteza HClx9-[Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys-Thr-OCH<sub>3</sub>]-4-metylo-1-nitroakrydyny (118)

Postępując zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.6.1. otrzymałam związek (118) z wydajnością 92% jako jasnopomarańczowy, krystaliczny produkt.

R<sub>f</sub> = 0,40 (układ B);

T.t. = 197-201°C (rozkład);

HPLC-MS: 99,65% czystości;

MS znaleziono: *m/z* 830,30 [M-2H]<sup>-</sup>; obliczone dla C<sub>36</sub>H<sub>50</sub>ClN<sub>11</sub>O<sub>10</sub> 832,30;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 1.02 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, γ-T4), 1.34 (m, 2H, γ-K4), 1.50 (m, 2H, δ-K5), 1.53 (m, 1H, β-K3b), 1.57 (m, 1H, β-R3b), 1.64 (m, 1H, β-K3a), 1.68 (m, 2H, γ-R4), 1.70 (m, 1H, γ-P4b), 1.73 (m, 1H, β-P3b), 1.77 (m, 1H, γ-P4a), 1.91 (m, 1H, β-P3a), 1.99 (m, 1H, β-R3a), 2.51 (s, 3H, Ar-CH<sub>3</sub>), 2.73 (m, 2H, ε-K6), 3.03 (m, 1H, δ-P5b), 3.18 (m, 3H, δ-R5, δ-P5a), 3.60 (s, 3H, R-COOCH<sub>3</sub>), 4.08 (m, 1H, β-T3), 4.11 (m, 1H, α-P2), 4.23 (m, 1H, α-T2), 4.28 (m, 1H, α-K2), 4.79 (m, 1H, α-R2), 5.04 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, T-OH), 7.15 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, 7), 7.30 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, 3), 7.40 (m, 1H, 5), 7.53 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, 6), 7.64 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, 2), 7.75 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, 8), 7.85 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, α-TaN), 8.05 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, α-KaN), 9.83 (m, 1H, α-RaN);

<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 173.23 (C-K1), 173.09 (C-P1), 171.46 (C-T1), 170.98 (C-R1), 159.49 (C-R1), 154.07 (C-9), 147.79 (C-1), 140.74 (C-4a), 139.13 (C-5a), 130.91 (C-4), 129.74 (C-6), 127.29 (C-2), 126.24 (C-8), 120.42 (C-7), 116.96 (C-5), 116.15 (C-8a), 116.07 (C-3), 114.51 (C-1a), 66.91 (C-T3), 62.26 (C-R2), 60.46 (C-P2), 57.81 (C-T2), 52.86 (C-K2), 51.48 (C-OCH<sub>3</sub>), 48.49 (C-P5), 40.84 (C-R5), 39.67 (C-K6), 30.72 (C-K3), 30.06 (C-R3), 28.98 (C-K5), 27.34 (C-P3), 24.62 (C-R5, C-P4), 22.33 (C-K4), 18.97 (C-T4), 16.62 (Ar-CH<sub>3</sub>).

#### 4.9. Synteza peptydowych pochodnych 4-nitro-9(10H)-akrydonu (164a-e, 166a-e)

##### 4.9.1. Synteza 1-[Thr-Lys(Fmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>]-4-nitro-9(10H)-akrydonu (164a)

12 mg (0,044 mmola) 1-chloro-4-nitro-9(10H)-akrydonu rozpuściłam w 3 ml bezw. DMF, następnie dodałam 80 mg (0,088 mmola) TFA×Thr-Lys(Fmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> i 13 µl (0,132 mmola) TEA. Całość mieszałam w atmosferze azotu, w temp. pokojowej do dnia następnego. Po tym czasie rozpuszczalnik oddestylowałam pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyściłam za pomocą preparatywnej chromatografii

cienkowarstwowej wykorzystując układ E. Otrzymałam 32 mg (0,031 mmola) związku (**164a**) z wydajnością 73%.

$R_f = 0,75$  (układ A);

MS znaleziono:  $m/z$  1020,51  $[M-2H]^{2-}$ ; obliczone dla  $C_{50}H_{59}N_{11}O_{13}$  1022,07;

$^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 1.18$  (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H,  $\gamma$ -T4), 1.34 (m, 2H,  $\gamma$ -K4), 1.40 (m, 2H,  $\delta$ -K5), 1.54 (m, 3H,  $\beta$ -K3b,  $\gamma$ -R4), 1.59 (m, 1H,  $\beta$ -R3b), 1.74 (m, 1H,  $\beta$ -K3a), 1.77 (m, 1H,  $\beta$ -R3a), 1.83 (m, 1H,  $\beta$ -P3b), 1.90 (m, 2H,  $\gamma$ -P4), 2.05 (m, 1H,  $\beta$ -P3a), 2.95 (m, 2H,  $\epsilon$ -K6), 3.16 (m, 2H,  $\delta$ -R5), 3.51 (m, 1H,  $\delta$ -P5b), 3.61 (s, 3H, R-COOCH<sub>3</sub>), 3.67 (m, 1H,  $\delta$ -P5a), 4.04 (m, 1H,  $\beta$ -T3), 4.17 (m, 1H, Fmoc-CH), 4.26 (m, 3H,  $\alpha$ -R2, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 4.39 (m, 2H,  $\alpha$ -T2,  $\alpha$ -P2), 4.51 (m, 1H,  $\alpha$ -K2), 5.31 (m, 1H, T-OH), 6.53 (d,  $J = 10$  Hz, 1H, 2), 7.24 (m, 1H,  $\epsilon$ -KeN), 7.30 (m, 2H, Fmoc-Ph-H), 7.38 (m, 2H, Fmoc-Ph-H), 7.42 (m, 1H, 7), 7.65 (d,  $J = 5.6$  Hz, 2H, Fmoc-Ph-H), 7.79 (t,  $J = 7.1$  Hz, 1H, 6), 7.85 (m, 2H, Fmoc-Ph-H), 7.96 (m, 1H, 5), 8.24 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H, 8), 8.30 (m, 1H,  $\alpha$ -RaN), 8.37 (m, 1H, 3), 8.47 (m, 1H,  $\alpha$ -KaN), 12.22 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H,  $\alpha$ -TaN).

#### 4.9.2. Synteza 1-[Thr-Lys(GlyFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>]-4-nitro-9(10H)-akrydonu (**164b**)

W kolbie kulistej umieściłam 26 mg (0,095 mmola) 1-chloro-4-nitro-9(10H)-akrydonu, 3 ml bezw. DMF, 182 mg (0,191 mmola) TFAxThr-Lys(GlyFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> i 29  $\mu$ l (0,285 mmola) TEA. Całość mieszałam w temp. pokojowej do dnia następnego. Postępując analogicznie jak w przypadku syntezy związku (**164a**) (procedura pkt. 4.9.1.) otrzymałam 81 mg (0,075 mmola) związku (**164b**) z wydajnością 79%.

$R_f = 0,42$  (układ A);

MS znaleziono:  $m/z$  1077,44  $[M+H]^+$ ; obliczone dla  $C_{52}H_{60}N_{12}O_{14}$  1077,10.

#### 4.9.3. Synteza 1-[Thr-Lys( $\beta$ -AlaFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>]-4-nitro-9(10H)-akrydonu (**164c**)

W kolbie kulistej umieściłam 12 mg (0,044 mmola) 1-chloro-4-nitro-9(10H)-akrydonu, 3 ml bezw. DMF, 80 mg (0,088 mmola) TFAxArg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys( $\beta$ -AlaFmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> i 13  $\mu$ l (0,132 mmola) TEA. Postępując analogicznie jak w przypadku syntezy związku (**164a**) (procedura pkt. 4.9.1.) otrzymałam 38 mg (0,034 mmola) związku (**164c**) z wydajnością 80%.

$R_f = 0,43$  (układ A);

MS znaleziono:  $m/z$  1091,64  $[M+H]^+$ ; obliczone dla  $C_{53}H_{62}N_{12}O_{14}$  1091,13.

#### 4.9.4. Synteza 1-[Thr-Lys(ValFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>]-4-nitro-9(10H)-akrydonu (164d)

W kolbie kulistej umieściłam 12 mg (0,044 mmola) 1-chloro-4-nitro-9(10H)-akrydonu, 3 ml bezw. DMF, 80 mg (0,08 mmola) TFA×Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(ValFmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> i 13 µl (0,069 mmola) TEA. Całość mieszałam w temp. pokojowej do dnia następnego. Postępując analogicznie jak w przypadku syntezy związku (164a) (procedura pkt. 4.9.1.) otrzymałam 36 mg (0,032 mmola) związku (164d) z wydajnością 73%.

$R_f = 0,43$  (układ A);

MS znaleziono:  $m/z$  1119,69  $[M+H]^+$ ; obliczone dla  $C_{55}H_{66}N_{12}O_{14}$  1119,18.

#### 4.9.5. Synteza 1-[Thr-Lys(LeuFmoc)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>]-4-nitro-9(10H)-akrydonu (164e)

W kolbie kulistej umieściłam 11 mg (0,040 mmola) 1-chloro-4-nitro-9(10H)-akrydonu, 3 ml bezw. DMF, 80 mg (0,079 mmola) TFA×Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(LeuFmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> i 12 µl (0,12 mmola) TEA. Postępując analogicznie jak w przypadku syntezy związku (164a) (procedura pkt. 4.9.1.) otrzymałam 29 mg (0,026 mmola) związku (164e) z wydajnością 64%.

$R_f = 0,47$  (układ A);

MS znaleziono:  $m/z$  1133,72  $[M+H]^+$ ; obliczone dla  $C_{56}H_{68}N_{12}O_{14}$  1133,21.

#### 4.9.6. Synteza 1-[Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub>]-4-nitro-9(10H)-akrydonu (166a)

W kolbie kulistej umieściłam 12 mg (0,044 mmola) 1-chloro-4-nitro-9(10H)-akrydonu, 3 ml bezw. DMF, 80 mg (0,088 mmola) TFA×Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(Fmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> i 13 µl (0,132 mmola) TEA. Postępując analogicznie jak w przypadku syntezy związku (164a) (procedura pkt. 4.9.1.) otrzymałam 28 mg (0,028 mmola) związku (166a) z wydajnością 64%.

$R_f = 0,68$  (układ A).

MS znaleziono:  $m/z$  1020,42  $[M-2H]^{2-}$ ; obliczone dla  $C_{50}H_{59}N_{11}O_{13}$  1022,07.

#### 4.9.7. Synteza 1-[Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(GlyFmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub>]-4-nitro-9(10H)-akrydonu (166b)

W kolbie kulistej umieściłam 29 mg (0,107 mmola) 1-chloro-4-nitro-9(10H)-akrydonu, 3 ml bezw. DMF, 200 mg (0,214 mmola) TFA×Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(GlyFmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> i 32 µl (0,321 mmola) TEA. Postępując analogicznie jak w przypadku syntezy związku (164a) (procedura pkt. 4.9.1.) otrzymałam 90 mg (0,083 mmola) związku (166b) z wydajnością 79%. R<sub>f</sub> = 0,44 (układ A);

MS znaleziono: *m/z* 1077,40 [M+H]<sup>+</sup>; obliczone dla C<sub>52</sub>H<sub>60</sub>N<sub>12</sub>O<sub>14</sub> 1077,10.

#### 4.9.8. Synteza 1-[Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(β-AlaFmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub>]-4-nitro-9(10H)-akrydonu (166c)

W kolbie kulistej umieściłam 29 mg (0,105 mmola) 1-chloro-4-nitro-9(10H)-akrydonu, 3 ml bezw. DMF, 200 mg (0,210 mmola) TFA×Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(β-AlaFmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> i 31 µl (0,315 mmola) TEA. Postępując analogicznie jak w przypadku syntezy związku (164a) (procedura pkt. 4.9.1.) otrzymałam 87 mg (0,080 mmola) związku (166c) z wydajnością 76%. R<sub>f</sub> = 0,46 (układ A);

MS znaleziono: *m/z* 1091,64 [M+H]<sup>+</sup>; obliczone dla C<sub>53</sub>H<sub>62</sub>N<sub>12</sub>O<sub>14</sub> 1091,13.

#### 4.9.9. Synteza 1-[Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(ValFmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub>]-4-nitro-9(10H)-akrydonu (166d)

W kolbie kulistej umieściłam 28 mg (0,102 mmola) 1-chloro-4-nitro-9(10H)-akrydonu, 3 ml bezw. DMF, 200 mg (0,204 mmola) TFA×Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(ValFmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> i 31 µl (0,306 mmola) TEA. Postępując analogicznie jak w przypadku syntezy związku (164a) (procedura pkt. 4.9.1.) otrzymałam 79 mg (0,070 mmola) związku (166d) z wydajnością 69%. R<sub>f</sub> = 0,52 (układ A);

MS znaleziono: *m/z* 1119,6 [M+H]<sup>+</sup>; obliczone dla C<sub>55</sub>H<sub>66</sub>N<sub>12</sub>O<sub>14</sub> 1119,18.

#### 4.9.10. Synteza 1-[Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(LeuFmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub>]-4-nitro-9(10H)-akrydonu (166e)

W kolbie kulistej umieściłam 27 mg (0,098 mmola) 1-chloro-4-nitro-9(10H)-akrydonu, 3 ml bezw. DMF, 200 mg (0,196 mmola) TFA×Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(LeuFmoc)-Thr-OCH<sub>3</sub> i 30 µl (0,296 mmola) TEA. Postępując analogicznie jak w przypadku syntezy związku (164a) (procedura pkt. 4.9.1.) otrzymałam 69 mg (0,061 mmola) związku (166e) z wydajnością 62%. R<sub>f</sub> = 0,58 (układ A);

MS znaleziono: *m/z* 1132,72 [M+H]<sup>+</sup>; obliczone dla C<sub>56</sub>H<sub>68</sub>N<sub>12</sub>O<sub>14</sub> 1133,21.

#### 4.10. Deprotekcja osłony Fmoc z peptydowych pochodnych 4-nitro-9(10H)-akrydonu

##### 4.10.1. Synteza HClx1-[Thr-Lys-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>]-4-nitro-9(10H)-akrydonu (119a)

Postępując zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.6.1. otrzymałam związek (119a) z wydajnością 83% jako jasnopomarańczowy, krystaliczny produkt.

R<sub>f</sub> = 0,69 (układ B);

T.t. = 198-202°C (rozkład);

HPLC-MS: 98,51% czystości;

MS znaleziono: *m/z* 832,31 [M-2H]<sup>-</sup>; obliczone dla C<sub>35</sub>H<sub>48</sub>ClN<sub>11</sub>O<sub>11</sub> 834,28;

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 1.16 (d, *J* = 5.8 Hz, 3H, γ-T4), 1.35 (m, 2H, γ-K4), 1.43 (m, 2H, δ-K5), 1.54 (m, 3H, β-K3b, γ-R4), 1.59 (m, 1H, β-R3b), 1.62 (m, 1H, β-K3a), 1.64 (m, 1H, β-R3a), 1.78 (m, 1H, β-P3b), 1.88 (m, 2H, γ-P4), 2.06 (m, 1H, β-P3a), 2.62 (m, 2H, ε-K6), 3.14 (m, 2H, δ-R5), 3.52 (m, 1H, δ-P5b), 3.61 (s, 3H, R-COOCH<sub>3</sub>), 3.66 (m, 1H, δ-P5a), 4.01 (m, 1H, β-T3), 4.21 (m, 1H, α-R2), 4.36 (m, 1H, α-P2), 4.39 (m, 1H, α-T2), 4.51 (m, 1H, α-K2), 6.52 (d, *J* = 10 Hz, 1H, 2), 7.42 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, 7), 7.78 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H, 6), 7.97 (m, 2H, ε-KeN, 5), 8.23 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, 8), 8.33 (m, 1H, α-RaN), 8.38 (m, 1H, 3), 8.48 (m, 1H, α-KaN), 12.22 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, α-TaN);

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 179.29 (C-9), 172.80 (C-R1), 172.28 (C-P1), 169.99 (C-K1), 169.21 (C-T1), 157.83 (C-1), 140.41 (C-4a), 138.61 (C-5a), 134.38 (C-6), 133.64 (C-3), 125.64 (C-8), 124.31 (C-7), 122.36 (C-8a), 121.16 (C-4), 119.37 (C-5), 104.73 (C-1a), 104.06 (C-2), 67.96 (C-T3), 62.56 (C-T2), 59.46 (C-P2), 52.33 (C-OCH<sub>3</sub>), 52.07 (C-R2), 50.97 (C-K2), 47.33 (C-P5), 40.01 (C-R5), 38.90 (C-K6), 30.69 (C-K3), 29.49 (C-P3), 28.43 (C-K5), 27.17 (C-R3), 24.93 (C-R5, C-P4), 22.23 (C-K4), 20.68 (C-T4).

#### 4.10.2. Synteza HClx1-[Thr-Lys(Gly)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>]-4-nitro-9(10*H*)-akrydonu (119b)

Postępując zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.6.1. otrzymałam związek (119b) z wydajnością 87% jako jasnopomarańczowy, krystaliczny produkt.

R<sub>f</sub> = 0,43 (układ B);

T.t. = 193-198°C (rozkład);

HPLC-MS: 99,22% czystości.

MS znaleziono: *m/z* 889,33 [M-2H]<sup>-</sup>; obliczone dla C<sub>37</sub>H<sub>51</sub>ClN<sub>12</sub>O<sub>12</sub> 891,33;

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 1.17 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H, γ-T4), 1.34 (m, 2H, γ-K4), 1.39 (m, 2H, δ-K5), 1.55 (m, 3H, β-K3b, γ-R4), 1.61 (m, 1H, β-R3b), 1.67 (m, 1H, β-K3a), 1.73 (m, 1H, β-R3a), 1.78 (m, 1H, β-P3b), 1.88 (m, 2H, γ-P4), 2.06 (m, 1H, β-P3a), 3.04 (m, 2H, ε-K6), 3.11 (m, 2H, α-G2), 3.14 (m, 2H, δ-R5), 3.53 (m, 1H, δ-P5b), 3.61 (s, 3H, R-COOCH<sub>3</sub>), 3.65 (m, 1H, δ-P5a), 4.02 (m, 1H, β-T3), 4.22 (m, 1H, α-R2), 4.35 (m, 1H, α-P2), 4.39 (m, 1H, α-T2), 4.50 (m, 1H, α-K2), 6.52 (d, *J* = 10 Hz, 1H, 2), 7.42 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, 7), 7.78 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, 6), 7.87 (m, 2H, ε-KeN), 7.97 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, 5), 8.23 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, 8), 8.31 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, α-RaN), 8.38 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H, 3), 8.46 (m, 1H, α-KaN), 12.22 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, α-TaN);

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 179.33 (C-9), 172.81 (C-R1), 172.25 (C-P1), 171.83 (C-G1), 170.14 (C-K1), 169.17 (C-T1), 157.83 (C-1), 140.43 (C-4a), 138.65 (C-5a), 134.40 (C-6), 133.68 (C-3), 125.66 (C-8), 124.32 (C-7), 122.38 (C-8a), 121.21 (C-4), 119.41 (C-5), 104.76 (C-1a), 103.95 (C-2), 67.95 (C-T3), 62.66 (C-T2), 59.43 (C-P2), 52.33 (C-OCH<sub>3</sub>), 52.06 (C-R2), 51.02 (C-K2), 47.31 (C-P5), 44.33 (C-G2), 40.54 (C-R5), 38.46 (C-K6), 30.99 (C-K3), 29.48 (C-P3), 29.28 (C-K5), 28.46 (C-R3), 24.94 (C-R5, C-P4), 22.76 (C-K4), 20.72 (C-T4).

#### 4.10.3. Synteza HClx1-[Thr-Lys(β-Ala)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>]-4-nitro-9(10*H*)-akrydonu (119c)

Postępując zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.6.1. otrzymałam związek (119c) z wydajnością 87% jako jasnopomarańczowy, krystaliczny produkt.

R<sub>f</sub> = 0,39 (układ B);

T.t. = 191-198°C (rozkład);

HPLC-MS: 99,72% czystości;

MS znaleziono: *m/z* 903,35 [M-2H]<sup>-</sup>; obliczone dla C<sub>38</sub>H<sub>53</sub>ClN<sub>12</sub>O<sub>12</sub> 905,35;



$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 1.39 (d,  $J$  = 6.1 Hz, 3H,  $\gamma$ -T4), 1.52 (m, 2H,  $\gamma$ -K4), 1.64 (m, 2H,  $\delta$ -K5), 1.75 (m, 3H,  $\beta$ -K3b,  $\gamma$ -R4), 1.90 (m, 3H,  $\beta$ -R3b), 1.92 (m, 1H,  $\beta$ -K3a), 1.94 (m, 1H,  $\beta$ -R3a), 2.01 (m, 1H,  $\beta$ -P3b), 2.14 (m, 2H,  $\gamma$ -P4), 2.25 (m, 1H,  $\beta$ -P3a), 2.62 (t,  $J$  = 6.4 Hz,  $\alpha$ -A2), 3.13 (m, 2H,  $\epsilon$ -K6), 3.21 (m, 2H,  $\delta$ -R5), 3.35 (m, 2H,  $\beta$ -A3), 3.63 (m, 1H,  $\delta$ -P5b), 3.69 (m, 1H,  $\delta$ -P5a), 3.75 (s, 3H, R-COOCH<sub>3</sub>), 3.94 (m, 1H,  $\beta$ -T3), 4.21 (m, 1H,  $\alpha$ -R2), 4.39 (m, 1H,  $\alpha$ -P2), 4.41 (m, 1H,  $\alpha$ -T2), 4.71 (m, 1H,  $\alpha$ -K2), 6.26 (d,  $J$  = 9.7 Hz, 1H, 2), 7.31 (t,  $J$  = 7.8 Hz, 1H, 7), 7.54 (t,  $J$  = 8.2 Hz, 1H, 6), 7.67 (m, 1H, 5), 8.14 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 1H, 8), 8.27 (d,  $J$  = 9.7 Hz, 1H, 3);

$^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  = 179.61 (C-9), 172.99 (C-R1), 171.51 (C-P1), 171.42 (C-A1), 171.35 (C-K1), 11.15 (C-T1), 157.72 (C-1), 139.58 (C-4a), 138.07 (C-5a), 133.78 (C-6), 133.09 (C-3), 125.35 (C-8), 123.56 (C-7), 122.02 (C-8a), 121.55 (C-4), 117.81 (C-5), 104.75 (C-1a), 103.28 (C-2), 67.55 (C-T3), 63.86 (C-T2), 60.50 (C-P2), 52.00 (C-OCH<sub>3</sub>), 51.49 (C-R2), 51.34 (C-K2), 48.46 (C-P5), 40.12 (C-R5), 38.65 (C-K6), 36.22 (C-A3), 32.51 (C-A2), 29.60 (C-K3), 28.92 (C-P3), 28.60 (C-K5), 28.10 (C-R3), 25.09 (C-R5, C-P4), 23.07 (C-K4), 19.57 (C-T4).

#### 4.10.4. Synteza HClx1-[Thr-Lys(Val)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>]-4-nitro-9(10H)-akrydonu (119d)

Postępując zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.6.1. otrzymałam związek (**119d**) z wydajnością 83% jako jasnopomarańczowy, krystaliczny produkt.

R<sub>f</sub> = 0,73 (układ B);

T.t. = 194-200°C (rozkład);

HPLC-MS: 99,02% czystości;

MS znaleziono:  $m/z$  931,39 [M-2H]<sup>-</sup>; obliczone dla C<sub>40</sub>H<sub>57</sub>ClN<sub>12</sub>O<sub>12</sub> 933,41;

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 0.92 (m, 6H,  $\gamma$ 1-V4,  $\gamma$ 2-V5), 1.18 (m, 1H,  $\beta$ -V3), 1.37 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 3H,  $\gamma$ -T4), 1.48 (m, 2H,  $\gamma$ -K4), 1.62 (m, 2H,  $\delta$ -K5), 1.76 (m, 3H,  $\beta$ -K3b,  $\gamma$ -R4), 1.92 (m, 3H,  $\beta$ -R3b,  $\beta$ -K3a,  $\beta$ -R3a), 2.02 (m, 1H,  $\beta$ -P3b), 2.14 (m, 2H,  $\gamma$ -P4), 2.25 (m, 1H,  $\beta$ -P3a), 3.12 (m, 2H,  $\epsilon$ -K6), 3.18 (m, 2H,  $\delta$ -R5), 3.63 (m, 1H,  $\alpha$ -V2), 3.65 (m, 1H,  $\delta$ -P5b), 3.69 (m, 1H,  $\delta$ -P5a), 3.75 (s, 3H, R-COOCH<sub>3</sub>), 3.94 (m, 1H,  $\beta$ -T3), 4.24 (m, 1H,  $\alpha$ -R2), 4.38 (m, 2H,  $\alpha$ -P2,  $\alpha$ -T2), 4.70 (m, 1H,  $\alpha$ -K2), 6.31 (d,  $J$  = 9.7 Hz, 1H, 2), 7.33 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 1H, 7), 7.58 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H, 5), 7.70 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 1H, 6), 8.19 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 1H, 8), 8.27 (d,  $J$  = 9.7 Hz, 1H, 3);

$^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 179.26 (C-9), 173.59 (C-V1), 172.80 (C-R1), 172.25 (C-P1), 170.16 (C-K1), 169.19 (C-T1), 157.80 (C-1), 140.39 (C-4a), 138.58 (C-5a), 134.34 (C-6), 133.59 (C-3), 125.62 (C-8), 124.27 (C-7), 122.35 (C-8a), 121.13 (C-4), 119.33 (C-5), 104.71 (C-1a), 104.02 (C-2), 68.00 (C-T3), 62.58 (C-T2), 60.07 (C-V2), 59.44 (C-P2), 52.32 (C-OCH<sub>3</sub>), 52.07 (C-R2), 51.11 (C-K2), 47.29 (C-P5), 40.01 (C-R5), 38.41 (C-K6), 31.69 (C-V3), 30.93 (C-K3), 29.47 (C-P3), 29.25 (C-K5), 28.44 (C-R3), 24.94 (C-R5, C-P4), 22.83 (C-K4), 20.66 (C-T4), 19.73 (C-V5), 17.75 (C-V4).

#### 4.10.5. Synteza HClx1-[Thr-Lys(Leu)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>]-4-nitro-9(10H)-akrydonu (119e)

Postępując zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.6.1. otrzymałam związek (119e) z wydajnością 81% jako jasnopomarańczowy, krystaliczny produkt.

R<sub>f</sub> = 0,82 (układ B);

T.t. = 193-197°C (rozkład);

HPLC-MS: 100% czystości;

MS znaleziono:  $m/z$  945,41 [M-2H]<sup>-</sup>; obliczone dla C<sub>41</sub>H<sub>59</sub>ClN<sub>12</sub>O<sub>12</sub> 947,43;

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 0.81 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H,  $\delta$ 1-L5), 0.84 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H,  $\delta$ 2-L6), 1.19 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H,  $\gamma$ -T4), 1.24 (m, 1H,  $\gamma$ -L4), 1.37 (m, 2H,  $\gamma$ -K4), 1.41 (m, 2H,  $\delta$ -K5), 1.55 (m, 1H,  $\beta$ -L3), 1.57 (m, 3H,  $\beta$ -K3b,  $\gamma$ -R4), 1.62 (m, 1H,  $\beta$ -R3b), 1.65 (m, 1H,  $\beta$ -K3a), 1.75 (m, 1H,  $\beta$ -R3a), 1.81 (m, 1H,  $\beta$ -P3b), 1.90 (m, 2H,  $\gamma$ -P4), 2.07 (m, 1H,  $\beta$ -P3a), 2.51 (m, 2H,  $\epsilon$ K6), 3.02 (m, 2H,  $\delta$ -R5), 3.19 (m, 1H,  $\alpha$ -L2), 3.54 (m, 1H,  $\delta$ -P5b), 3.63 (s, 3H, R-COOCH<sub>3</sub>), 3.67 (m, 1H,  $\delta$ -P5a), 4.04 (m, 1H,  $\beta$ -T3), 4.24 (m, 1H,  $\alpha$ -R2), 4.37 (m, 1H,  $\alpha$ -P2), 4.42 (m, 1H,  $\alpha$ -T2), 4.50 (m, 1H,  $\alpha$ -K2), 6.54 (d,  $J$  = 10.1 Hz, 1H, 2), 7.42 (t,  $J$  = 7.8 Hz, 1H, 7), 7.77 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 1H, 6), 7.95 (m, 2H,  $\epsilon$ -KeN, 5), 8.23 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 1H, 8), 8.32 (m, 1H,  $\alpha$ -RaN), 8.38 (m, 1H, 3), 8.48 (m, 1H,  $\alpha$ -KaN), 12.22 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 1H,  $\alpha$ -TaN);

$^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 179.33 (C-9), 174.92 (C-L1), 172.83 (C-R1), 172.26 (C-P1), 170.21 (C-K1), 169.21 (C-T1), 157.85 (C-1), 140.44 (C-4a), 138.65 (C-5a), 134.39 (C-6), 133.66 (C-3), 125.67 (C-8), 124.31 (C-7), 122.40 (C-8a), 121.21 (C-4), 119.38 (C-5), 104.77 (C-1a), 104.02 (C-2), 67.99 (C-T3), 62.64 (C-T2), 59.47 (C-P2), 53.32 (C-L2), 52.33 (C-OCH<sub>3</sub>), 52.07 (C-R2), 51.11 (C-K2), 49.06 (C-P5), 47.31 (C-L3), 44.25 (C-R5), 38.47 (C-K6), 31.01 (C-K3), 29.48 (C-P3), 29.25 (C-K5), 28.49 (C-R3), 24.95 (C-R5, C-P4), 24.55 (C-L4), 23.49 (C-K4), 22.81 (C-L6), 22.37 (C-L5), 20.70 (C-T4).

#### 4.10.6. Synteza HClx1-[Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys-Thr-OCH<sub>3</sub>]-4-nitro-9(10H)-akrydonu (120a)

Postępując zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.6.1. otrzymałam związek (120a) z wydajnością 91% jako jasnopomarańczowy, krystaliczny produkt.

R<sub>f</sub> = 0,66 (układ B);

T.t. = 189-196°C (rozkład);

HPLC-MS: 99,16% czystości;

MS znaleziono: *m/z* 832,31 [M-2H]<sup>-</sup>; obliczone dla C<sub>35</sub>H<sub>48</sub>ClN<sub>11</sub>O<sub>11</sub> 834,28;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO): δ = 1.08 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, γ-T4), 1.45 (m, 2H, γ-K4), 1.58 (m, 2H, δ-K5), 1.60 (m, 1H, β-K3b), 1.62 (m, 1H, β-R3b), 1.64 (m, 1H, β-K3a), 1.82 (m, 2H, γ-R4), 1.86 (m, 1H, γ-P4b), 1.89 (m, 1H, β-P3b), 1.97 (m, 1H, γ-P4a), 2.00 (m, 1H, β-P3a), 2.15 (m, 1H, β-R3a), 2.81 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, ε-K6), 3.17 (m, 1H, δ-P5b), 3.20 (m, 3H, δ-R5, δ-P5a), 3.64 (s, 3H, R-COOCH<sub>3</sub>), 3.87 (m, 1H, β-T3), 4.12 (m, 1H, α-P2), 4.27 (m, 1H, α-T2), 4.48 (m, 1H, α-K2), 4.95 (m, 1H, α-R2), 6.71 (d, *J* = 10.01 Hz, 1H, 2), 7.42 (m, 1H, 7), 7.79 (m, 2H, 6, ε-KeN), 7.98 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, 5), 8.05 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, 8), 8.25 (m, 1H, α-RaN), 8.33 (m, 1H, 3), 8.39 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H, α-KaN), 12.25 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, α-TaN);

<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 179.36 (C-9), 172.59 (C-K1), 171.83 (C-P1), 171.48 (C-T1), 168.62 (C-R1), 156.62 (C-1), 140.45 (C-4a), 138.64 (C-5a), 134.41 (C-6), 133.87 (C-3), 125.74 (C-8), 124.28 (C-7), 122.35 (C-8a), 121.27 (C-4), 119.38 (C-5), 104.71 (C-1a), 104.16 (C-2), 66.76 (C-T3), 59.92 (C-R2), 58.27 (C-P2), 56.46 (C-T2), 52.73 (C-K2), 52.31 (C-OCH<sub>3</sub>), 47.59 (C-P5), 40.54 (C-R5), 39.07 (C-K6), 31.69 (C-K3), 31.16 (C-R3), 29.59 (C-K5), 26.99 (C-P3), 25.10 (C-R5, C-P4), 22.61 (C-K4), 20.53 (C-T4).

#### 4.10.7. Synteza HClx1-[Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(Gly)-Thr-OCH<sub>3</sub>]-4-nitro-9(10H)-akrydonu (120b)

Postępując zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.6.1. otrzymałam związek (120b) z wydajnością 89% jako jasnopomarańczowy, krystaliczny produkt.

R<sub>f</sub> = 0,43 (układ B);

T.t. = 191-196°C (rozkład);

HPLC-MS: 100% czystości;

MS znaleziono: *m/z* 889,31 [M-2H]<sup>-</sup>; obliczone dla C<sub>37</sub>H<sub>51</sub>ClN<sub>12</sub>O<sub>12</sub> 891,33;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 1.07 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, γ-T4), 1.38 (m, 2H, γ-K4), 1.44 (m, 2H, δ-K5), 1.56 (m, 1H, β-K3b), 1.64 (m, 1H, β-R3b), 1.71 (m, 1H, β-K3a), 1.84 (m, 2H,

$\gamma$ -R4), 1.90 (m, 1H,  $\gamma$ -P4b), 1.95 (m, 1H,  $\beta$ -P3b), 1.98 (m, 1H,  $\gamma$ -P4a), 2.01 (m, 1H,  $\beta$ -P3a), 2.13 (m, 1H,  $\beta$ -R3a), 2.81 (m, 4H,  $\epsilon$ -K6,  $\alpha$ -G2), 3.17 (m, 4H,  $\delta$ -P5b,  $\delta$ -R5,  $\delta$ -P5a), 3.61 (s, 3H, R-COOCH<sub>3</sub>), 3.85 (m, 1H,  $\beta$ -T3), 4.12 (m, 1H,  $\alpha$ -P2), 4.29 (m, 1H,  $\alpha$ -T2), 4.47 (m, 1H,  $\alpha$ -K2), 4.93 (m, 1H,  $\alpha$ -R2), 6.67 (d,  $J = 10.0$  Hz, 1H, 2), 7.42 (m, 1H, 7), 7.78 (m, 2H, 6,  $\epsilon$ -KeN), 7.88 (m,  $J = 8.3$  Hz, 1H, 5), 7.93 (m,  $J = 8.3$  Hz, 1H, 8), 7.96 (m, 1H,  $\alpha$ -RaN), 8.21 (m, 1H, 3), 8.38 (d,  $J = 9.8$  Hz, 1H,  $\alpha$ -KaN), 12.24 (m, 1H,  $\alpha$ -TaN);

<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 179.32$  (C-9), 172.70 (C-K1), 172.52 (C-P1), 171.82 (C-T1), 171.49 (C-G1), 168.64 (C-R1), 156.65 (C-1), 140.444 (C-4a), 138.62 (C-5a), 134.40 (C-6), 133.84 (C-3), 125.69 (C-8), 124.30 (C-7), 122.36 (C-8a), 121.28 (C-4), 119.36 (C-5), 104.70 (C-1a), 104.11 (C-2), 66.74 (C-T3), 59.87 (C-R2), 58.16 (C-P2), 53.93 (C-T2), 53.01 (C-K2), 52.31 (C-OCH<sub>3</sub>), 47.54 (C-P5), 44.76 (C-G2), 40.86 (C-R5), 38.65 (C-K6), 32.06 (C-K3), 31.15 (C-R3), 29.57 (C-K5), 29.43 (C-P3), 25.07 (C-R5, C-P4), 23.12 (C-K4), 20.51 (C-T4).

#### 4.10.8. Synteza HClx1-[Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys( $\beta$ -Ala)-Thr-OCH<sub>3</sub>]-4-nitro-9(10*H*)-akrydonu (120c)

Postępując zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.6.1. otrzymałam związek (120c) z wydajnością 84% jako jasnopomarańczowy, krystaliczny produkt.

R<sub>f</sub> = 0,48 (układ B);

T.t. = 196-201°C (rozkład);

HPLC-MS: 92% czystości;

MS znaleziono:  $m/z$  869,39 [M+H]<sup>+</sup>; obliczone dla C<sub>38</sub>H<sub>52</sub>N<sub>12</sub>O<sub>12</sub> 868,89;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 1.07$  (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H,  $\gamma$ -T4), 1.38 (m, 2H,  $\gamma$ -K4), 1.43 (m, 2H,  $\delta$ -K5), 1.58 (m, 1H,  $\beta$ -K3b), 1.64 (m, 1H,  $\beta$ -R3b), 1.70 (m, 1H,  $\beta$ -K3a), 1.84 (m, 2H,  $\gamma$ -R4), 1.86 (m, 1H,  $\gamma$ -P4b), 1.91 (m, 1H,  $\beta$ -P3b), 1.96 (m, 1H,  $\gamma$ -P4a), 1.99 (m, 1H,  $\beta$ -P3a), 2.14 (m, 1H,  $\beta$ -R3a), 2.34 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H,  $\alpha$ -A2), 2.87 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H,  $\epsilon$ -K6), 3.07 (m, 2H,  $\beta$ -A3), 3.18 (m, 4H,  $\delta$ -P5b,  $\delta$ -R5,  $\delta$ -P5a), 3.64 (s, 3H, R-COOCH<sub>3</sub>), 3.87 (m, 1H,  $\beta$ -T3), 4.12 (m, 1H,  $\alpha$ -P2), 4.27 (m, 1H,  $\alpha$ -T2), 4.48 (m, 1H,  $\alpha$ -K2), 4.95 (m, 1H,  $\alpha$ -R2), 6.69 (d,  $J = 10.01$  Hz, 1H, 2), 7.43 (t,  $J = 8.3$  Hz, 1H, 7), 7.80 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H, 6), 7.92 (m, 1H,  $\epsilon$ -KeN), 7.98 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, 5), 8.02 (m, 1H, 8), 8.20 (m, 1H,  $\alpha$ -RaN), 8.23 (m, 1H, 3), 8.40 (d,  $J = 9.8$  Hz, 1H,  $\alpha$ -KaN), 12.26 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H,  $\alpha$ -TaN);

<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 179.37$  (C-9), 172.70 (C-K1), 171.81 (C-P1), 171.50 (C-T1), 170.41 (C-A1), 168.67 (C-R1), 156.67 (C-1), 140.47 (C-4a), 138.66 (C-5a), 134.44

(C-6), 133.88 (C-3), 125.69 (C-8), 124.32 (C-7), 122.38 (C-8a), 121.30 (C-4), 119.39 (C-5), 104.72 (C-1a), 104.14 (C-2), 66.77 (C-T3), 59.89 (C-R2), 58.20 (C-P2), 53.94 (C-T2), 53.06 (C-K2), 52.31 (C-OCH<sub>3</sub>), 47.54 (C-P5), 38.84 (C-R5), 36.88 (C-K6), 36.82 (C-A3), 35.00 (C-A2), 32.06 (C-K3), 29.60 (C-R3), 29.30 (C-K5), 29.22 (C-P3), 25.06 (C-R5, C-P4), 23.19 (C-K4), 20.51 (C-T4).

#### 4.10.9. Synteza HClx1-[Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(Val)-Thr-OCH<sub>3</sub>]-4-nitro-9(10*H*)-akrydonu (120d)

Postępując zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.6.1. otrzymałam związek (120d) z wydajnością 84% jako jasnopomarańczowy, krystaliczny produkt.

R<sub>f</sub> = 0,48 (układ B);

T.t. = 193-199°C (rozkład);

HPLC-MS: 100% czystości;

MS znaleziono: *m/z* 931,41[M-2H]<sup>-</sup>; obliczone dla C<sub>40</sub>H<sub>57</sub>ClN<sub>12</sub>O<sub>12</sub> 933,41;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO): δ = 0.80 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, γ1-V4), 0.85 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, γ2-V5), 1.06 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, γ-T4), 1.28 (m, 1H, β-V3), 1.37 (m, 2H, γ-K4), 1.43 (m, 2H, δ-K5), 1.56 (m, 1H, β-K3b), 1.64 (m, 1H, β-R3b), 1.69 (m, 1H, β-K3a), 1.82 (m, 2H, γ-R4), 1.85 (m, 1H, γ-P4b), 1.89 (m, 1H, β-P3b), 1.95 (m, 1H, γ-P4a), 1.98 (m, 1H, β-P3a), 2.13 (m, 1H, β-R3a), 2.94 (m, 2H, ε-K6), 3.04 (m, 1H, α-V2), 3.11 (m, 1H, δ-P5b), 3.18 (m, 3H, δ-R5, δ-P5a), 3.61 (s, 3H, R-COOCH<sub>3</sub>), 3.84 (m, 1H, β-T3), 4.13 (m, 1H, α-P2), 4.31 (m, 1H, α-T2), 4.46 (m, 1H, α-K2), 4.94 (m, 1H, α-R2), 6.69 (d, *J* = 10.01 Hz, 1H, 2), 7.42 (m, 1H, 7), 7.80 (m, 2H, 6, ε-KeN), 7.98 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, 5), 8.18 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, 8), 8.24 (m, 2H, α-RaN, 1H, 3), 8.40 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H, α-KaN), 12.26 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, α-TaN);

<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 179.29 (C-9), 173.27 (C-V1), 172.69 (C-K1), 171.82 (C-P1), 171.49 (C-T1), 168.63 (C-R1), 156.65 (C-1), 140.41 (C-4a), 138.59 (C-5a), 134.37 (C-6), 133.81 (C-3), 125.67 (C-8), 124.27 (C-7), 122.34 (C-8a), 121.26 (C-4), 119.33 (C-5), 104.68 (C-1a), 104.11 (C-2), 66.80 (C-T3), 59.96 (C-V2), 59.90 (C-R2), 58.21 (C-P2), 53.94 (C-T2), 53.06 (C-K2), 52.30 (C-OCH<sub>3</sub>), 47.56 (C-P5), 40.88 (C-R5), 38.72 (C-K6), 32.00 (C-V3), 31.57 (C-K3), 31.52 (C-R3), 29.59 (C-K5), 29.36 (C-P3), 25.08 (C-R5, C-P4), 23.14 (C-K4), 20.51 (C-T4), 19.75 (C-V5), 17.79 (C-V4).

#### 4.10.10. Synteza HClx1-[Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys(Leu)-Thr-OCH<sub>3</sub>]-4-nitro-9(10H)-akrydonu (120e)

Postępując zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.6.1. otrzymałam związek (120e) z wydajnością 84% jako jasnopomarańczowy, krystaliczny produkt.

R<sub>f</sub> = 0,54 (układ B);

HPLC-MS: 99% czystości;

MS znaleziono: *m/z* 945,39 [M-2H]<sup>-</sup>; obliczone dla C<sub>41</sub>H<sub>59</sub>ClN<sub>12</sub>O<sub>12</sub> 947,43;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 0.82 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, δ1-L5), 0.85 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, δ2-L6), 1.07 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, γ-T4), 1.26 (m, 1H, γ-L4), 1.38 (m, 2H, γ-K4), 1.43 (m, 1H, β-L3), 1.59 (m, 2H, δ-K5), 1.64 (m, 1H, β-K3b), 1.67 (m, 1H, β-R3b), 1.70 (m, 1H, β-K3a), 1.83 (m, 2H, γ-R4), 1.87 (m, 1H, γ-P4b), 1.91 (m, 1H, β-P3b), 1.96 (m, 1H, γ-P4a), 1.99 (m, 1H, β-P3a), 2.13 (m, 1H, β-R3a), 2.88 (m, 2H, ε-K6), 3.09 (m, 1H, δ-P5b), 3.20 (m, 4H, δ-R5, δ-P5a, 1H, α-L2), 3.61 (s, 3H, R-COOCH<sub>3</sub>), 3.85 (m, 1H, β-T3), 4.13 (m, 1H, α-P2), 4.29 (m, 1H, α-T2), 4.47 (m, 1H, α-K2), 4.94 (m, 1H, α-R2), 6.69 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, 2), 7.43 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, 7), 7.79 (m, 2H, 6, ε-KeN), 7.89 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, 5), 7.98 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, 8), 8.18 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, α-RaN), 8.24 (m, 1H, 3), 8.40 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H, α-KaN), 12.26 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, α-TaN);

<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 178.22 (C-9), 174.34 (C-L1), 173.25 (C-K1), 172.93 (C-P1), 171.07 (C-T1), 169.25 (C-R1), 155.29 (C-1), 138.93 (C-4a), 137.16 (C-5a), 133.32 (C-6), 132.77 (C-3), 124.83 (C-8), 123.26 (C-7), 121.28 (C-8a), 120.62 (C-4), 117.31 (C-5), 103.50 (C-1a), 102.36 (C-2), 66.06 (C-T3), 60.35 (C-R2), 57.87 (C-P2), 56.46 (C-T2), 53.55 (C-L2), 52.90 (C-K2), 51.55 (C-OCH<sub>3</sub>), 48.47 (C-P5), 42.95 (C-L3), 40.86 (C-R5), 38.83 (C-K6), 31.29 (C-K3), 29.36 (C-R3), 28.67 (C-K5), 27.97 (C-P3), 24.89 (C-R5, C-P4), 24.39 (C-L4), 22.68 (C-K4), 21.98 (C-L6), 21.11 (C-L5), 19.11 (C-T4).

## **4.11. Materiały stosowane w badaniach biologicznych**

### **4.11.1. Linie komórkowe**

#### **4.11.1.1. Izolowane komórki czerniaka amelanotycznego Ab i melanotycznego Ma**

W badaniach wykorzystano model przeszczepialnego czerniaka skóry chomika Bomirskiego z linią melanotyczną Ma i amelanotyczna Ab. Linia komórek Ma powstała spontanicznie u chomika syryjskiego, zaś linia Ab powstała z linii Ma, na skutek samoistnej utraty zdolności do syntezy melaniny i poza brakiem melaniny charakteryzuje się większą złośliwością. Obie linie różnią się szeregiem cech biologicznych [102].

Procedury eksperymentów zostały zatwierdzone przez Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego i przeprowadzone zgodnie z wytycznymi *National Health and Medical Research Council's* dotyczącymi opieki i użytkowania laboratorium. Komórki czerniaka izolowano dla każdego doświadczenia z guzów litych metodą nieenzymatyczną [111]. Zawiesina składała się z 95-98% żywych komórek (oszacowanych za pomocą testu z błękitem trypanowym). Komórki czerniaka hodowano w pożywce RPMI (Sigma-Aldrich) uzupełnionej 10% FBS (płodowa surowica bydłęca, Sigma-Aldrich) i antybiotykami (0,05 mg streptomycyny i 50 U penicyliny na 1 ml, Sigma-Aldrich). Każde niezależne doświadczenie przeprowadzono na komórkach izolowanych z pojedynczego guza.

#### **4.11.1.2. Komórki neuroblastomy SH-SY5Y : NC (nondifferentiated cells, dopaminergiczne), DC (differentiated cells, cholinergiczne)**

Do badań użyto ludzkie komórki neuroblastomy SH-SY5Y. Komórki wysiewano przy gęstości  $4 \times 10^3$  komórek/cm<sup>2</sup> na 25 cm<sup>2</sup> butelki do hodowli komórkowych w pożywce DMEM (Sigma-Aldrich) z 10% FBS (Sigma-Aldrich) i antybiotykami (0,05 mg streptomycyny i 50 U penicyliny na 1 ml(Sigma-Aldrich)). Różnicowanie wariantu DC uzyskano przez hodowlę komórek SH-SY5Y (oznaczonych w pracy jak NC) w pożywce wzbogaconej przez dodanie 1 mmol/L dibutyryl-cAMP (cAMP, Sigma-Aldrich) i 0,001 mmol/L all-trans-kwasu retinowego (RA, Sigma-Aldrich) przez 48 godz. [112]. Po tym czasie podłoże zastąpiono pożywką bez czynników różnicujących i dodawano testowane analogi, a hodowlę kontynuowano przez następne 72 godz. Linię komórkową zakupiono w American Type Culture

Collection (ATCC). Obie formy neuroblastomy różnią się wydzielanym neuroprzekaznikiem i tak wariant NC wydziela głównie dopaminę, zaś DC acetylocholinę

#### **4.11.1.3. Linia komórkowa Jurkat**

Podczas wykonywania przeze mnie testów wykorzystywałam linię komórkową ostrej białaczki limfoblastycznej typu T – Jurkat.

##### **4.11.1.3.1. Pasażowanie linii komórkowej – hodowla zawieszona**

Komórki Jurkat hodowałam w cieplarni w 37°C w atmosferze zawierającej 5% CO<sub>2</sub>, w plastikowych flaszki przeznaczonych do hodowli zawieszonych. Komórki hodowałam na podłożu płynnym (RPMI-1640, 10% FBS, penicylina, streptomycyna; Sigma-Aldrich). W celu odmłodzenia hodowli, komórki rozpipetowywałam, pożywkę zlewałam wraz z większością komórek znajdujących się w nadsączu. Niewielką ich ilość pozostawiałam w butelce hodowlanej lub przenosiłam do nowej uzupełniając świeżą pożywką i umieszczałam ponownie w cieplarni.

##### **4.11.1.3.2. Rozmrażanie linii komórkowej**

Komórki pobierałam w krioampułkach, z banku komórek w ciekłym azocie. Po rozmrożeniu zawieszinę odwirowywałam. Nadsącz zlewałam, a pozostałość uzupełniałam pożywką. Całość po rozpipetowaniu przenosiłam do butelek hodowlanych i uzupełniałam medium hodowlanym do objętości ok 10 mL.

##### **4.11.1.3.3. Mrożenie komórek**

Komórki odwirowywałam z pożywki hodowlanej, nadsącz zlewałam. Komórki zawieszalam w pożywce, dodawałam surowicę (10% w końcowej objętości) i DMSO (10% w końcowej objętości), następnie całość przenosiłam do krioampulek. Zamrażałam w -80°C , a następnie przenosiłam do banku komórek w ciekłym azocie.



#### **4.11.1.4. Uzyskiwanie mononuklearnych komórek krwi obwodowej (PBMC)**

Komórki PBMC pozyskałam z tzw. kożuszka leukocyтарnego. Materiał ten stanowił odpad w procesie produkcji masy erytrocyтарnej. Kożuszki dostarczono z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Gdańsku (RCKiK). Uzyskany materiał do analizy pochodził od zdrowych (wg kryteriów RCKiK) anonimowych dawców. PBMC otrzymywałam drogą wirowania z krwi żyłnej. Około 20 mL krwi umieszczałam w probówce, następnie rozcieńczałam buforem PBS w stosunku 1:1. W innej probówce przygotowałam mieszaninę Ficollu i Uropoliny (1:1), na którą następnie nawarstwiałam rozcieńczoną krew. Całość wirowałam przez 15 min. przy szybkości 2500 obr./min. Wirowanie próbki spowodowało separację PBMC na poszczególne frakcje komórek. Na dnie próbki znajdowały się erytrocyty i granulocyty. Pożądane limfocyty wraz z monocytami utworzyły tzw. „kożuszek” na granicy faz Ficollu i osocza. Uzyskany „kożuszek” ostrożnie zbierałam i przepłukiwałam dwukrotnie PBS. Następnie komórki zawiesiłam w medium hodowlanym w celu otrzymania  $10^6$  komórek na 1 mL hodowli.

#### **4.11.2. Dakarbazyna, cisplatyna, etopozyd**

Dakarbazynę (Sigma-Aldrich) zastosowano jako lek odniesienia dla linii czerniaka Ab i Ma, gdyż jest to podstawowy lek stosowany w terapii systemowej tego nowotworu.

Cisplatynę (Sigma-Aldrich) użyto jako lek odniesienia wobec linii komórkowej SHSY5Y NC i DC.

Etopozyd (Sigma-Aldrich) wykorzystano jako lek odniesienia przeciwko linii komórkowej Jurkat.

#### **4.11.3. Test kolometryczny XTT**

Żywotność badanych komórek oceniano za pomocą testu XTT (Roche Diagnostic, USA), który mierzy zdolność komórek do redukcji soli tetrazolowej XTT do rozpuszczalnego w wodzie produktu formazanu. Redukcja XTT zachodzi tylko w żywych komórkach z udziałem enzymów mitochondrialnych. Komórki umieszczano w 96-studzienkowych płytkach z odpowiednim podłożem hodowlanym w liczbie  $5 \times 10^3$  komórek neuroblastomy i czerniaka Ab oraz  $50 \times 10^3$  komórek czerniaka Ma. Po 24 godz. wymieniono pożywkę i komórki stymulowano odpowiednimi stężeniami (0,1; 1; 10; 20; 40; 50; 100; 150  $\mu$ M) badanych

analogów przez 48 i 72 godz. Pomarańczowy produkt formazanu oznaczono ilościowo przy użyciu długości fali 450 nm w czytniku mikroplatek (Multiscan FC, ThermoScientific USA). Żywotność komórek normalizowano w stosunku do nietraktowanej związkami próby kontrolnej (100%) i oceniano połowę maksymalnego stężenia hamującego IC<sub>50</sub>.

#### **4.11.4. Test kolometryczny MTT**

##### **4.11.4.1. Linia komórkowa Jurkat**

Test MTT wykorzystałam w celu określenia żywotności komórek. Wyhodowane komórki z buteleczki zlewałam do corninga i wirowałam przez 4 min. z szybkością 1200 obr/min. Nadsącz zlewałam, a komórki zawieszałam w medium hodowlanym. Komórki umieszczałam na płaskodennych, 96-dołkowych płytkach w ilości 10<sup>5</sup> komórek w 90 µL pożywki na dołek. Następnie dodałam roztwory badanych związków (10 µL) w pożywce i DMSO, otrzymując stężenia docelowe (na płytce) 250-0,1 µM. Tak przygotowane płytki inkubowałam 48 godz. w cieplarni (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Po tym czasie do każdego dołka dodawałam 20 µL roztworu MTT (5 mg/ml H<sub>2</sub>O). Inkubację kontynuowałam kolejne 4 godz., dodawałam 100 µL kwaśnego izopropanolu z 0,4 N HCl. Płytki wytrząsałam przez 15 min. do rozpuszczenia kryształków MTT. Test kolorymetryczny (odczyt gęstości optycznej) wykonywałam z wykorzystaniem fali długości 570 nm, przy użyciu czytnika mikroplatek (Perkin Elmer, Victor X4).

##### **4.11.4.2. PBMC**

Komórki izolowałam zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 4.11.1.4. i umieszczałam na płaskodennej 96-dołkowej płytce w ilości 1x10<sup>5</sup>/dołek w 90 µL pożywki. Do każdego dołka dodałam 10 µL roztworu odpowiedniego analogu akrydyny/akrydonu (rozpuszczonego w pożywce oraz DMSO), otrzymując stężenia docelowe (na płytce) 250-0,1 µM oraz monoklonalnych przeciwciał anti-CD3/anti-CD-28 w ilości 1 µL/dołek. Następnie płytki inkubowałam 72 godz. w cieplarni (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Po tym czasie do każdego dołka dodawałam 20 µL roztworu MTT (5 mg/ml H<sub>2</sub>O). Całość inkubowałam kolejne 4 godz. i dodawałam 100 µL kwaśnego izopropanolu (dodatek 0,4 N HCl). Płytki wytrząsałam przez 15 min. do rozpuszczenia kryształków MTT. Test kolorymetryczny (odczyt gęstości optycznej)

wykonywałam z wykorzystaniem fali długości 570 nm, przy użyciu czytnika mikroplątek (Perkin Elmer, Victor X4).

## 5. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Tematem mojej pracy doktorskiej jest synteza i badania *in vitro* nowych analogów akrydyny oraz akrydonu z pochodnymi tuftsyny/retro-tuftsyny acylowanymi na grupie  $\epsilon$ -aminowej lizyny, tworząc wiązanie izopeptydowe, aminokwasami: Gly,  $\beta$ -Ala, Val, Leu jako potencjalnych leków przeciwnowotworowych.

Zaprojektowałam i przeprowadziłam syntezę łącznie 22 peptydowych pochodnych: 1-nitroakrydyny (**115a-e**, **117**), 4-metylo-1-nitroakrydyny (**116a-e**, **118**) oraz 4-nitro-9(10*H*)-akrydonu (**119a-e**, **120a-e**). Otrzymane koniugaty zostały zbadane *in vitro* wobec linii komórkowej czerniaka Ab i Ma, SH-SY5Y-NC, SH-SY5Y-DC, Jurkat i PBMC.

W reakcji kondensacji Ullmana pomiędzy kwasem *o*-halogenobenzoesowym, a odpowiednią pochodną aniliny otrzymałam kwas *N*-(3'-nitro-fenilo)antranilowy oraz kwas *N*-(2'-metylo-5'-nitrofenilo)antranilowy, które w obecności POCl<sub>3</sub> ulegały cyklizacji do 9-chloro-1-nitroakrydyn i 9-chloro-4-metylo-1-nitroakrydyny. Następnie 9-chloroakrydyny przeprowadziłam w stabilniejsze 9-fenoksy pochodne.

Z kolei 1-chloro-4-nitro-9(10*H*)-akrydon uzyskałam w wyniku cyklizacji kwasu *N*-(3'-nitrofenilo)antranilowego w środowisku kwasu siarkowego.

Zaplanowane fragmenty peptydowe otrzymałam stosując metodę mieszanych bezwodników z chloromrówczanem izobutyli i NMM w bezw. DMF. Za pomocą DEA usuwałam osłonę Fmoc, z kolei kwas trifluorooctowy wykorzystywałam do deprotekcji osłony Boc.

Tak otrzymane pochodne tuftsyny/retro-tuftsyny w reakcji substytucji nukleofilowej wprowadziłam w pozycję C9 akrydyn (**125a-b**) w środowisku fenolu oraz C1 akrydonu (**130**) w bezw. DMF. Korzystne było zastosowanie dwukrotnego nadmiaru peptydu w stosunku do akrydyny/akrydonu dzięki czemu znacznie wzrosła wydajność reakcji.

W kolejnym etapie usuwałam osłonę Fmoc za pomocą 30% roztworu dietyloaminy w DMF, a uzyskane pochodne w celu zwiększenia rozpuszczalności i biodostępności przeprowadzałam w pożądaną chlorowodorki. Strukturę związków końcowych potwierdziłam za pomocą <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, MS oraz HPLC-MS. Ponadto dla wybranej pochodnej akrydyny (**117**) i akrydonu (**119b**) zostały wykonane widma dwuwymiarowe: ROESY, TOCSY, DQF-COSY, HMBC i HSQC.

Przeprowadzone badania biologiczne *in vitro* pozwoliły mi na sformułowanie następujących wniosków:

a) otrzymane związki były nieaktywne wobec melanotycznych Ma komórek czerniaka;

- b) amelanotyczne Ab komórki czerniaka wrażliwe były jedynie na działanie związków **(117)** i **(118)** z wartościami  $IC_{50} = 61$  i  $87 \mu M$ , odpowiednio;
- c) związek **(117)** jako jedyny hamował komórki neuroblastomy SH-SY5Y-NC ( $IC_{50} = 95,5 \mu M$ );
- d) komórki SH-SY5Y-DC wrażliwe były wyłącznie na działanie pochodnych **(117, 118)** z wartościami  $IC_{50} = 48,3$  i  $116 \mu M$ , odpowiednio;
- e) analog **(117)** indukuje zmiany apoptyczne poprzez aktywację kaspaz w szczególności w linii czerniaka Ab i neuroblastomy SH-SY5Y-DC;
- f) pochodna **(117)** indukuje zmiany apoptyczne jako eksternalizację fosfatydyloseryny w błonie komórkowej badanych komórek;
- g) analog **(117)** po 48 godz. zwiększa o 40% poziom komórek apoptycznych czerniaka Ab w fazie sub-G1;
- h) związek **(117)** nie zwiększa znacząco poziomu komórek apoptycznych neuroblastomy w fazie sub-G1, pomimo obserwowanych innych cech apoptozy tj. eksternalizacja fosfatydyloseryny i aktywacja kaspaz;
- i) komórki Jurkat okazały się wrażliwe jedynie na niektóre pochodne akrydyny (**115b-c, 116a-b, 117, 118**) w teście MTT;
- j) ludzkie limfocyty wrażliwe były jedynie na działanie związków **(117, 118)**;
- k) pochodna **(118)** wykazała najwyższą cytotoksyczność zarówno wobec komórek Jurkat ( $IC_{50} = 28,31 \mu M$ ), jak i PBMC ( $IC_{50} = 107,35 \mu M$ );
- l) analog **(118)** charakteryzował się czterokrotnie wyższą cytotoksycznością wobec komórek Jurkat w porównaniu do związku odniesienia (etopozyd), ale jednocześnie około 12 razy mniejszą toksycznością w stosunku do aktywowanych komórek PBMC;
- ł) peptydowe pochodne akrydonu nie wykazały cytotoksyczności wobec wszystkich badanych linii komórkowych;
- m) zauważyłam, że długość łańcucha peptydowego wpływała na aktywność cytotoksyczną związków. Ze wzrostem łańcucha aktywność badanych analogów malała;
- n) analogi 4-metylo-1-nitroakrydyny i 1-nitroakrydyny połączone z retro-tuftsyną (**117, 118**) charakteryzowały się wyższą cytotoksycznością wobec wszystkich badanych linii komórkowych w porównaniu do pochodnych akrydyn zawierających tuftsynę (**115a, 116a**).

## 6. DOROBEK NAUKOWY

### Publikacje oryginalne:

1. W. Januchta, M. Serocki, K. Dzierzbicka, G. Cholewiński, **M. Gensicka**, A. Składanowski, Synthesis and biological evaluation of novel analogues of batracylin with synthetic amino acids and adenosine: an unexpected effect on centromere segregation in tumor cells through a dual inhibition of topoisomerase II $\alpha$  and Aurora B. *RSC Adv.*, **2016**, 6, 42794-42806.
2. **M. Gensicka-Kowalewska**, K. Dzierzbicka, M. Cichorek, M. Deptuła, A. Ronowska, Synthesis new analogs of 4-methyl-1-nitroacridine and its biological evaluation as potential anticancer drugs. *Asian J. Pharm. Anal. Med. Chem.*, **2018**, 6, 42-60.
3. **M. Gensicka-Kowalewska**, K. Dzierzbicka, M. Cichorek, A. Ronowska, M. Deptuła, I. Klejbor, Synthesis and biological evaluation of acridine/acridone analogs as potential anticancer agents. *Med. Chem.* (przyjęta, oczekiwanie na nr DOI)
4. M. Cichorek, A. Ronowska, **M. Gensicka-Kowalewska**, M. Deptuła, I. Pelikant-Małecka, K. Dzierzbicka, Novel therapeutic compound acridine-retrotuftsins action on biological forms of melanoma and neuroblastoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncology* (przyjęta, oczekiwanie na nr DOI)
5. **M. Gensicka-Kowalewska**, P. Trzonkowski, A. Kot-Wasik, K. Dzierzbicka, New conjugates of acridine/acridone with tuftsins/retro-tuftsins derivatives and their anticancer activity. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* (w recenzji)

### Publikacje przeglądowe:

1. **M. Gensicka**, A. Głowacka, K. Dzierzbicka, G. Cholewiński, Inhibitors of angiogenesis in cancer therapy – synthesis and biological activity. *Curr. Med. Chem.*, **2015**, 22, 3830-3847.
2. A. Siebert, **M. Gensicka**, G. Cholewiński, K. Dzierzbicka, Synthesis of Combretastatin A-4 analogs and its biological activity. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, **2016**, 16, 942-960.
3. **M. Gensicka-Kowalewska**, G. Cholewiński, K. Dzierzbicka, Recent developments in the synthesis and biological activity of acridine/acridone analogues. *RSC Adv.*, **2017**, 7, 15776-15804.
4. A. Siebert, **M. Gensicka-Kowalewska**, G. Cholewiński, K. Dzierzbicka, Tuftsins - Properties and Analogs. *Curr. Med. Chem.*, **2017**, 24, 3711-3727.

Komunikaty drukowane w postaci streszczeń:

1. W. Januchta, **M. Gensicka**, G. Cholewiński, K. Dzierzbicka, *Synteza amidowych pochodnych batracyliny*. 57 Zjazd PTChem, Częstochowa, 14–18 Wrzesień 2014.
2. **M. Gensicka**, G. Głowacka, K. Dzierzbicka, G. Cholewiński, *Synteza fragmentów peptydowych nowych analogów heterocyklicznych*. 58 Zjazd PTChem, Gdańsk, 21–25 Wrzesień 2015.
3. A. Głowacka, **M. Gensicka**, G. Cholewiński, K. Dzierzbicka, *Synteza oligopeptydów jako nośników związków biologicznie czynnych*. 58 Zjazd PTChem, Gdańsk, 21-25 Wrzesień 2015.
4. **M. Gensicka**, *Porównanie odczynników kondensujących w syntezie oligopeptydów*. BioOrg 2015, I Wielkopolskie Seminarium Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów, Poznań, 5 Grudzień 2015.
5. **M. Gensicka**, K. Dzierzbicka, *Synteza oligopeptydowych analogów akrydyny/akrydonu*. Postępy syntezy organicznej, Gdańsk, 23-25 Czerwiec 2016.
6. **M. Gensicka**, K. Dzierzbicka, G. Cholewinski, P. Trzonkowski, *Synthesis and cytotoxic activity of the peptide analogues of acridine*. 17th Tetrahedron Symposium, Sitges, Hiszpania, 28 Czerwiec-1 Lipiec 2016.
7. **M. Gensicka**, K. Dzierzbicka, G. Cholewinski, P. Trzonkowski, *The novel analogues of acridone and peptides and its biological activity*. 17th Tetrahedron Symposium, Sitges, Hiszpania, 28 Czerwiec-1 Lipiec 2016.
8. **M. Gensicka-Kowalewska**, M. Cichorek, M. Deptuła, A. Ronowska, K. Dzierzbicka, *Cytotoxic activity of the peptide analogues of acridine/acridone*. 18th Tetrahedron Symposium, Budapeszt, Węgry, 27-30 Czerwiec 2017.
9. **M. Gensicka-Kowalewska**, M. Cichorek, M. Deptuła, A. Ronowska, K. Dzierzbicka, *Synthesis and cytotoxic activity of the retro-tuftsin analogues of acridone*. 18th Tetrahedron Symposium, Budapeszt, Węgry, 27-30 Czerwiec 2017.
10. **M. Gensicka-Kowalewska**, M. Cichorek, M. Deptuła, A. Ronowska, K. Dzierzbicka, *Synthesis and cytotoxic activity of the novel peptide derivatives of 4-methyl-acridine*. 24th Polish peptide symposium, Jastrzębia Góra, 3-7 Wrzesień, 2017.

Praca została sfinansowana przez NCN w ramach grantu 2014/13/B/NZ7/02234

## 7. LITERATURA

- [1] J. Didkowska, U. Wojciechowska, P. Olasek, Nowotwory złośliwe w Polsce w 2015 roku. Ministerstwo zdrowia. Warszawa, **2017**, ISSN 0867-8251.
- [2] R. Duncan, M.J. Vicent, F. Greco, R.I. Nicholson, Polymer-drug conjugates: towards a novel approach for the treatment of endocrine-related cancer. *Endocr. Relat. Cancer*, **2005**, *12*, 189-199.
- [3] M. Gensicka-Kowalewska, G. Cholewiński, K. Dzierzbicka, Recent developments in the synthesis and biological activity of acridine/acridone analogues. *RSC Adv.*, **2017**, *7*, 15776-15804.
- [4] W. Sun, N. Zhou, Y. Xiao, S. Wang, X. Li, Novel carbazolyl-substituted spiro[acridine-9,9'-fluorene] derivatives as deep-blue emitting materials for OLED applications. *Dyes Pigments*, **2018**, *154*, 30-37.
- [5] G. Cholewiński, K. Dzierzbicka, A.M. Kołodziejczyk, Natural and synthetic acridines/acridones as antitumor agents: their biological activities and methods of synthesis. *Pharmacol. Rep.*, **2011**, *63*, 305-36.
- [6] A. Stankiewicz-Drogon, B. Dorner, T. Erker, A.M. Boguszewska-Chachulska, Synthesis of new acridone derivatives, inhibitors of NS3 helicase, which efficiently and specifically inhibitsubgenomic HCV replication. *J. Med. Chem.*, **2010**, *53*, 3117-3126.
- [7] P. Belmont, J. Bosson, T. Godet, M. Tiano, Acridine and acridone derivatives, anticancer properties and synthetic methods: where are we now? *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, **2007**, *7*, 139-169.
- [8] J. Jezek, J. Hlavacek, J. Sebestik, Biomedical applications of acridines. derivatives, syntheses, properties and biological activities with a focus on neurodegenerative diseases. Springer International Publishing AG, **2017**, ISBN 978-3-319-63952-9.
- [9] J. Sebestik, J. Hlavacek, I. Stibor, A role of the 9-aminoacridines and their conjugates in alife science. *Curr. Protein Pept. Sci.*, **2007**, *8*, 471-483.
- [10] A. Hernán-Gómez, E. Herd, M. Uzelac, T. Cadenbach, A.R. Kennedy, I. Borilovic, G. Aromí, E. Hevia, Zincate-mediated arylation reactions of acridine: pre- and postarylation structuralinsights. *Organometallics*, **2015**, *34*, 2614-2623.
- [11] Q. Su, P. Li, M. He, Q. Wu, L. Ye, Y. Mu, Facile synthesis of acridine derivatives by ZnCl<sub>2</sub>-promoted intramolecular cyclization of o-arylamino phenyl schiff bases. *Org. Lett.*, **2014**, *16*, 18-21.



- [12] J. Yu, H. Yang, Y. Jiang, H. Fu, Copper-catalyzed aerobic oxidative C-H and C-C functionalization of 1-[2-(arylamino)aryl]ethanones leading to acridone derivatives. *Chem. Eur. J.*, **2013**, *19*, 4271-4277.
- [13] X. Pang, Z. Lou, M. Li, L. Wen, Ch. Chen, Tandem arylation/friedel-crafts reactions of *o*-acylanilines with diaryliodonium salts: A modular synthesis of acridine derivatives. *Eur. J. Org. Chem.*, **2015**, 3361-3369.
- [14] M. Kaya, Y. Yildirim, G.Y. Celik, Synthesis, characterization, and *in vitro* antimicrobial and antifungal activity of novel acridines. *Pharm. Chem. J.*, **2015**, *48*, 722-726.
- [15] K.B. Ramesh, M.A. Pasha, Study on one-pot four-component synthesis of 9-aryl-hexahydroacridine-1,8-diones using SiO<sub>2</sub>-I as a new heterogeneous catalyst and their anticancer activity. *Bioorg. Med. Chem. Letters*, **2014**, *24*, 3907-3913.
- [16] I. Yesildag, R. Ulus, E. Basar, M. Aslan, M. Kaya, M. Bulbul, Facile, highly efficient, and clean one-pot synthesis of acridine sulfonamide derivatives at room temperature and their inhibition of human carbonic anhydrase isoenzymes. *Monatsh Chem.*, **2014**, *145*, 1027-1034.
- [17] K. Dzierzbicka, A.M. Kołodziejczyk, B. Wysocka-Skrzela, A. Myśliwski, D. Sosnowska, Synthesis and antitumor activity of conjugates of muramyl dipeptide, normuramyl dipeptide, and desmuramyl peptides with acridine/acridone derivatives. *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 3606-3615.
- [18] K. Dzierzbicka, P. Trzonkowski, P. Sewerynek, A. Myśliwski, Synthesis and cytotoxic activity of conjugates of muramyl and normuramyl dipeptides with batracylin derivatives. *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 978-986.
- [19] Z. Zhang, P. Chaltin, A. Aerschot, J. Lacey, J. Rozenski, R. Busson, P. Herdewijn, New dsDNA binding unnatural oligopeptides with pyrimidine selectivity. *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, *10*, 3401-3413.
- [20] A. Prah, Modifications in the bradykinin main chain are not necessary for antagonistic activity in rat blood pressure assay. *J. Pept. Sci.*, **2007**, *13*, 206-210.
- [21] T. Brider, Y. Gilad, G. Gellerman, A fast entry to the novel medicinally-important 9-anilinoacridine peptidyls by solid phase organic synthesis (SPOS). *Tetrahedron Lett.*, **2011**, *52*, 3640-3644.
- [22] J.E. Redman, J.M. Granadino-Roldan, J.A. Schouten, S. Ladame, A.P. Reszka, S. Neidle, S. Balasubramanian, Recognition and discrimination of DNA quadruplexes by acridine peptide conjugates. *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *7*, 76-84.
- [23] M. Kukowska-Kaszuba, K. Dzierzbicka, M. Serocki, A. Skladanowski, Solid phase synthesis and biological activity of tuftsin conjugates. *J. Med. Chem.*, **2011**, *54*, 2447-2454.

- [24] O. Salem, M. Vilkova, J. Plsikova, A. Grolmusova, M. Burikova, M., Prokaiova, H. Paulikova, J. Imrich, M, Kozurkova, DNA binding, anti-tumour activity and reactivity toward cell thiols of acridin-9-ylalkenoic derivatives. *J. Chem. Sci.*, **2015**, *127*, 931-940.
- [25] G. Gellerman, 9-Aminoacridine derivatives, their preparation and uses. **2011**, WO Patent App. PCT/IL2010/000,905
- [26] P. Singh, A. Kumar, A. Sharma, G. Kaur, Identification of amino acid appended acridines as potential leads to anti-cancer drugs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2015**, *25*, 3854-3858.
- [27] K. Dzierzbicka, A. Kawzowicz, A. Koc, M. Kukowska-Kaszuba, Pochodne akrydyny/akrydonu - synteza, aktywność biologiczna i zastosowanie kliniczne. *Wiad. Chem.*, **2009**, *63*, 1-2.
- [28] J. Zhang, Y. Chen, X. Chen, X. Zheng, W. Cao, J. Chen, M. Zhang, Synthesis and characterization of oxadisilole-fused acridines, dioxatrisilole-fused acridines and benzo[b]acridines. *Tetrahedron*, **2014**, *70*, 5820-5827.
- [29] K. Nowak, Chemical structures and biological activities of bis- and tetrakis-acridine derivatives: A review. *J. Mol. Struct.*, **2017**, *1146*, 562-570.
- [30] M.K. Gatasheh, S. Kannan, K. Hemalatha, N. Imrana. Proflavine an acridine DNA intercalating agent and strong antimicrobial possessing potential properties of carcinogen. *Karbala Int. J. Mod. Science*, **2017**, *3*, 272-278.
- [31] W.M. Cholody, S. Martelli, J. Paradziej-Lukowicz, J. Konopa, 5-[(Aminoalkyl)amino]-imidazo[4,5,1-de]acridin-6-ones as a novel class of antineoplastic agents. Synthesis and biological activity. *J. Med. Chem.*, **1990**, *33*, 49-52.
- [32] W.M. Cholody, S. Martelli, J. Konopa, Chromophore-modified anti-neoplastic imidazoacridinones. Synthesis and activity against murine leukemias. *J. Med. Chem.*, **1992**, *35*, 378-382.
- [33] W.M. Cholody, B. Horowska, J. Paradziej-Lukowicz, S. Martelli, J. Konopa, Structure-activity relationship for antineoplastic imidazoacridinones: synthesis and antileukemic activity *in vivo*. *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 1028-1032.
- [34] H. Kuśnierczyk, W.M. Chołody, J. Paradziej-Lukowicz, C. Radzikowski, J. Konopa, Experimental antitumor activity and toxicity of the selected triazolo- and imidazoacridinones. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, **1994**, *42*, 415-423.
- [35] A. Dopierała, P. Wrosz, A. Mazerski, Akrydyny jako związki aktywne przeciwnowotworowo. *Post. Hig. Med. Dosw.*, **2011**, *65*, 263-269.
- [36] B. Aday, R. Ulus, M. Tanc, M. Kaya, C.T. Supuran. Synthesis of novel 5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide containing acridinesulfonamide/carboxamide compounds and

investigation of their inhibition effects on human carbonic anhydrase I, II, IV and VII. *Bioorg. Chem.*, **2018**, *77*, 101-105.

[37] P.H. Arato Ferreira, D.A. Dos Santos, M.F. da Silva, P.C. Vieira, B. King-Diaz, B. Lotina-Hennsen, T.A. Veiga, Acridone alkaloids from *swingleaglutinosa* (rutaceae) and their effects on photosynthesis. *Chem. Biodivers.*, **2016**, *13*, 100-106.

[38] R.E. Becker, N.H. Greig, E. Giacobini, L.S. Schneider, L. Ferrucci, A new roadmap for drug development for Alzheimer's disease. *Naure Rev. Drug Discov.*, **2014**, *13*, 156-158.

[39] P. Francotte, E. Graindorge, S. Boverie, P. de Tullio, B. Pirotte, New trends in the design of drugs against Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.*, **2004**, *11*, 1757-1778.

[40] M.I. Rodriguez-Franco, M.I. Fernandez-Bachiller, C. Perez, B. Hernandez-Ledesma, B. Bartolome, Novel tacrine-melatonin hybrids as dual-acting drugs for Alzheimer disease, with improved acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties. *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 459-462.

[41] S. Hamulakova, J. Imrich, L. Janovec, P. Kristian, I. Danihel, O. Holas, M. Pohanka, S. Bohm, M. Kozurkova, K. Kuca, Novel tacrine/acridine anticholinesterase inhibitors with piperazine and thiourea linkers. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2014**, *70*, 435-439.

[42] S. Hamulakova, L. Janovec, O. Soukup, D. Jun, K. Kuca. Synthesis, in vitro acetylcholinesterase inhibitory activity and molecular docking of new acridine-coumarin hybrids. *Inter. J. Biol. Macromol.*, **2017**, *104*, 333-338.

[43] M. Mohammadi-Khanaposhtani, M. Saeedi, N.S. Zafarghandi, M. Mahdavi, R. Sabourian, E.K. Razkenari, H. Alinezhad, M. Khanavi, A. Foroumadi, A. Shafiee, T. Akbarzadeh, Potent acetylcholinesterase inhibitors: design, synthesis, biological evaluation, and docking study of acridone linked to 1,2,3-triazole derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, **2015**, *92*, 799-806.

[44] M. Mohammadi-Khanaposhtani, M. Mahdavi, M. Saeedi, R. Sabourian, M. Safavi, M. Khanavi, A. Foroumadi, A. Shafiee, T. Akbarzadeh, Design, Synthesis, Biological evaluation, and docking study of acetylcholinesterase inhibitors: New acridone-1,2,4-oxadiazole-1,2,3-triazole hybrids. *Chem. Biol. Drug Des.*, **2015**, *86*, 1425-1432.

[45] M. Demeunynck, F. Charmantray, A. Martelli, Interest of acridine derivatives in the anticancer chemotherapy. *Curr. Pharm. Des.*, **2001**, *7*, 1703-1724.

[46] S. Dana, Prusty, D. Dhayal, M.K. Gupta, A. Dar, S. Sen, P. Mukhopadhyay, T. Adak, S.K. Dhar, Potent antimalarial activity of acriflavine *in vitro* and *in vivo*. *ACS Chem. Biol.*, **2014**, *9*, 2366-2373.

[47] R. Kumar, M. Kaur, O. Silakari, Chemistry and biological activities of thioacridines/thioacridones. *Mini Rev. Med. Chem.*, **2013**, *13*, 1220-1230.

- [48] B. Zhang, X. Li, B. Li, C.M. Gao, Y.Y. Jiang, Acridine and its derivatives: a patent review (2009–2013). *Expert Opin. Ther. Patents*, **2014**, *24*, 647-664.
- [49] A. Saravanamuthu, T.J. Vickers, C.S. Bond, M.R. Peterson, W.N. Hunter, A.H. Fairlamb, Two interacting binding sites for quinacrine derivatives in the active site of trypanothione reductase: a template for drug design. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 29493–29500.
- [50] J.P. Joubert, F.J. Smit, L. du Plessis, P.J. Smith, D.D. N'Da, Synthesis and *in vitro* biological evaluation of aminoacridines and artemisinin-acridine hybrids. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2014**, *56*, 16-27.
- [51] S.P. Prajapati, N.K. Kaushik, M. Zaveri, D. Mohanakrishanan, N. Kawathekar, D. Sahal, Synthesis, characterization and antimalarial evaluation of new b-benzoylstyrene derivatives of acridine. *Arabian J. Chem.*, **2017**, *10*, 274-280.
- [52] B. Medapi, N. Meda, P. Kulkarni, P. Yogeewari, D. Sriram, Development of acridine derivatives as selective Mycobacterium tuberculosis DNA gyrase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, **2016**, *24*, 877-885.
- [53] G.C. Muscia, G.Y. Buldain, S.E. Asis, Design, synthesis and evaluation of acridine and fused-quinoline derivatives as potential anti-tuberculosis agents. *Europ. J. Med. Chem.*, **2014**, *73*, 243-249.
- [54] J. Palaniraja, S.S. Kumar, S. Ramki, P. Arunachalam, S.M. Roopan, Conventional spectroscopic identification of biologically active imidazo-pyrimido fused acridines: *In vitro* anti-bacterial and anti-feedant activity. *J. Mol. Liquids*, **2017**, *230*, 634-640.
- [55] Y.D. Markovich, T.N. Kudryavtseva, K.V. Bogatyrev, P.I. Sysoev, a L.G. Klimova, G.V. Nazarov, Synthesis of 2-(4-methyl-1,3-thiazol-5-yl)ethyl esters of acridone carboxylic acids and evaluation of their antibacterial activity. *Russian Chem. Bulletin*, **2014**, *63*, 1153-1158.
- [56] A. Souibgui, A. Gaucher, J. Marrot, F. Bourdreux, F. Aloui, B.B. Hassine, D. Prim, New series of acridines and phenanthrolines: synthesis and characterization. *Tetrahedron*, **2014**, *70*, 3042-3048.
- [57] C.H. Chen, Y.W. Lin, X.G. Zhang, T.C. Chou, T.J. Tsai, N. Kapuriya, R. Kakadiya, T.L. Su, Synthesis and *in vitro* cytotoxicity of 9-anilinoacridines bearing *N*-mustard residue on both anilino and acridine rings. *Eur. J. Med. Chem.*, **2009**, *44*, 3056-3059.
- [58] X.D. Luan, C.M. Gao, N.N. Zhang, Y. Chen, Q. Sun, C. Tan, H. Liu, Y. Jin, Y. Jiang, Exploration of acridine scaffold as a potentially interesting scaffold for discovering novel multi-target VEGFR-2 and Src kinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, **2011**, *19*, 3312-3319.

- [59] Ch. Gao, B. Li, B. Zhang, Q. Sun, L. Li, X. Li, Ch. Chen, Ch. Tan, H. Liu, Y. Jiang, Synthesis and biological evaluation of benzimidazoleacridine derivatives as potential DNA-binding and apoptosis-inducing agents. *Bioorg. Med. Chem.*, **2015**, *23*, 1800-1807.
- [60] B. Li, Ch.M. Gao, Q.S. Sun, L.L. Li, Ch.Y. Tan, H.X. Liu, Y.Y. Jiang, Novel synthetic acridine-based derivatives as topoisomerase I inhibitors. *Chinese Chem. Lett.*, **2014**, *25*, 1021-1024.
- [61] B. Borowa-Mazgaj, A. Mróz, E. Augustin, E. Paluszkiewicz, Z. Mazerska, The overexpression of CPR and P450 3A4 in pancreatic cancer cells changes the metabolic profile and increases the cytotoxicity and proapoptotic activity of acridine antitumor agent, C-1748. *Biochem. Pharm.*, **2017**, *142*, 21-38.
- [62] Z. Yuan, S. Chen, Ch. Chen, J. Chen, Ch. Chen, Q. Dai, Ch. Gao, Y. Jiang, Design, synthesis and biological evaluation of 4-amidobenzimidazole acridine derivatives as dual PARP and Topo inhibitors for cancer therapy. *Europ. J. Med. Chem.*, **2017**, *138*, 1135-1146.
- [63] R. Kumar, A. Sharma, S. Sharma, O. Silakari, M. Singh, M. Kaur, Synthesis, characterization and antitumor activity of 2-methyl-9-substituted acridines. *Arabian J. Chem.*, **2017**, *10*, 956-963.
- [64] Q. Zhou, Ch. You, C. Zheng, Y. Gu, H. Gu, R. Zhang, H. Wu, B. Sun, 3-Nitroacridine derivatives arrest cell cycle at G0/G1 phase and induce apoptosis in human breast cancer cells may act as DNA-target anticancer agents. *Life Sciences*, **2018**, *206*, 1-9.
- [65] S. Roe, M. Gunaratnam, C. Spiteri, P. Sharma, R.D. Alharthy, S. Neidle, J.E. Moses, Synthesis and biological evaluation of hybrid acridine-HSP90 ligand conjugates as telomerase inhibitors. *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 8500-8504.
- [66] V. Calvillo-Paez, R.R. Sotelo-Mundo, M. Leyva-Peralta, J.C. Galvez-Ruiz, D. Corona-Martinez, R. Moreno-Corral, R. Escobar-Picos, H. Hopfl, O. Juarez-Sanchez, K.O. Lara, Synthesis, spectroscopic, physicochemical and structural characterization of tetrandrine-based macrocycles functionalized with acridine and anthracene groups: DNA binding and anti-proliferative activity. *Chem. Biol. Interactions*, **2018**, *286*, 34-44.
- [67] S. Arya, A. Kumar, N. Kumar, P. Roy, S. M. Sondhi, Synthesis and anticancer activity evaluation of some acridine derivatives. *Med. Chem. Res.*, **2015**, *24*, 1942-1951.
- [68] B. Zhang, K. Chen, N. Wang, Ch. Gao, Q. Sun, L. Li, Y. Chen, Ch. Tan, H. Liu, Y. Jiang, Molecular design, synthesis and biological research of novel pyridylacridones as potent DNA-binding and apoptosis-inducing agents. *Europ. J. Med. Chem.*, **2015**, *93*, 214-226.

- [69] Ch. Gao, W. Zhang, S. He, S. Li, F. Liu, Y. Jiang, Synthesis and antiproliferative activity of 2,7-diamino-10-(3,5-dimethoxy)benzyl-9(10*H*)-acridone derivatives as potent telomeric G-quadruplex DNA ligands. *Bioorg. Chem.*, **2015**, *60*, 30-36.
- [70] V.V.R. Prasad, G.D. Reddy, I. Kathmann, M. Amarewararao, G.J. Peters, Nitric oxide releasing acridone carboxamide derivatives as reverters of doxorubicin resistance in MCF7/Dx cancer cells. *Bioorg. Chem.*, **2016**, *64*, 51-58.
- [71] M. Mohammadi-Khanaposhtani, M. Safavi, R. Sabourian, M. Mahdavi, M. Pordeli, Mina Saeedi, S.K. Ardestani, A. Foroumadi, A. Shafiee, T. Akbarzadeh, Design, synthesis, *in vitro* cytotoxic activity evaluation, and apoptosis-induction study of new 9(10*H*)-acridinone-1,2,3-triazoles. *Mol. Diversity*, **2015**, *19*, 787-795.
- [72] M. Mohammadi-Khanaposhtani, S. Rezaei, R. Khalifeh, S. Imanparast, M.A. Faramarzi, S. Bahadorikhalili, M. Safavi, F. Bandarian, E.N. Esfahani, M. Mahdavi, B. Larijani, Design, synthesis, docking study,  $\alpha$ -glucosidase inhibition, and cytotoxic activities of acridine linked to thioacetamides as novel agents in treatment of type 2 diabetes. *Bioorg. Chem.*, **2018**, *80*, 288-295.
- [73] R. Kumar, M.S. Bahia, O. Silakari, Synthesis, cytotoxic activity, and computational analysis of *N*10-substituted acridone analogs. *Med. Chem. Res.*, **2015**, *24*, 921-933.
- [74] R. Kumar, M. Kaur, M. S. Bahia, O. Silakari, Synthesis, cytotoxic study and docking based multidrug resistance modulator potential analysis of 2-(9-oxoacridin-10(9*H*)-yl)-*N*-phenyl acetamides. *Eur. J. Med. Chem.*, **2014**, *80*, 83-91.
- [75] I.Z. Siemion, A. Kluczyk, Tuftsin: on the 30-year anniversary of Victor Najjar's discovery, *Pept.*, **1999**, *20*, 645-674.
- [76] A. Wardowska, K. Dzierzbicka, P. Trzonkowski, A. Myśliwski, Immunomodulatory properties of new conjugates of muramyl dipeptide and nor-muramyl dipeptide with retro-tuftsin (Arg-Pro-Lys-Thr-OMe), *Int. Immunopharm.*, **2006**, *6*, 1560-1568.
- [77] K. Dzierzbicka, P. Trzonkowski, P. Sewerynek, A.M. Kołodziejczyk, A. Myśliwski, Synthesis and biological activity of tuftsin, its analogue and conjugates containing muramyl dipeptides or nor-muramyl dipeptides, *J. Pept. Sci.*, **2005**, *11*, 123-135.
- [78] A. Siebert, M. Gensicka-Kowalewska, G. Cholewiński, K. Dzierzbicka, Tuftsin - properties and analogs. *Curr. Med. Chem.*, **2017**, *24*, 3711-3727.
- [79] M. Wu, J.C. Nissen, E.I. Chen, S.E. Tsirka, Tuftsin promotes an anti-inflammatory switch and attenuates symptoms in experimental autoimmune encephalomyelitis, *Plos one*, **2012**, *7*, 1-13.

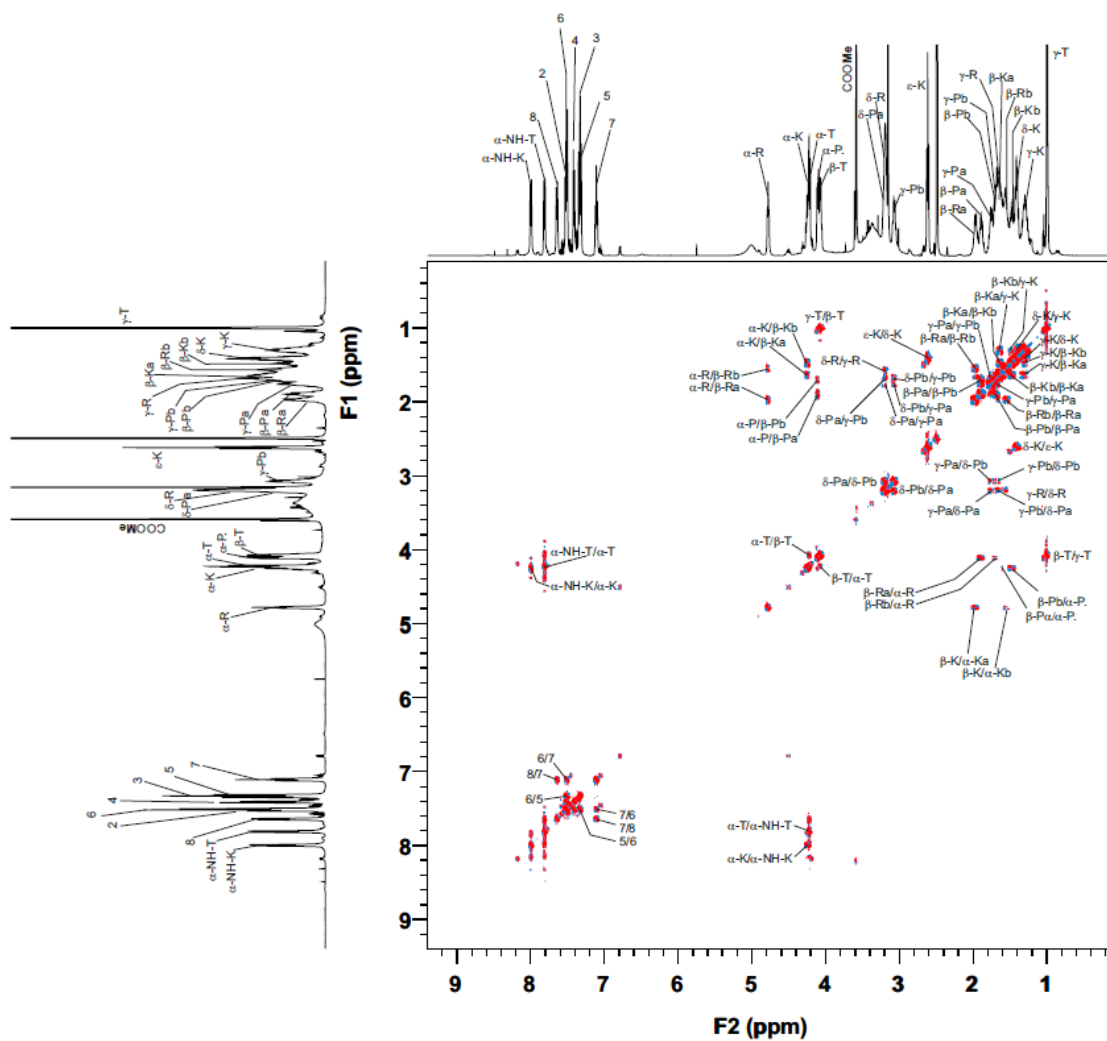
- [80] E. Raibon, Y. Sauve, D.A. Carter, F. Gaillard, Microglial changes accompanying the promotion of retinal ganglion cell axonal regeneration into peripheral nerve grafts. *J. Neurocytol.*, **2002**, *31*, 57-71.
- [81] J. Wang, A.D. Rogove, A.E. Tsirka, Protective role of tuftsin fragment 1-3 in an animal model of intracerebral hemorrhage, *Ann. Neurol.*, **2003**, *54*, 655-664.
- [82] N. Haspel, D. Zanuy, R. Nussinov, T. Teesalu, E. Ruoslahti, C. Aleman, Binding of a C-terminal peptide to the neuropilin-1 receptor: a molecular modeling approach. *Biochem.*, **2011**, *50*, 1755-1762.
- [83] J.C. Nissen, D.L. Selwood, S.E. Tsirka, Tuftsin signal through its receptor neuropilin-1 via the transforming growth factor beta pathway, *J. Neurochem.*, **2013**, *127*, 394-402.
- [84] M. von Wronski, N. Raju, R. Pillai, N.J. Bogdan, E.R. Marinelli, P. Nanjappan, K. Ramalingam, T. Arunachalam, S. Eaton, K.E. Linder, F. Yan, S. Pochon, M.F. Tweedle, A.D. Nunn, Tuftsin binds neuropilin-1 through a sequence similar to that encoded by exon 8 of vascular endothelial growth factor, *J. Biol. Chem.*, **2006**, *281*, 5702-5710.
- [85] W.J. Liu, X.J. Liu, L. Li, Y. Li, S.H. Zhang, Y.S. Zhen, Tuftsin based, EGFR-targeted fusion protein and its enediyne-energized analog show high antitumor efficacy associated with CD47 down regulation, *Cancer Immunol. Immun.*, **2014**, *63*, 1261-1272.
- [86] D. Leo, J. Ma, Enhancement of anti-idiotypic immune response by tuftsin in single-chain Fv-tuftsin fusion protein. *Biotechnol. Lett.*, **2000**, *22*, 1925-1927.
- [87] G. Mezo, A. Kalaszi, J. Remenyi, Z. Majer, A. Hilbert, O. Lang, L. Kohidai, K. Barna, D. Gaal, F. Hudecz, Synthesis, conformation, and immunoreactivity of new carrier molecules based on repeated tuftsin-like sequence. *Biopolymers*, **2004**, *73*, 646-656.
- [88] M.A. Khan, A. Aljarbou, A. Khan, M. Owais, Immune stimulating and therapeutic potential of tuftsin-incorporated nystatin liposomes against *Cryptococcus neoformans* in leukopenic BALB/C mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **2012**, *66*, 88-87.
- [89] C.M. Gupta, W. Haq, Tuftsin-bearing liposomes as antibiotic carriers in treatment of macrophage infections. *Methods Enzymol.*, **2005**, *391*, 291-301.
- [90] A.K. Agrawal, A. Agrawal, A. Pal, P.Y. Guru, C.M. Gupta, Superior chemotherapeutic efficacy of amphotericin B in tuftsin-bearing liposomes against *Leishmania donovani* infections in hamsters. *J. Drug Target.*, **2002**, *10*, 41-45.
- [91] F. Trevisani, E. Castelli, F.G. Foschi, M. Parazza, E. Loggi, M. Betelli, C. Melotti, M. Domenicali, G. Zoli, M. Bernardi, Impaired tuftsin activity in cirrhosis: relationship with splenic function and clinical outcome. *Gut.*, **2002**, *50*, 707-712.

- [92] T.S. Pavlov, G.E. Samonina, A new property of endogenous immunostimulator tuftsin. *B. Exp. Biol. Med.*, **2004**, *138*, 163-164.
- [93] K. Saravanabava, K. Nachimuthu, V.D. Padmanaban, Effect of tuftsin on embryo vaccination with Newcastle disease virus vaccine. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, **2005**, *28*, 269-276.
- [94] M.M. Kozlovskaya, H. Kozlovskii, E.A. Valdman, S.B. Sereidenin, Selank and short peptides of the tuftsin Family in the regulation of adaptive behavior in stress. *Neurosci. Behav. Physiol.*, **2003**, *33*, 853-860.
- [95] M.Z. Siddiqui, A.K. Sharma, S. Kumar, Solution conformation of tuftsin. *Int. J. Biological. Micromolecules*, **1996**, *19*, 99-102.
- [96] Z. Wang, *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*, **2010**. ISBN: 978-0-471-70450-8.
- [97] A. Ledóchowski, W. Gruszecki, B. Stefańska, B. Horowska, Sposób rozdzielania izomerycznych 1- i 3- podstawionych pochodnych 9-chloroakrydyny. *Polski Patent*, **1970**, 60794.
- [98] A.B. Hughes, *Amino acids, peptides and proteins in organic chemistry. Volume 3 Building blocks, catalysis and coupling chemistry*, **2010**. ISBN: 978-3-527-32102-5.
- [99] S. Hanessian, R. Margarita, 1,3-Asymmetric induction in dianionic allylation reactions of amino acid derivatives-synthesis of functionally useful enantiopure glutamates, pipercolates and pyroglutamates. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 5887-5890.
- [100] J. Weyermann, D. Lochmann, A. Zimmer, A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int. J. Pharm.*, **2005**, *288*, 369-376.
- [101] K. Dzitko, D. Dudzinska, M. Grzybowski, H. Długoska, The utility of MTT and XTT colorimetric tests in the studies conducted *in vitro* with *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Wiad. parazytol.*, **2010**, *56*, 145-152.
- [102] A. Bomirski, A. Słomiński, J. Bigda, The natural history of a family of transplantable melanomas in hamsters. *Cancer Metastasis Rev.*, **1988**, *7*, 95-118.
- [103] A. Kołakowska, P. Godzik, K. Madaliński, Metody badania potencjalnych inhibitorów wirusa zapalenia wątroby typu C w linii komórkowej Huh-7.5. *Med. Dośw. Mikrobiol.*, **2013**, *65*, 275-283.
- [104] Z. Józwiak, Z. Marczak, Rola kanałów jonowych w procesie apoptozy. *Postępy Bioch.*, **2006**, *5*, 373-382.
- [105] Y. Shi, Caspase activation, inhibition, and reactivation: A mechanistic view. *Protein Sci.*, **2004**, *13*, 1979-1987.

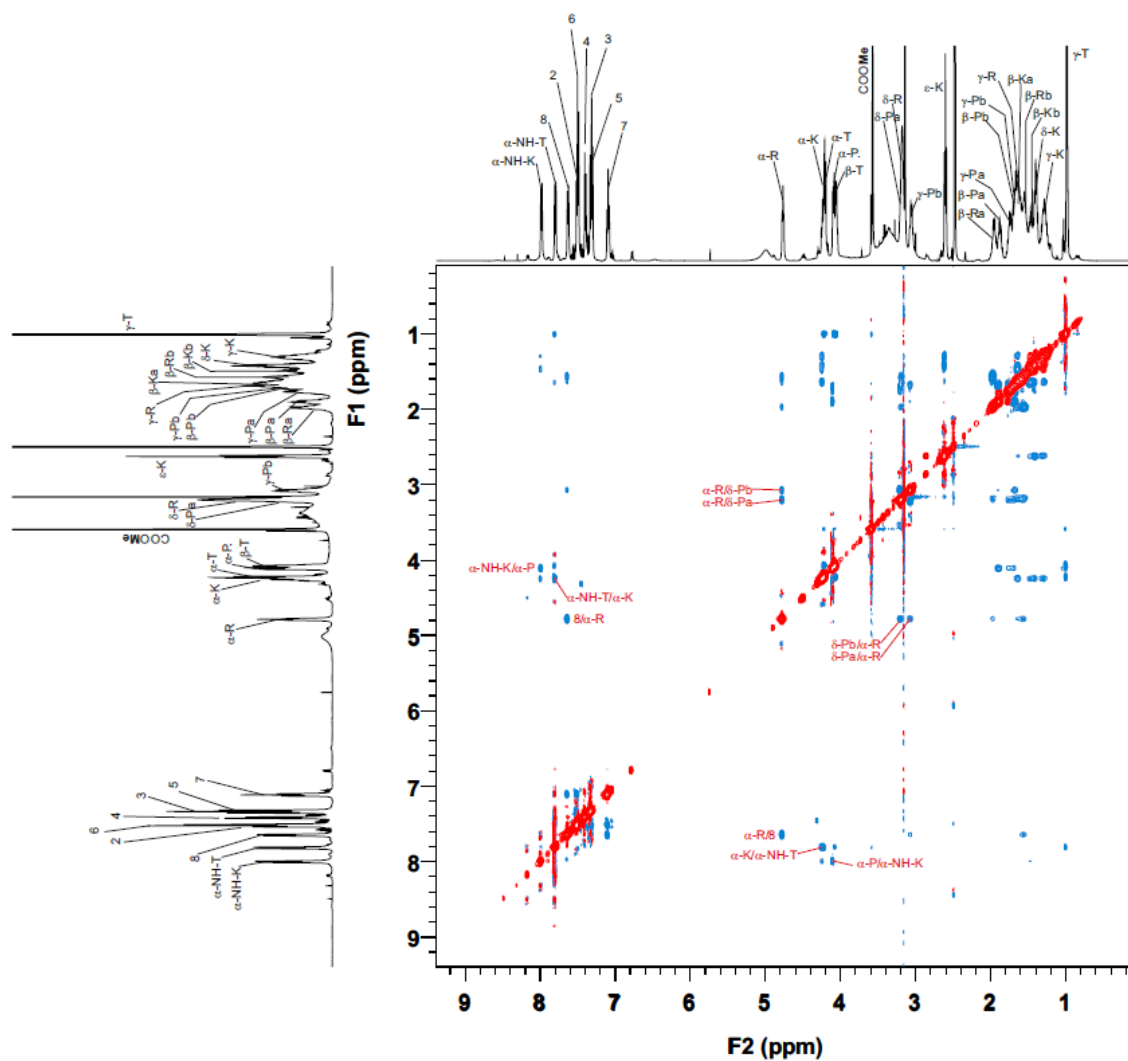


- [106] P.S. Sukhramani, P.S. Sukhramani, S.R. Tirthani, S.A. Desai, M.P. Suthar, Biological cytotoxicity evaluation of spiro[azetidine-2',3'-indole]-2',4'(1*H*)dione derivatives for anti-lung and anti-breast cancer activity. *Der Pharm. Lettre*, **2011**, 3, 236-243.
- [106] J. Konopa, B. Wysocka-Skrzela, R.K. Tiwari, 9-Alkiloamino-1-nitroacridine derivatives, U.S. *Patent*, **2003**, 6,589,961 B2.
- [107] Z.B. Wysocka-Skrzela, A. Ledóchowski, G. Weltrowska, Cz. Radzikowski, Sposób otrzymywania aminokwasowych pochodnych 1-nitroakrydyny lub ich soli. *Patent Polski*, **1983**, 119667.
- [108] H.B. Nisbet, The Reactivity of Groups in Substituted Acridones. Part II-Cationoid Activity at Position 4 in Acridones. *J. Chem. Soc.*, **1933**, 1372-1373.
- [109] D.B. Capps, J. Dunbar, S.R. Kesten, J. Shallis, L.M. Werbel, J. Plowman, D.L. Ward, 2-(aminoalkyl)-5-nitropyrazolo[3,4,5-kl]acridines, a new class of anticancer agents. *J. Med. Chem.*, **1992**, 35, 4770.
- [110] [www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/134570?lang=pl&region=PL](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/134570?lang=pl&region=PL)
- [111] M. Cichorek, K. Kozłowska, E. Bryl, E. The activity of caspases in spontaneous and camptothecin-induced death of melanotic and amelanotic melanoma cells. *Cancer Biol. Ther.*, **2007**, 6, 346-353.
- [112] H. Bielarczyk, A. Jankowska, B. Madziar, A. Matecki, A. Michno, A. Szutowicz, Differential toxicity of nitric oxide, aluminum, and amyloid  $\beta$ -peptide in SN56 cholinergic cells from mouse septum. *Neurochem. Int.*, **2003**, 42, 323-331.

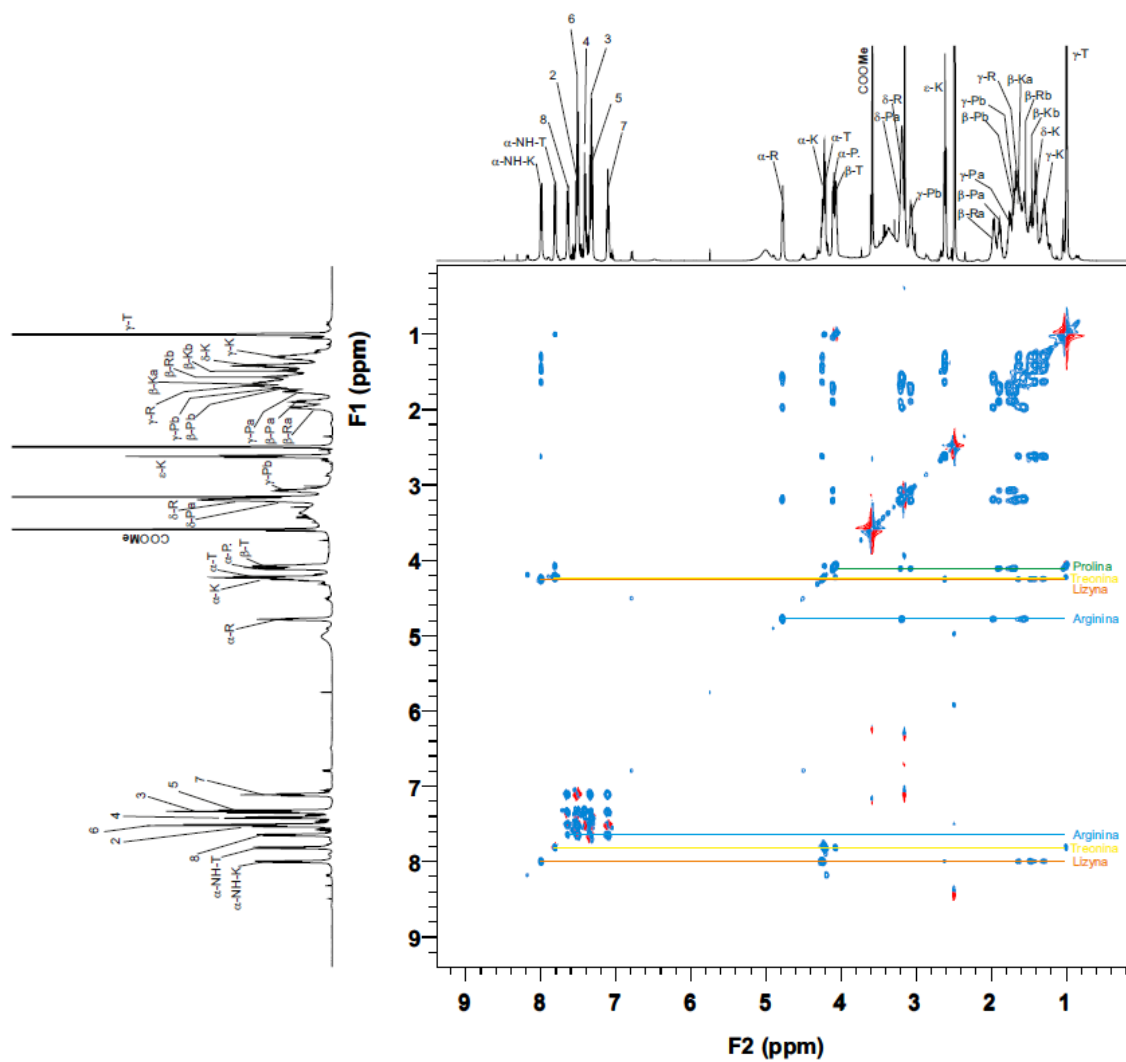
# Załącznik 1. Widmo DQF-COSY związku (117)



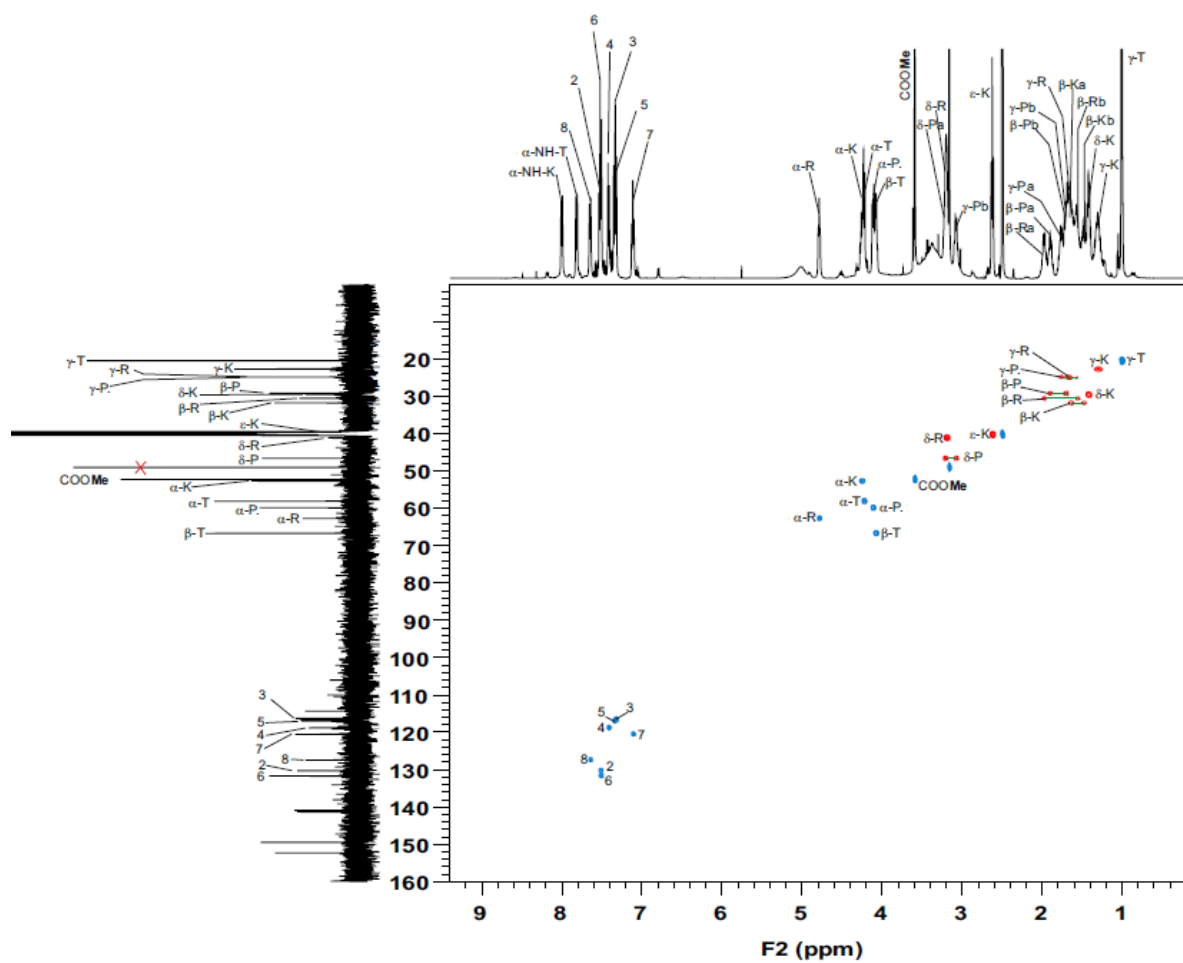
## Załącznik 2. Widmo ROESY związku (117)



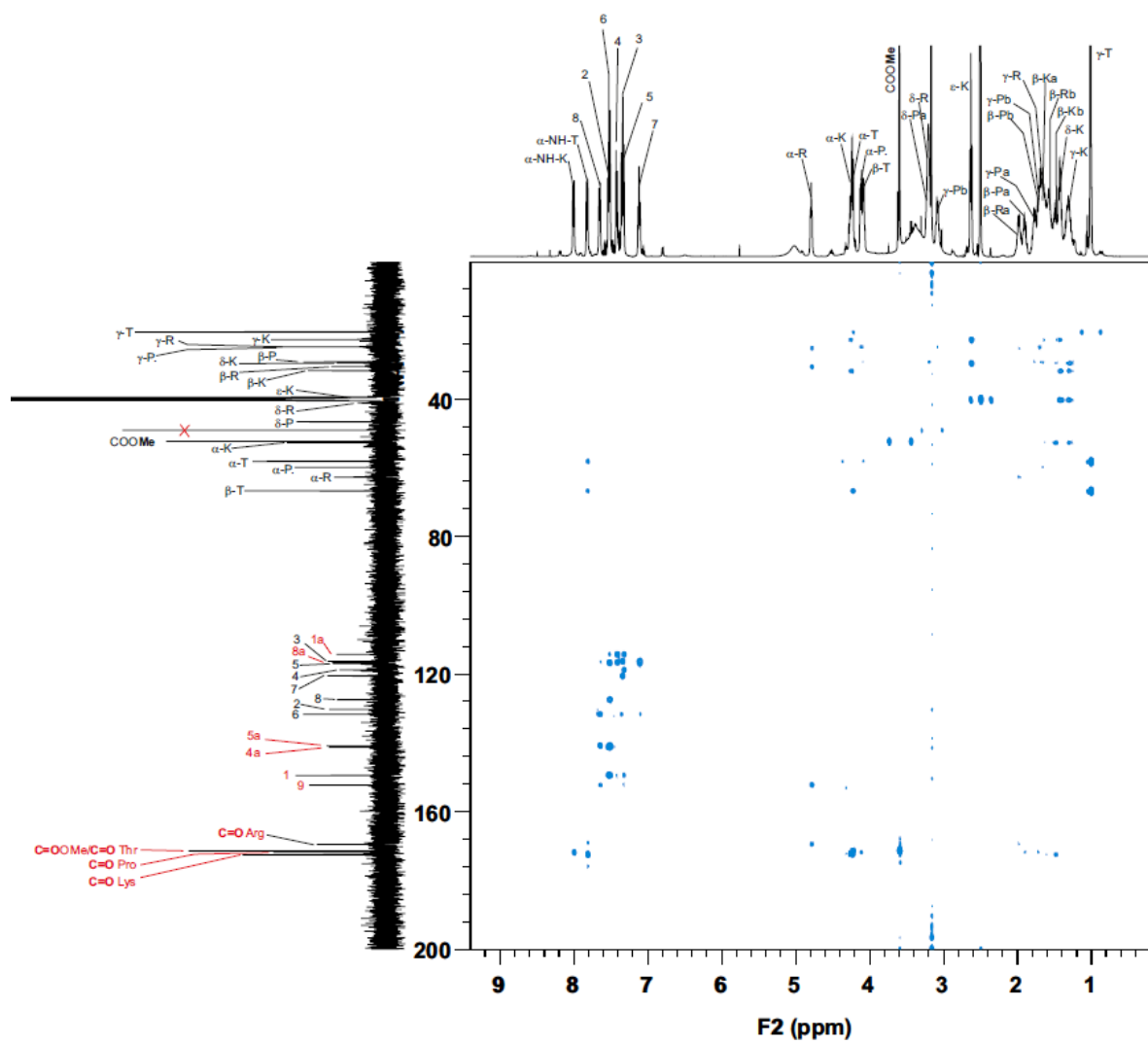
### Załącznik 3. Widmo TOCSY związku (117)



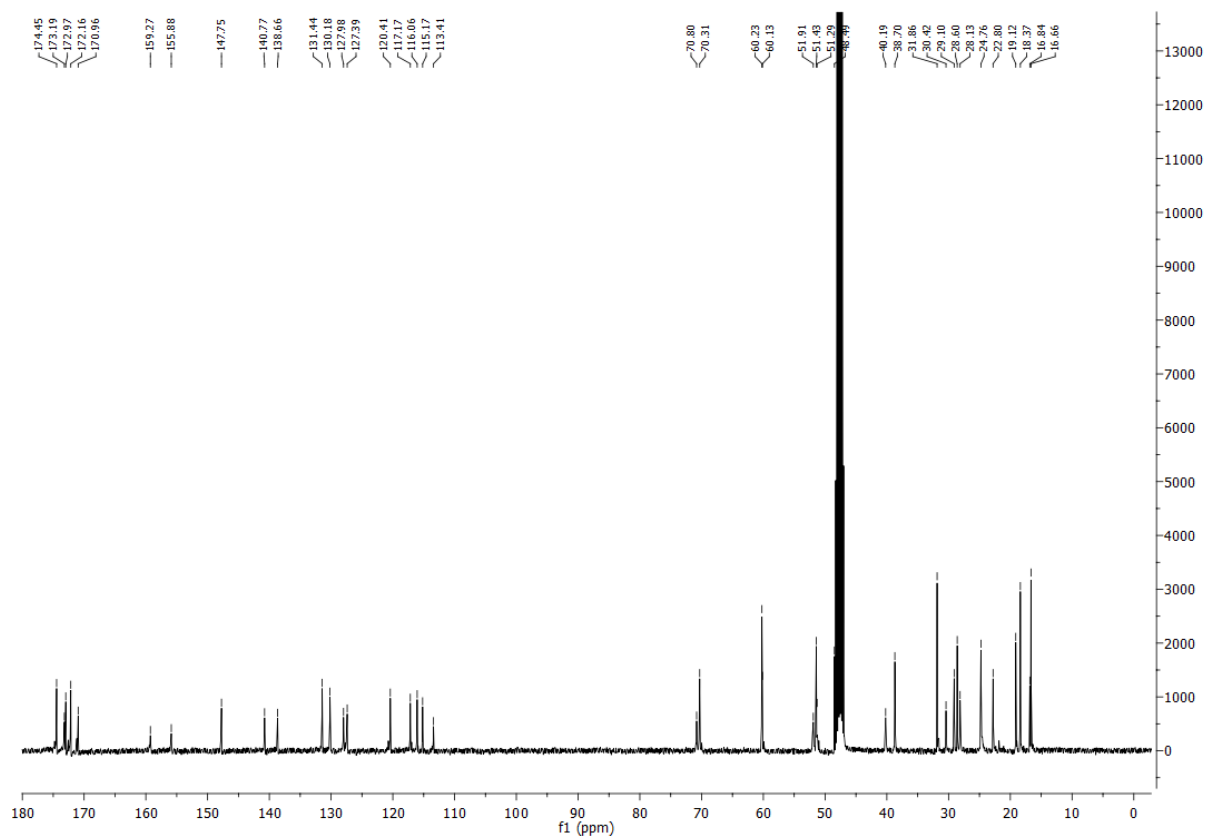
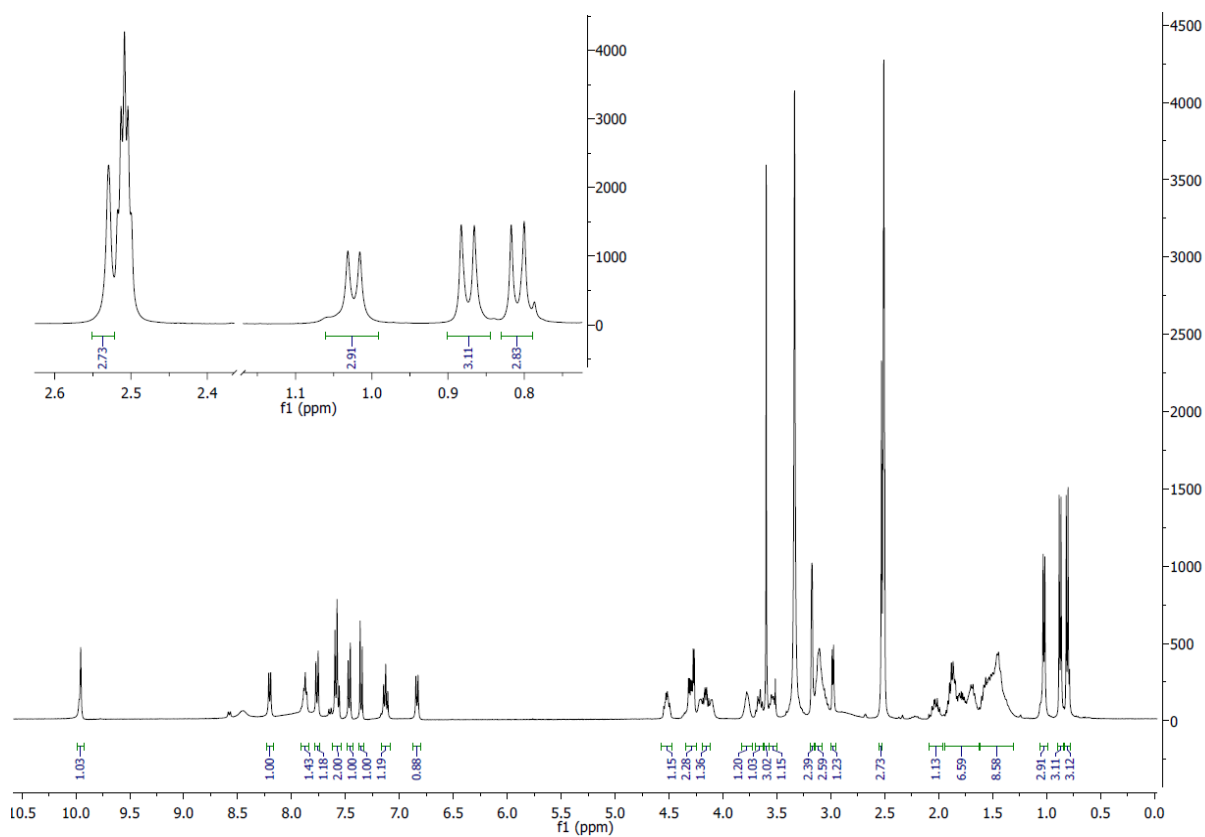
### Załącznik 4. Widmo HSQC związku (117)



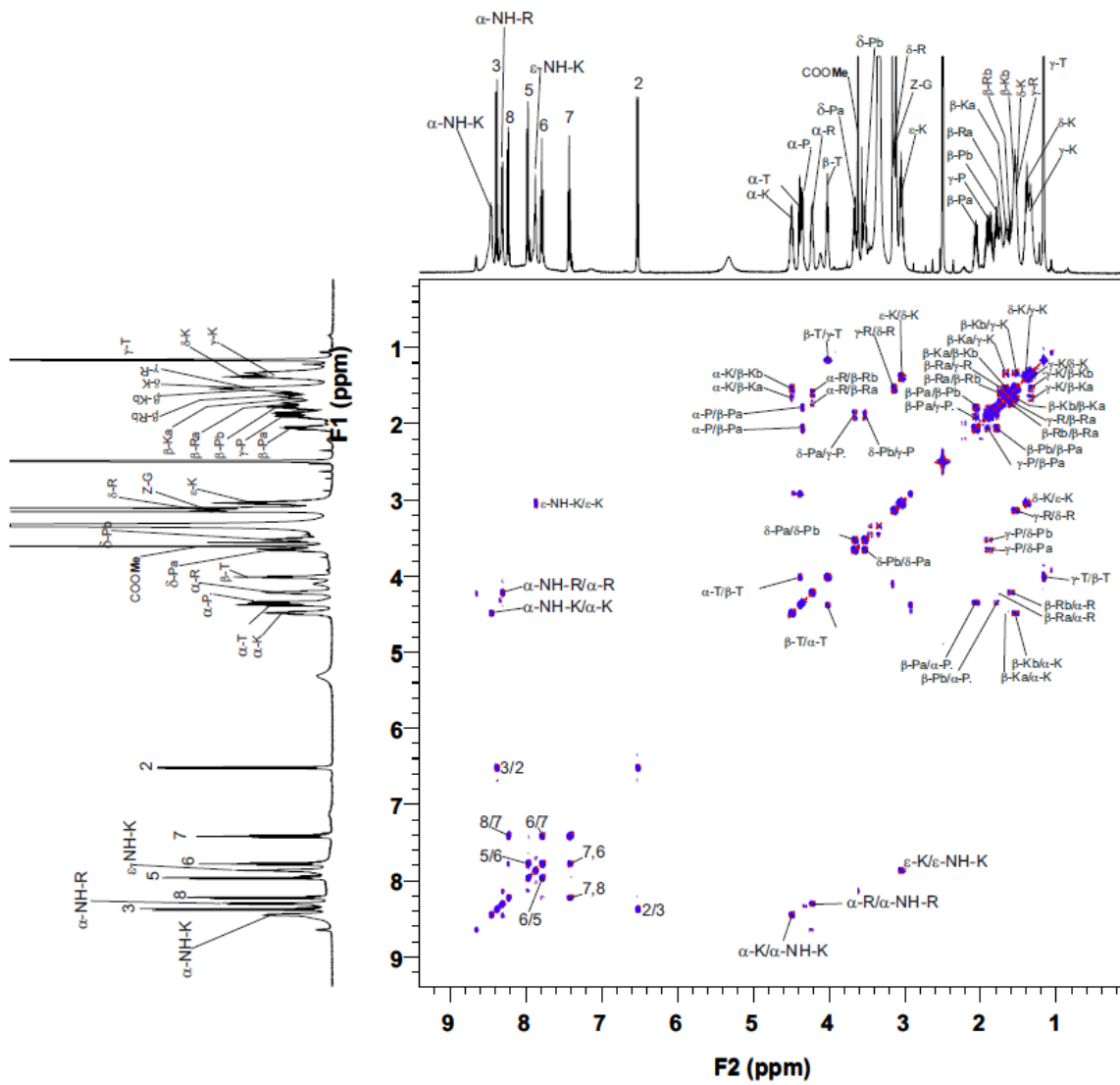
## Załącznik 5. Widmo HMBC związku (117)



Załącznik 6. Widmo  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR związku (116d)

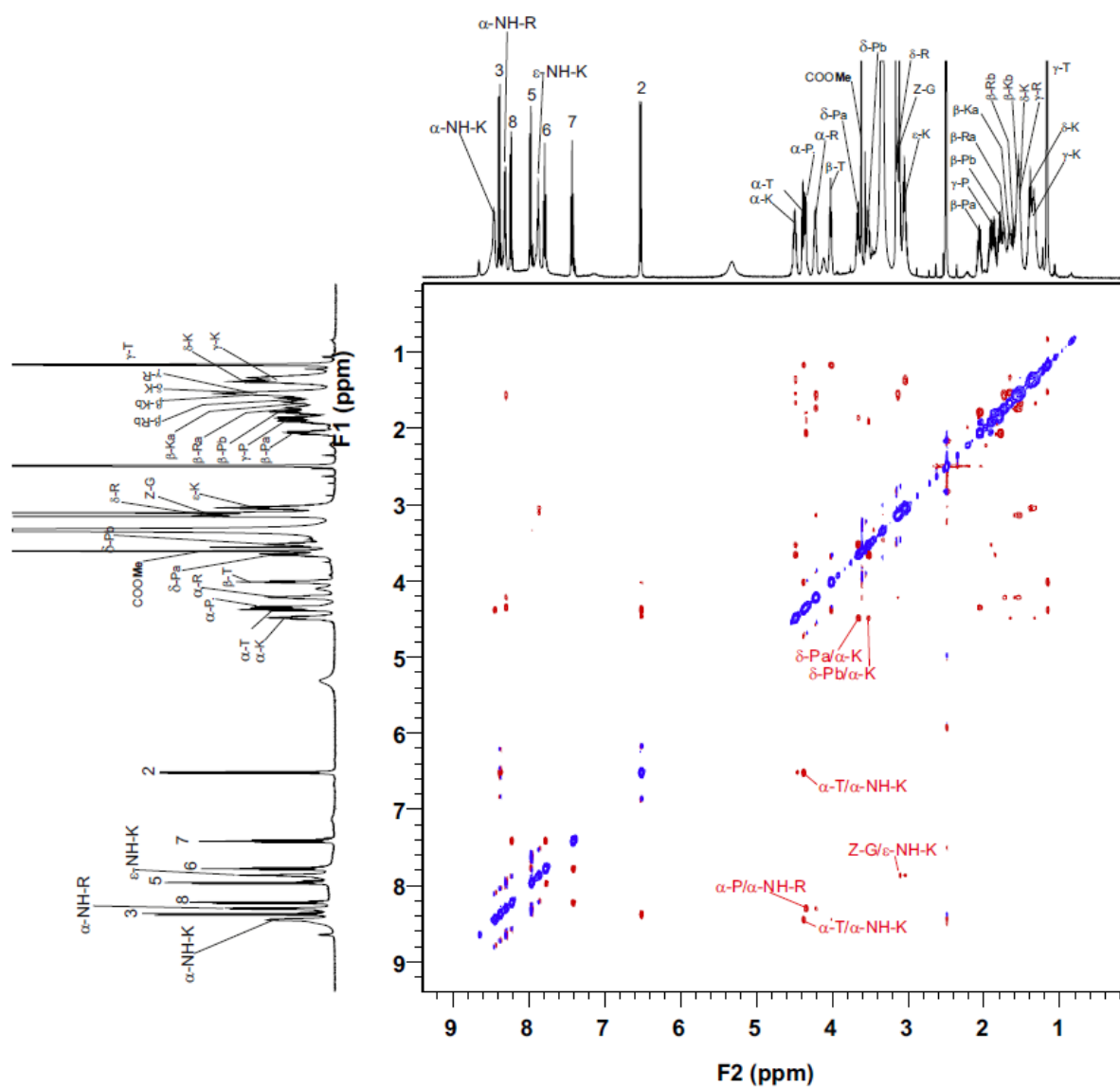


Załącznik 7. Widmo DQF-COSY związku (119b)

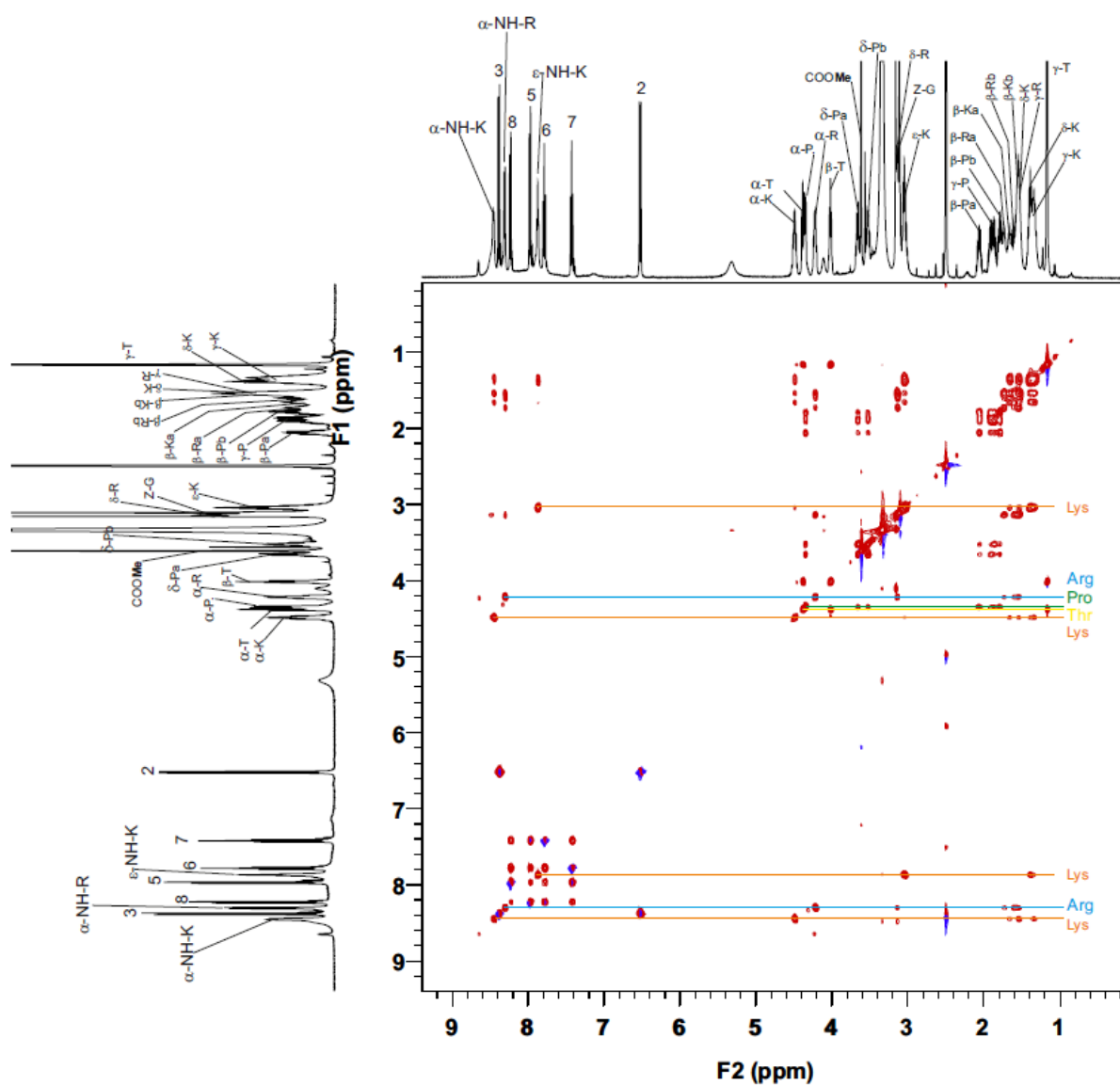




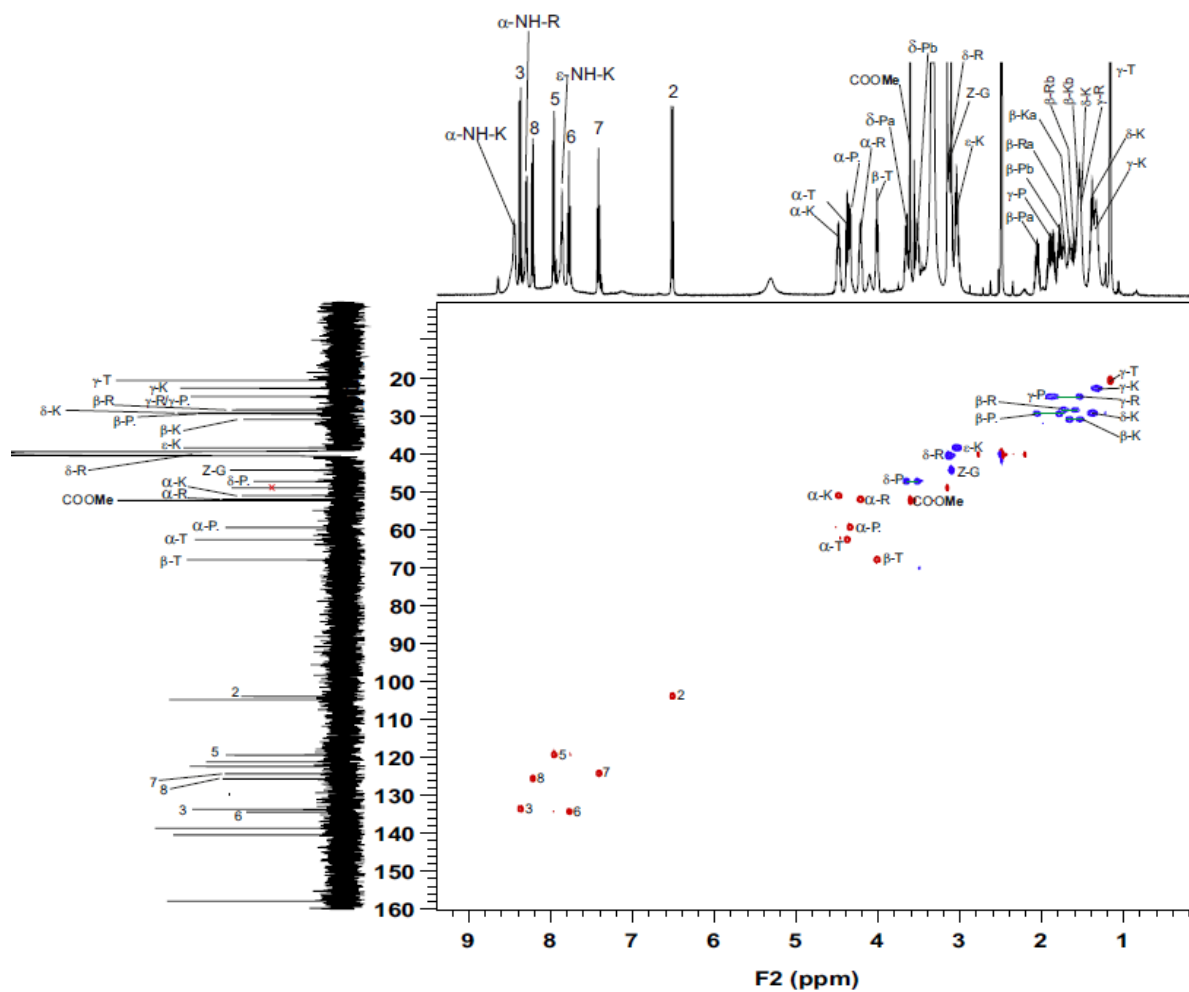
**Załącznik 8. Widmo ROESY związku (119b)**



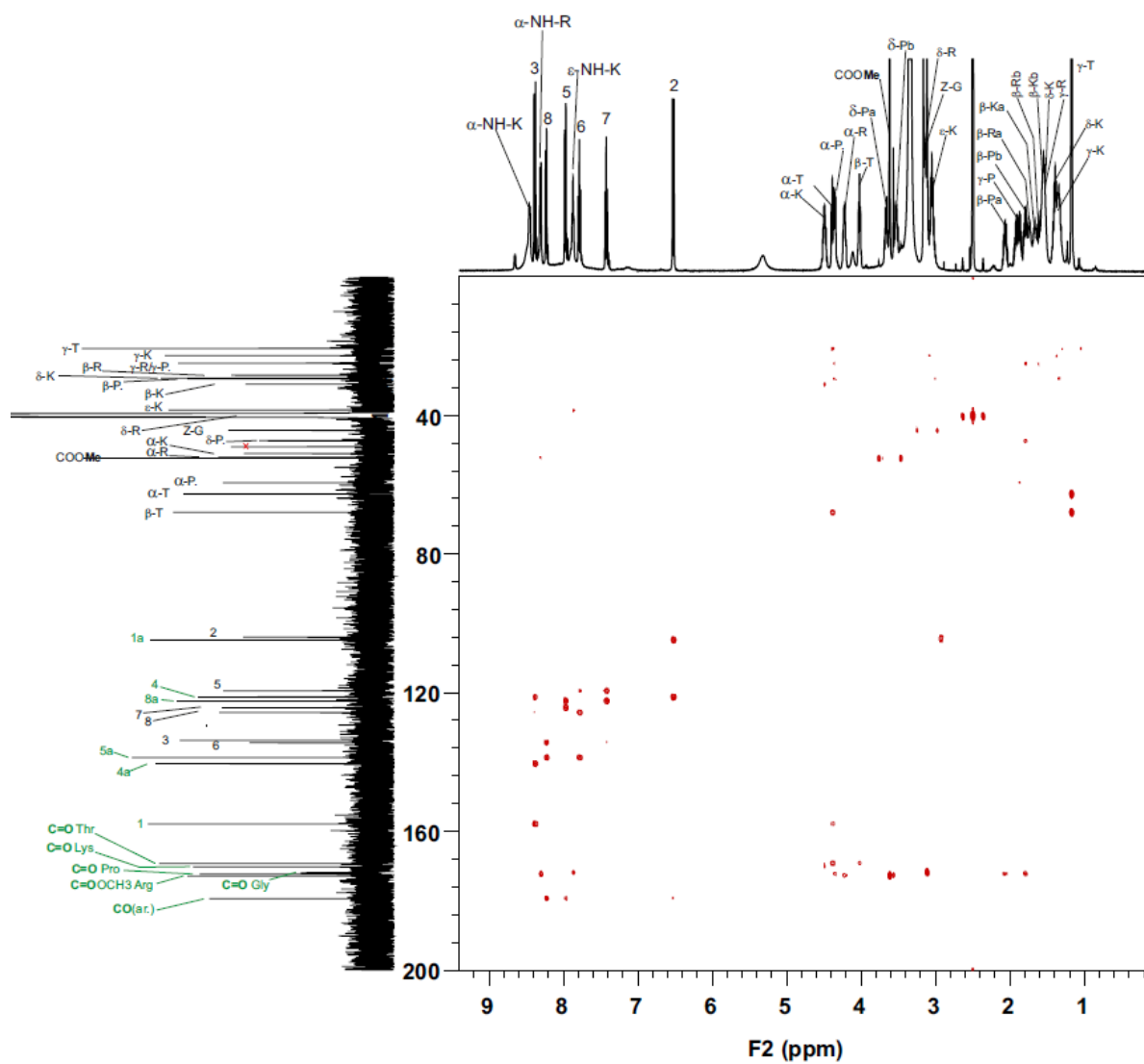
### Załącznik 9. Widmo TOCSY związku (119b)



## Załącznik 10. Widmo HSQC związku (119b)

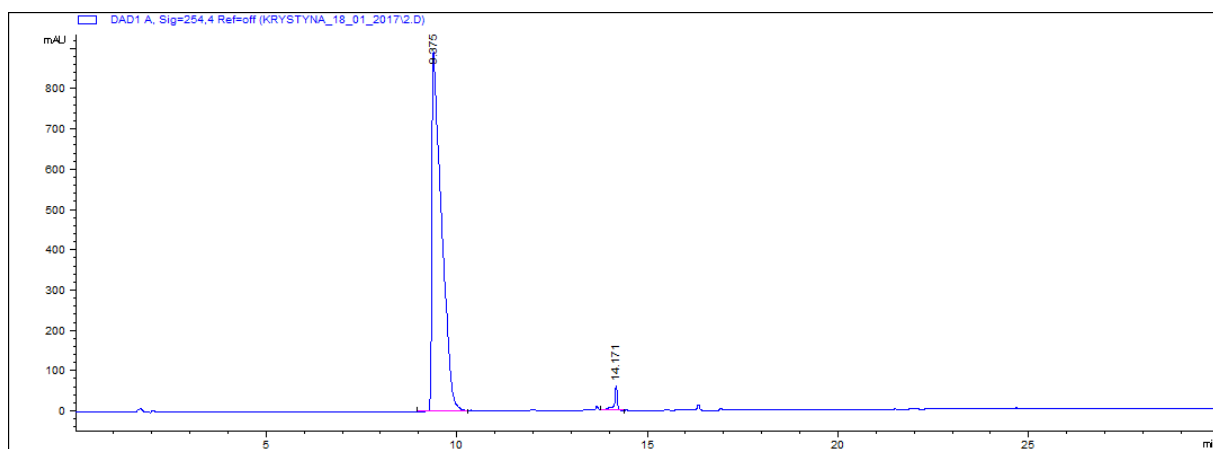


## Załącznik 11. Widmo HMBC związku (119b)

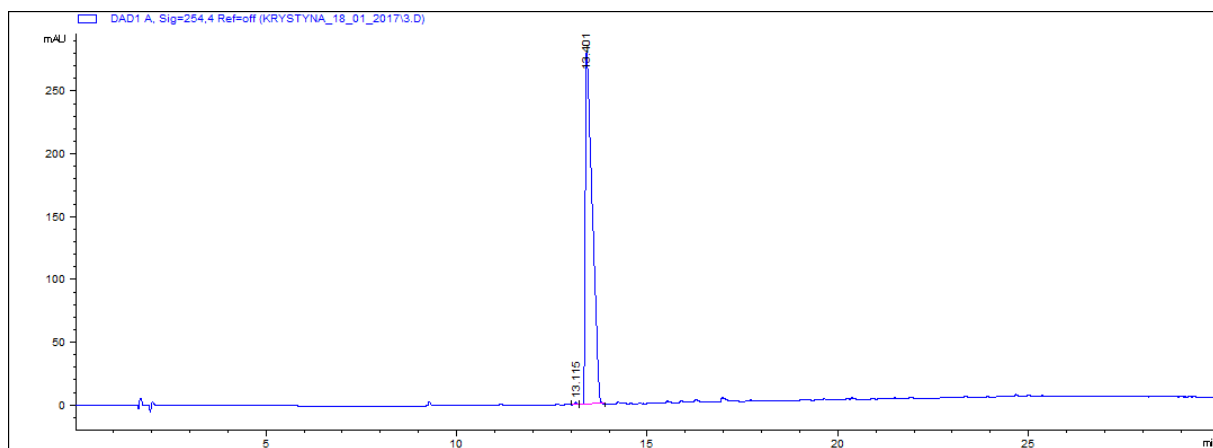


## Załącznik 12. Widma HPLC-MS związków (**115b**, **115c**, **117**)

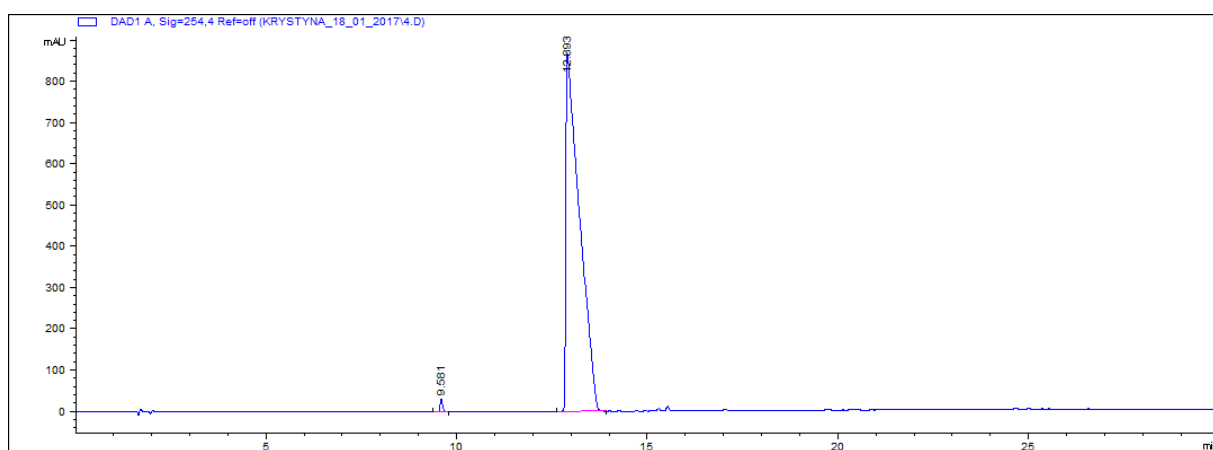
HClx9-[Thr-Lys(Gly)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>]-1-nitroakrydyna (**115b**) - czystość 97.85 %



HClx9-[Thr-Lys( $\beta$ -Ala)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>]-1-nitroakrydyna (**115c**) - czystość 99.78 %

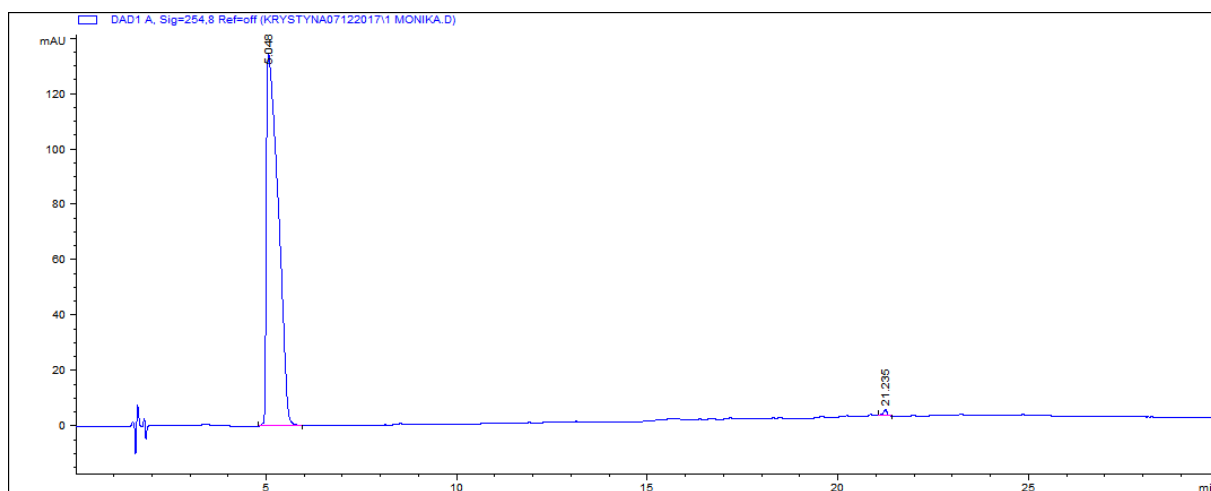


HClx9-[Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys-Thr-OCH<sub>3</sub>]-1-nitroakrydyna (**117**) - czystość 99.35 %

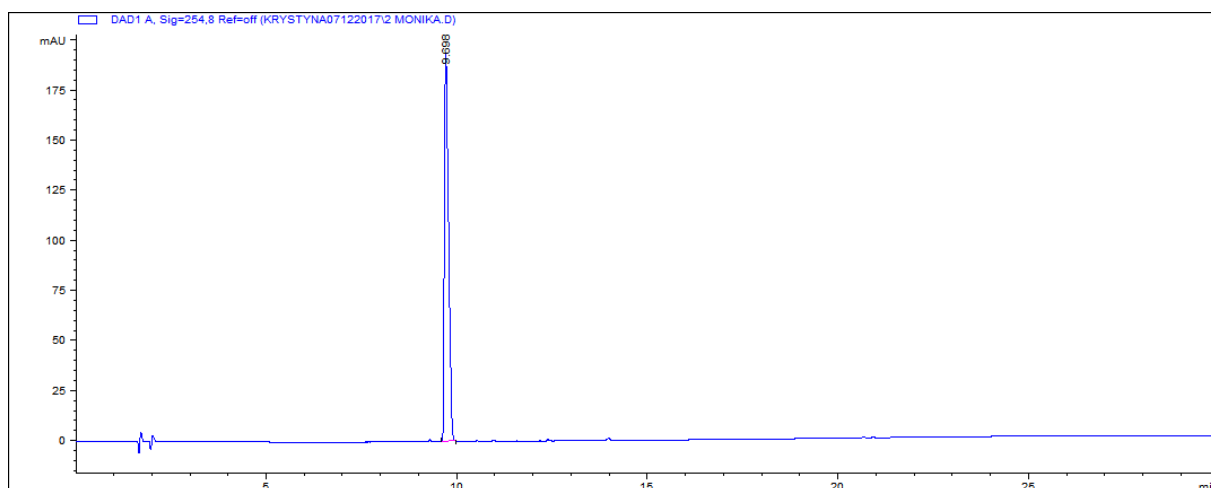


### Załącznik 13. Widma HPLC-MS związków (**116a**, **116b**, **118**)

HClx9-[Thr-Lys-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>]-4-metylo-1-nitroakrydyna (**116a**) - czystość 99.35%



HClx9-[Thr-Lys(Gly)-Pro-Arg(NO<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub>]-4-metylo-1-nitroakrydyna (**116b**) - czystość 100%



HClx9-[Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Lys-Thr-OCH<sub>3</sub>]-4-metylo-1-nitroakrydyna (**118**) - czystość 99.65%

