

Składam serdeczne podziękowania

Promotorowi, Pani prof. dr hab. inż. Krystynie Dzierzbickiej za możliwość realizowania interesującego tematu badawczego oraz wszelkie udzielane wskazówki podczas prac laboratoryjnych i przygotowywania rozprawy.

Panu prof. dr hab. inż. Andrzejowi Składanowskiemu oraz mgr inż. Marcinowi Serockiemu za nieocenioną współpracę i wykonanie badań biologicznych.

Panu dr inż. Grzegorzowi Cholewińskiemu za współpracę.

Pani Danucie Laskowskiej za życzliwość i nieocenioną pomoc laboratoryjną.

Koleżankom i Kolegom z Katedry za współpracę i wspianą atmosferę pracy.

Rodzinie za wsparcie duchowe i ogromną cierpliwość.

Tomaszowi za motywację i inspirację.

Marzenie za rozmowy.

*Niniejszą pracę dedykuję moim Rodzicom
w podziękę za trud włożony w wychowanie
Siostron, Dorocie i Marzenie
za każde ciepłe słowo, gest i siłę, którą mi dały.*

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	9
STRESZCZENIE.....	15
1. WSTĘP	18
2. CZĘŚĆ LITERATUROWA	21
2.1. Batracylina (BAT)	21
2.1.1. Struktura chemiczna i właściwości biologiczne	21
2.1.2. Mechanizm działania przeciwnowotworowego.....	22
2.1.3. Aktywność przeciwnowotworowa i rola <i>N</i> -acetylowania w procesie metabolizmu batracyliny.....	23
2.1.3.1. Aktywność przeciwnowotworowa	23
2.1.3.2. Rola <i>N</i> -acetylotransferazy w bioaktywacji batracyliny	23
2.1.4. Synteza batracyliny	25
2.1.5. Analogi batracyliny – synteza i aktywność biologiczna.....	30
2.2. Tuftsyna (Thr-Lys-Pro-Arg, TKPR).....	45
2.2.1. Struktura chemiczna i właściwości biologiczne	45
2.2.2. Aktywność biologiczna tuftsyny.....	46
2.2.3. Synteza tuftsyny	48
2.2.4. Analogi tuftsyny.....	49
2.3. Adenozyna	54
2.3.1. Struktura chemiczna i właściwości biologiczne	54
2.3.2. Receptory adenozyny	54
2.3.3. Metabolizm i transport adenozyny.....	55
2.3.4. Analogi i koniugaty adenozyny	56
2.3.4.1. Analogi działające poprzez receptory A_1	56
2.3.4.2. Analogi działające poprzez receptory A_{2A}	57
2.3.4.3. Analogi działające poprzez receptory A_{2AB}	59

2.3.4.4. Analogi działające poprzez receptory A ₃	60
2.3.4.5. Koniugaty adenozyiny.....	61
3. CEL I ZAKRES PRACY.....	66
4. WYNIKI I WNIOSKI.....	71
4.1. Prace syntetyczne.....	71
4.1.1. Synteza batracyliny.....	71
4.1.1.1. <i>N,N'</i> -Diacetylo-1,4-fenylendiamina (18).....	71
4.1.1.2. <i>N</i> -[2-(Ftalimidometylo)-1,4-acetylo]fenylendiamina (20).....	71
4.1.1.3. Hydroliza grup acetylowych i cyklizacja do batracyliny (1).....	72
4.1.2. Pochodne aminokwasów.....	74
4.1.2.1. Synteza Boc chronionych aminokwasów (181a-g).....	74
4.1.3. Pochodne tuftsyny/retro-tuftsyny.....	76
4.1.3.1. Synteza pochodnych tuftsyny (172a-f) oraz (182a-f).....	77
4.1.3.1.1. Tetrapeptyd Boc-Thr-Lys(Boc)-Pro-Arg(NO ₂)-OMe (172a) oraz Boc-Thr-Lys(Boc)-Pro-Arg(NO ₂)-OH (182a).....	77
4.1.3.1.2. Pentapeptyd Boc-Thr-Lys(BocGly)-Pro-Arg(NO ₂)-OMe (172b) oraz Boc-Thr-Lys(BocGly)-Pro-Arg(NO ₂)-OH (182b).....	77
4.1.3.1.3. Pentapeptydy (172c-f) oraz (182c-f).....	78
4.1.3.2. Synteza pochodnych retro-tuftsyny (172g-l) oraz (182g-l).....	78
4.1.3.2.1. Tetrapeptyd Boc-Arg(NO ₂)-Pro-Lys(Boc)-Thr-OMe (172g) oraz Boc-Arg(NO ₂)-Pro-Lys(Boc)-Thr-OH (182g).....	78
4.1.3.2.2. Pentapeptyd Boc-Arg(NO ₂)-Pro-Lys(BocGly)-Thr-OMe (172h) oraz Boc-Arg(NO ₂)-Pro-Lys(BocGly)-Thr-OH (182h).....	78
4.1.3.2.3. Pentapeptydy (172h-l) oraz (182h-l).....	79
4.1.4. Deprotekcja osłon grupy aminowej i karboksylowej chronionych peptydów.....	79
4.1.4.1. Deprotekcja osłony Boc.....	79
4.1.4.2. Deprotekcja osłony Z.....	79
4.1.4.3. Deprotekcja estru metylowego.....	80

4.1.4.4. Deprotekcja osłony Boc (177a-l)	80
4.1.5. Analogi batracyliny z pochodnymi tuftsyny/retro-tuftsyny.....	81
4.1.5.1. Synteza analogów (173a-l) oraz (178a-l)	81
4.1.6. Aminokwasowe pochodne batracyliny	83
4.1.6.1. Synteza pochodnych (174a-h) oraz (179a-h)	83
4.1.7. Analogi batracyliny z adenozyną.....	85
4.1.7.1. Synteza analogów (175a-h)	85
4.2. Badania biologiczne.....	85
4.2.1. Analiza przeżywalności komórek testem kolorymetrycznym MTT.....	87
4.2.1.1. Oznaczenie cytotoksyczności chlorowodoru batracyliny (HClxBAT).....	87
4.2.1.2. Oznaczenie cytotoksyczności pochodnych tuftsyny/retro-tuftsyny.....	88
4.2.1.3. Oznaczenie cytotoksyczności analogów batracylizy z pochodnymi tuftsyny/retro-tuftsyny	89
4.2.1.4. Oznaczenie cytotoksyczności aminokwasowych pochodnych batracyliny	90
4.2.1.5. Oznaczenie cytotoksyczności analogów batracyliny z adenozyną.....	91
4.2.2. Oznaczenie aktywności katalitycznej kompleksu topoiizomeraza I-DNA oraz topoiizomeraza II-DNA	92
4.2.3. Oznaczenie dystrybucji komórek w cyklu komórkowym oraz indukcji uszkodzeń DNA	93
5. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA.....	99
5.1. Synteza batracyliny (Schemat 24)	102
5.1.1. <i>N,N'</i> -Diacetylo-1,4-fenylendiamina (18)	102
5.1.2. <i>N</i> -[2-(Ftalimidometylo)-1,4-acetylo]fenylendiamina (20)	102
5.1.3. 8-Aminoizoidolo[1,2- <i>b</i>]chinazolino-12(10 <i>H</i>)-on (1) oraz (176).....	102
5.2. Pochodne aminokwasów (Schemat 28)	103
5.2.1. Synteza Boc chronionych aminokwasów (181a-g)	103
5.2.1.1. Boc-Thr-OH (181a), Boc-Pro-OH (181b), Boc-Gly-OH (181c), Boc-Ala-OH (181d), Boc-Val-OH (181e), Boc-Leu-OH (181f), Boc-Ile-OH (181g).....	103

5.3. Pochodne tuftsyny/retro-tuftsyny (Rysunek 40).....	104
5.3.1. Synteza pochodnych tuftsyny (172a-f) oraz (182a-f)	104
5.3.1.1. Tetrapeptyd Boc-Thr-Lys(Boc)-Pro-Arg(NO ₂)-OMe (172a).....	104
5.3.1.1.1. Dipeptyd Boc-Pro-Arg(NO ₂)-OMe.....	104
5.3.1.1.2. Tripeptyd Z-Lys(Boc)-Pro-Arg(NO ₂)-OMe	105
5.3.1.1.3. Tetrapeptyd Boc-Thr-Lys(Boc)-Pro-Arg(NO ₂)-OMe (172a).....	105
5.3.1.2. Pentapeptydy (172b-f)	105
5.3.1.2.1. Tripeptyd Boc-Lys(Z)-Pro-Arg(NO ₂)-OMe	106
5.3.1.2.2. Tetrapeptyd Boc-Thr-Lys(Z)-Pro-Arg(NO ₂)-OMe.....	106
5.3.1.2.3. Pentapeptyd Boc-Thr-Lys(BocGly)-Pro-Arg(NO ₂)-OMe (172b)	106
5.3.1.2.4. Pentapeptydy (172c-f).....	107
5.3.2. Synteza pochodnych retro-tuftsyny (172g-l).....	109
5.3.2.1. Tetrapeptyd Boc-Arg(NO ₂)-Pro-Lys(Boc)-Thr-OMe (172g).....	109
5.3.2.1.1. Dipeptyd Z-Lys(Boc)-Thr-OMe	109
5.3.2.1.2. Tripeptyd Z-Pro-Lys(Boc)-Thr-OMe	109
5.3.2.1.3. Tetrapeptyd Boc-Arg(NO ₂)-Pro-Lys(Boc)-Thr-OMe (172g).....	109
5.3.2.2. Pentapeptydy (172h-l).....	110
5.3.2.2.1. Dipeptyd Boc-Lys(Z)-Thr-OMe	110
5.3.2.2.2. Tripeptyd Boc-Pro-Lys(Z)-Thr-OMe.....	110
5.3.2.2.3. Tetrapeptyd Boc-Arg(NO ₂)-Pro-Lys(Z)-Thr-OMe.....	110
5.3.2.2.4. Pentapeptyd Boc-Arg(NO ₂)-Pro-Lys(BocGly)-Thr-OMe (172h)	111
5.3.2.2.5. Pentapeptydy (172i-l).....	111
5.3.3. Deprotekcja osłon grupy aminowej i karboksylowej chronionych peptydów	113
5.3.3.1. Deprotekcja osłony Boc	113
5.3.3.2. Deprotekcja osłony Z	114
5.3.3.3. Deprotekcja estru metylowego (182a-l) (Schemat 29).....	114
5.3.3.4. Deprotekcja osłony Boc (177a-l) (Schemat 30).....	115

5.4. Analogi batracyliny z pochodnymi tuftsyny/retro-tuftsyny.....	116
5.4.1. Synteza analogów (173a-l) (Schemat 31)	116
5.4.2. Deprotekcja osłony Boc (178a-l) (Schemat 32)	123
5.5. Aminokwasowe pochodne batracyliny	124
5.5.1. Synteza pochodnych (174a-h) (Schemat 33)	124
5.5.2. Deprotekcja osłony Boc (184a-h) (Schemat 33) oraz (179a-h) Schemat (34)	127
5.6. Analogi batracyliny z adenozyną.....	128
5.6.1. Synteza analogów (175a-h) (Schemat 35)	128
5.7. Materiały stosowane podczas badań biologicznych	133
5.7.1. Linie komórkowe i podłoża hodowlane.....	133
5.8. Metody stosowane w badaniach biologicznych.....	133
5.8.1. Hodowla linii komórkowych – pasażowanie komórek.....	133
5.8.2. Test kolorymetryczny MTT	134
5.8.3. Cytometria przepływowa	135
5.8.4. Zahamowanie aktywności kompleksu rozszczepialnego topoizomeraza-DNA.....	135
5.8.5. Morfologia komórki i jądra komórkowego	135
5.8.6. Barwienie β -galaktozydazy.....	136
5.9. Obliczanie wartości IC ₅₀	136
5.10. Analiza statystyczna	137
6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI KOŃCOWE	138
7. SUMMARY.....	141
8. DOROBEK NAUKOWY	143
9. LITERATURA	145
Załącznik 1. Widmo 2D ¹ H NMR TOCSY i ROESY związku 173f	162
Załącznik 2. Widmo 2D ¹ H NMR TOCSY i ROESY związku 173i	162
Załącznik 3. Widmo 2D ¹ H NMR g-COESY i ROESY związku 175d	163
Załącznik 4. Widmo 2D ¹ H NMR g-COESY i ROESY związku 175h	163

Załącznik 5. Chromatogram związku 173a	164
Załącznik 6. Chromatogram związku 173b	164
Załącznik 7. Chromatogram związku 173d	165
Załącznik 8. Chromatogram związku 173e	165
Załącznik 9. Chromatogram związku 173f	166
Załącznik 10. Chromatogram związku 173g	166
Załącznik 11. Chromatogram związku 173h	167
Załącznik 12. Chromatogram związku 173i	167
Załącznik 13. Chromatogram związku 173k	168
Załącznik 14. Chromatogram związku 173l	168
Załącznik 15. Chromatogram związku 174a	169
Załącznik 16. Chromatogram związku 174d	169
Załącznik 17. Chromatogram związku 174h	170
Załącznik 18. Chromatogram związku 175a	170
Załącznik 19. Chromatogram związku 175b	171
Załącznik 20. Chromatogram związku 175d	171
Załącznik 21. Chromatogram związku 175e	172
Załącznik 22. Chromatogram związku 175f	172
Załącznik 23. Chromatogram związku 175h	173

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

5-Ava	- kwas 5-aminowalerianowy
6-Ahx	- kwas 6-aminokapronowy
7-Ahp	- kwas 7-aminoheptanowy
8-Aoc	- kwas 8-aminokaprylowy
12-Ado	- kwas 12-aminododekanowy
A549	- linia komórkowa ludzkiego niedrobnokomórkowego raka płuc
Ab/Ma	- linia komórkowa czerniaka chemicznego
ABAT	- <i>N</i> -acetylobatracylina
AC	- cyklaza adenylnowa
Ac	- acetyl
ACN	- acetonitryl
ADO	- (2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>S</i> , 5 <i>R</i>)-2-(6-amino-9 <i>H</i> -puryn-9-yl)-5-(hydroksymetyl)oksolan-3,4-diol; adenozyina
AIDS	- zespół nabytego niedoboru odporności
AMP	- adenozyino-5'-monofosforan
aq.	- wodny roztwór (łac. aqueus)
ARC	- zespół związany z AIDS (ang. AIDS-related complex)
AR	- receptory adenozyiny (ang. adenosine receptors)
ATP	- adenozyino-5'-trifosforan
AZT	- 3'-azydo-3'-deoksytymidyna
B16	- linia komórkowa mysiego czerniaka
BAT	- 8-aminoizoindolo[1,2- <i>b</i>]chinazolino-12(10 <i>H</i>)-on; batracylina
Boc	- <i>tert</i> -butoksykarbonyl
BrdU	- 5-bromo-2-deoksyurydyna
BSA	- albumina surowicy bydłowej (ang. bovine serum albumin)
¹³ C NMR	- magnetyczny rezonans węgla
CHCl ₃	- chloroform
iBuOCOCI	- chloromrówczan izobutyli

CCRF-CEM	- linia komórkowa ludzkiej ostrej białaczki limfoblastycznej
CNT	- transporter nukleozydowy, przemieszczający nukleozydy w kotransporcie z jonem Na ⁺ (ang. concentrative nucleoside transport)
g-COESY	- spektroskopia korelacyjna (ang. Correlation Spectroscopy)
Colon 38	- linia komórkowa mysiego raka jelita grubego
Colon 51	- linia komórkowa mysiego raka jelita grubego
CD8F1	- linia komórkowa mysiego raka sutka
CX-1	- linia komórkowa ludzkiego raka jelita grubego
CYP3A	- cytochrom P450, rodzina 2, podrodzina A (P4503A)
DAPI	- 4',6-diaminodi-2-penyloindol
DBU	- 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en
DCC	- dicykloheksylokarbodiimid
DCM	- chlorek metylenu
DEAD	- azodikarboksylan dietylu
DIAD	- dikarboksylan diizopropylu
DIEA (DIPEA)	- <i>N,N</i> -diizopropylodetyloamina
DMA	- <i>N,N</i> -dimetyloacetamid
DMAP	- 4-diaminometylopirydyna
DMF	- <i>N,N</i> -dimetyloformamid
DMEM H/G	- podłoże hodowlane z wysoką zawartością glukozy
DMSO	- dimetylosulfotlenek
DNA	- kwas deoksyrybonukleinowy
DPPA	- azydek difenylofosforanowy
DSB	- dwuniciowe pęknięcia DNA (ang. the DNA double-strand break)
DTT	- ditiotreitol
EC 4.6.1.1.	- L-dehydrogenaza mleczanowa
EDCI	- chlorowodorek 1-(3-dimetyloamino-propyl)-3-etylokarbodiimidu
EDT	- 1,2-etanoditiol
EDTA	- kwas wersenowy
EEDQ	- 2-etoksy- <i>N</i> -etoksykarbonylo-1,2-dihydrochinolina

ENT	- równowagowe transportery nukleozydów (ang. equilibrative nucleoside transporters)
EtBr	- bromek etylu
EtOH	- etanol
EV71	- wirus jelitowy
FBS	- płodowa surowica wołowa (ang. fetal bovine serum)
FDA	- amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (ang. Food and Drug Administration)
GABA	- kwas γ -aminomasłowy
godz.	- godzina
GUMed	- Gdański Uniwersytet Medyczny
γ H2AX	- marker DNA
1 H NMR	- magnetyczny rezonans protonu
H-125	- linia komórkowa ludzkiego niedrobnokomórkowego raka płuc
HOBt	- <i>N</i> -hydroksybenzotriazol
HBTU	- heksafluorofosforan <i>O</i> -{1 <i>H</i> -benzotriazol-1-ilo)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametylouroniowy
HCV	- wirus zapalenia wątroby typu C (ang. Hepatitis C virus)
HCT-8	- linia komórkowa ludzkiego raka jelita grubego
HCT-116	- linia komórkowa ludzkiego raka jelita grubego
hENT	- ludzki równowagowy transporter nukleozydów (human equilibrative nucleoside transporter)
HIV	- ludzki wirus niedoboru odporności (ang. human immunodeficiency virus)
HL-60	- linia komórkowa ludzkiej ostrej białaczki promielocytowej
HMBC	- heterojądrowa korelacja dalekiego zasięgu (ang. Heteronuclear Multiple Bond Coherence)
HSQC	- heterojądrowa korelacja sygnałów protonów (ang. Heteronuclear single quantum correlation)
HPLC	- wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. high-performance liquid chromatography)
HT-29	- linia komórkowa ludzkiego raka jelita grubego
IL-1	- interleukina 1

IL-6	- interleukina 6
JAK2	- kinaza Janusa 2
K562	- linia komórkowa ludzkiej przewlekłej białaczki szpikowej
kat.	- katalizowana
L1210	- linia komórkowa mysiej białaczki limfocytowej
LAH	- tetrahydroglinian litu
lit.	- literatura
LNCaP	- linia komórkowa ludzkiego raka prostaty
m-AMAS	- amsakryna
MCF-7	- linia komórkowa ludzkiego raka sutka
MDA-MB-468	- linia komórkowa ludzkiego raka gruczołu sutkowego
MDP	- muramylodipeptyd (<i>N</i> -acetylmuramyl-L-alanylo-D-izoglutamina)
MeOH	- metanol
MS	- widmo masowe (ang. mass spectrum)
min.	- minuta
MTD	- maksymalna dopuszczalna dawka (ang. maximum tolerated dose)
MTT	- bromek 3-[4,5-dimetylotiazolo-2-ilo]-2,5-difenylo-tetrazoliowy
MX-1	- linia komórkowa ludzkiego raka piersi
NAT	- <i>N</i> -acetylotransferaza
NAT1	- <i>N</i> -acetylotransferaza typu I
NAT2	- <i>N</i> -acetylotransferaza typu II
nasyc.	- nasycony
NBS	- <i>N</i> -bromosukcynoimid
NCI	- Narodowy Instytut Raka (ang. National Cancer Institute)
NIH-353	- linia komórkowa fibroblastów mysich
NMM	- <i>N</i> -metylomorfolina
NMR	- spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. Nuclear Magnetic Resonance)
nor-MDP	- nor-muramylodipeptyd
Me	- metyl
P388	- linia komórkowa mysiej białaczki limfatycznej

PABA	- kwas <i>p</i> -aminobenzoesowy
Panc03	- linia komórkowa ludzkiego raka trzustki
PBS	- bufor fosforanowy
Pd/C	- pallad na węglu
Ph	- grupa fenyłowa
PHNB	- ester 3-nitro-4-hydroksybenzylolistyrenu
PI	- jodek propydyny
PMBC	- mononuklearne komórki krwi obwodowej (ang. peripheral blood mononuclear cells)
PMN	- komórki polimorfonuklearne
PSVT	- napadowy częstoskurczu nadkomorowy (ang. paroxysmal supraventricular tachycardia)
Py	- pirydyna
ROESY	- spektroskopia efektu Overhausera w wirującym układzie współrzędnych (ang. rotating-frame nuclear Overhauser effect correlation spectroscopy)
RPMI 1640	- podłoże hodowlane (ang. Roswell Park Memorial Institute Medium)
SAH	- <i>S</i> -adenozylhomocysteina
SD	- odchylenie standardowe (ang. standard deviation)
SDS	- laurylosiarczan sodu
SN-38	- metabolit irynotekanu (7-etylo-10-hydroksykamptotecyna)
SMZ	- sulfametiazyna
SPPS	- synteza na fazie stałej
SW480	- linia komórkowa ludzkiego raka jelita grubego
STAT3	- białko, przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji
T3P	- bezwodnik kwasu propoanofosfonowego
$t_{1/2}$	- biologiczny okres półtrwania
TBE	- bufor elektroforezy
<i>t</i> -Bu	- <i>tert</i> -butyl
TEA	- trietyloamina
temp. pok.	- temperatura pokojowa
temp. top.	- temperatura topnienia
temp. wrz.	- temperatura wrzenia

TFA	- kwas trifluorooctowy
THF	- tetrahydrofuran
TMEDA	- <i>N, N, N', N'</i> -tetrametyloetylenodiamina
TNF- α	- czynnik martwicy guza (ang. tumor necrosis factor)
TLC	- chromatografia cienkowarstwowa (ang. thin layer chromatography)
TOCSY	- korelacyjna spektroskopia zupełna (ang. total correlation spectroscopy)
Topo I	- topoizomeraza typu I
Topo II α	- topoizomeraza typu II α
Tris-HCl	- chlorowodorek tris(hydroksymetylo)aminometanu
UDPGT	- kwas urydyno-5'-difosfo-D-glukuronowy
ukł.	- układ
UV	- promieniowanie ultrafioletowe
WEHI 164	- linia komórkowa włókniakomięsaka mysiego
Wyd.	- wydajność
VP-16	- etopozyd
X Gal	- 5-bromo-4-chloro-3-indylo- β -D-galaktoza
XTT	- sól sodowa 2,3-bis[2-metoksy-4-nitro-5-sulfofenylo]-2 <i>H</i> -tetrazolio-5-karboksyanilidu
Z	- benzyloksykarbonyl

STRESZCZENIE

Niniejsza praca doktorska obejmuje syntezę oraz ewaluację biologiczną nowych funkcjonalizowanych analogów batracyliny (BAT) z pochodnymi tuftsyny/retro-tuftsyny oraz z adenozyną. Batracylina jest heterocykliczną aminą wyselekcjonowaną w trakcie poszukiwań nowych leków przeciwnowotworowych przez Narodowy Instytut Rakowy w Bethesda, USA. Wykazała ona wysoką aktywność cytotoksyczną oraz przeciwnowotworową wobec kilku eksperymentalnych modeli komórek nowotworowych, w tym linii opornych na adriamycynę, cisplatynę oraz metotreksat. W 2007 roku batracylina weszła do I fazy badań klinicznych mających na celu określenie bezpieczeństwa jej stosowania u chorych na nowotwory. Ponieważ nie wykazano odpowiedniego wpływu BAT na zahamowanie rozwoju nowotworów, w 2011 roku badania zakończono.

Niska rozpuszczalność BAT w wodzie, wysoka toksyczność oraz mała biodostępność i konieczność stosowania wysokich dawek leku stoją na przeszkodzie wykorzystania tego związku w praktyce klinicznej, co przyczyniło się do poszukiwania jej nowych analogów o lepszych właściwościach farmakologicznych. W ten nurt badań wpisuje się również temat mojej pracy doktorskiej. Uzyskałam dwa nowe typy analogów batracyliny zawierające w swej strukturze dodatkowe cząsteczki, pochodne tuftsyny/retro-tuftsyny oraz adenozyne. Tuftsyna, bioaktywny tetrapeptyd pochodzenia zwierzęcego, stymuluje różne funkcje makrofagów, wykazuje aktywność bakteriobójczą, przeciwnowotworową oraz przyczynia się do wzrostu niespecyficznego odporności organizmu gospodarza przeciw licznym infekcjom. Natomiast adenozyne będąc endogennym nukleozydem purynowym, nie tylko stanowi prekursor nukleotydów adeninowych, ale jest również neuromodulatorem odgrywającym istotną rolę w funkcjonowaniu wielu komórek. Dzięki wiązaniu się z receptorami adenozyne (AR), stanowi czynnik ochronny w stanach niedokrwienia i niedotlenienia serca oraz innych tkanek, jak również, w zależności od pobudzonego AR, wpływa m.in. na pracę serca, agregację płytek, napięcie mięśni gładkich czy układ immunologiczny.

Zakładałam, że wprowadzenie nowych cząsteczek do BAT może przyczynić się do zwiększenia jej specyficzności i aktywności przeciwnowotworowej w wyniku addytywnego/synergistycznego działania reszt adenozyne i tuftsyny ze względu na

oddziaływania z receptorami adenozyiny i stymulację układu immunologicznego przez tuftsynę.

Batracylinę otrzymałam opracowaną w naszym zespole zmodyfikowaną metodą Czerniaka-Einhorna. Jako substrat wykorzystałam *p*-fenylenodiaminę, którą przeprowadziłam w symetrycznie chronioną grupami acetylowymi pochodną, po czym poddałam ją reakcji Czerniaka-Einhorna i w wyniku hydrolizy grup ochronnych oraz cyklizacji uzyskałam BAT. Syntezę odpowiednio chronionej tuftsyny/retro-tuftsyny oraz ich pochodnych acylowanych na grupie ϵ -aminowej lizyny dodatkowym aminokwasem (Gly, Ala, Val, Leu, Ile) przeprowadziłam metodą klasyczną w roztworze z wykorzystaniem mieszanych bezwodników z chloromrówczanem izobutyli i NMM. Jest to synteza wieloetapowa, która wymaga wprowadzania i zdejmowania odpowiednich osłon grup funkcyjnych. Analogi BAT z oligopeptydami uzyskałam przy użyciu T3P jako odczynnika kondensującego, który dawał najczystsze produkty z najlepszą wydajnością. Natomiast analogi BAT zawierające adenozyinę otrzymałam w reakcji podstawienia nukleofilowego rybozydu 6-chloropuryny aminokwasowymi pochodnymi BAT. Użycie linkera do połączenia dwóch cząsteczek jest powszechnie stosowaną metodą, a od jego długości i budowy bardzo często zależy aktywność biologiczna związku.

Struktura otrzymanych nowych analogów została potwierdzona na podstawie analizy widm ^1H NMR, ^{13}C NMR i MS, a ich czystość za pomocą HPLC.

W przeprowadzonych badaniach biologicznych określono żywotność komórek za pomocą testu MTT oraz wpływ badanych związków na aktywność katalityczną kompleksu rozszczepialnego topoizomeraza-DNA, dystrybucję komórek w cyklu komórkowym i indukcję uszkodzeń DNA. Do badań wyselekcjonowano ludzkie linie komórkowe: niedrobnokomórkowego raka płuc A549 oraz białaczki promielocytarnej HL-60. Ewaluacja właściwości cytotoksycznych chlorowodoru batracyliny wykazała umiarkowane jego właściwości cytotoksyczne. Otrzymane chlorowodorki oligopeptydów tuftsyny/retro-tuftsyny nie wykazały aktywności cytotoksycznej. Znacznie lepszą aktywnością niż chlorowodorek batracyliny charakteryzowały się analogi batracyliny z pochodnymi retro-tuftsyny. Najbardziej aktywne okazały się jednak aminokwasowe pochodne batracyliny. Natomiast ich analogi z adenozyiną nie wykazały aktywności w przeprowadzonych testach. Ponadto, zbadano wpływ oligopeptydowych analogów BAT na aktywność kompleksu rozszczepialnego topoizomeraza-DNA. Wykazano, że nie hamują one w znacznym stopniu relaksacji DNA przez topoizomerazę typu I, natomiast dają dobre wyniki w przypadku inhibicji relaksacji DNA przez topoizomerazę typu II α . W wyniku

analizy cyklu komórkowego oraz morfologii jądra komórkowego, po traktowaniu komórek nowotworowych wybranymi oligopeptydowymi analogami BAT można stwierdzić, że przyrost frakcji sub-G1 był znaczący w populacji komórek inkubowanych z tymi związkami.

1. WSTĘP

Choroby nowotworowe są obecnie drugą, po chorobach serca, przyczyną zgonów w Europie i USA. Według oficjalnych statystyk, każdego roku na świecie 25 mln osób zapada na chorobę nowotworową, a ponad 7 mln umiera z jej powodu ^[1].

Nowotwór nie jest pojedynczą jednostką chorobową. Stanowi on liczną grupę schorzeń o różnej lokalizacji, tempie rozwoju, przebiegu czy przyczynie, powstając w wyniku nagromadzenia mutacji w genach odpowiedzialnych za proliferację komórek. Dlatego też zmiany nowotworowe dotyczą osób w średnim oraz w podeszłym wieku. Przyczyny występowania znacznej większości nowotworów do dzisiaj nie zostały jednoznacznie wyjaśnione ^[2]. Brane są pod uwagę współdziałania wielu czynników takich jak: zakażenia wirusowe, niekorzystne oddziaływania środowiska (napromieniowanie, zatrucia chemiczne), nieprawidłowe żywienie (nadmiar lub niedobór składników pokarmowych) czy czynniki konstytucjonalne oraz genetyczne. Szacuje się, że karcynogeny stymulujące tworzenie onkogenów (nikotyna, alkohol, promieniowanie słoneczne) są odpowiedzialne za rozwój 80% nowotworów w USA ^[3].

Zapobieganie i leczenie nowotworów stanowi największe wyzwanie XXI wieku. Profilaktyka oznacza działania wdrażane w życiu codziennym, ponieważ poprzez właściwe odżywianie i prowadzenie zdrowego stylu życia (zbilansowana dieta, ruch, brak stresu i nałogów) można zapobiegać aż 80% chorób nowotworowych ^[2].

Równie ważne jest wczesne wykrycie choroby, w stadium umożliwiającym jej skuteczne leczenie. Opracowano wiele metod terapii wcześniej nieuleczalnych chorób, takich jak: rak jąder, chłoniaki i białaczki. Powszechnie stosowane są leki przywracające czynność szpiku kostnego po chemioterapii, indukujące różnicowanie tkanek nowotworowych i hamujące angiogenezę ^[3]. Z drugiej strony, stosowane chemioterapeutyki wywołują wiele niekorzystnych dla organizmu skutków ubocznych m.in. nudności, anemię, zmęczenie, zwiększoną skłonność do krwawienia czy infekcji. Ponadto, będąc nioselektywnymi, przyczyniają się do śmierci zdrowych komórek, szczególnie komórek włosów czy znajdujących się w jamie ustnej, przewodzie pokarmowym, narządach rozrodczych lub szpiku kostnym. Zdarza się, że mimo pokonania choroby nowotworowej, u pacjentów występuje uszkodzenie płuc, nerek lub układu rozrodczego, a nawet powstanie innego nowotworu. Co więcej, wiele nowotworów jest opornych na działanie stosowanych leków (oporność wielolekowa).

Do leków tzw. nowej generacji, stosowanych w immunoterapii można zaliczyć m.in. ipilimumab oraz niwolumab, które podaje się pacjentom chorym na zaawansowanego czerniaka. Sipuleucel-T znalazł zastosowanie w leczeniu zaawansowanego raka prostaty. Z obserwacji prowadzonych w USA wynika, że prawie, co czwarty pacjent przyjmujący ipilimumabu przeżył cztery lata z zaawansowanym czerniakiem. Natomiast 83% chorych leczonych niwolumabem przeżyło rok. Immunoterapia lekami nowej generacji ma również swoje ujemne strony, do których niewątpliwie należy zaliczyć ich cenę. Jeden cykl leczenia ipilimumabem kosztuje 120 tys. dolarów, a opracowanie indywidualnej szczepionki immunologicznej bazującej na sipuleucelu-T to koszt 90 tys. dolarów^[4].

Obok klasycznej chemioterapii coraz większą popularnością cieszy się zwalczanie nowotworów z wykorzystaniem innowacyjnych technik, takich jak: radioterapia protonowa, elektrochemioterapia, hipertermia onkologiczna, NanoKnife czy Gamma Knife.

Radioterapia protonowa opiera się na wytwarzaniu protonów, precyzyjnie działających na zmienione nowotworowo miejsce, niszcząc wyłącznie chore komórki. Znalazła zastosowania głównie w leczeniu nowotworów mózgu oraz tych położonych w pobliżu ważnych narządów, np. czerniak gałki ocznej.

Elektrochemioterapia, polegająca na krótkookresowej destabilizacji błon komórkowych pod wpływem pola magnetycznego, ma na celu przede wszystkim podniesienie jakości życia pacjenta. Wykorzystywana jest w licznych nieoperacyjnych i zaawansowanych nowotworach.

Hipertermia onkologiczna to dynamicznie rozwijająca się metoda, polegająca na ukierunkowanym zastosowaniu energii cieplnej. Działa na zasadzie wytworzenia stanu gorączki, czyli aktywuje układ odpornościowy chorego, a tym samym niszczy zmienione nowotworowo komórki. Metoda ta łączona jest głównie z chemioterapią i radioterapią, podnosząc ich skuteczność w leczeniu m.in. mięsaków, czerniaka, nowotworów głowy, płuc, przełyku, piersi, jajników czy wątroby.

NanoKnife, czyli mało inwazyjna metoda niszczenia guzów, uśmiercająca komórki nowotworowe, nie naruszając struktury i funkcji naczyń krwionośnych oraz nerwów. Najczęściej stosowana w leczeniu raka prostaty i trzustki.

Gamma Knife, wykorzystuje promienie kobaltowe, dając możliwość przestrzennego oraz trójwymiarowego planowania i napromieniowania komórek

nowotworowych. Metoda stosowana w leczeniu chorób centralnego układu nerwowego, np. nerwiaków nerwu słuchowego [5-7].

W wielu ośrodkach badawczych na świecie w dalszym ciągu poszukiwane są nowe związki chemiczne o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej lub modyfikowane są już istniejące w celu poprawy ich właściwości farmakologicznych [8]. Jednym z takich związków jest batracylina, która odznacza się wysoką toksycznością oraz niską rozpuszczalnością, co znacznie ogranicza jej wykorzystanie w terapii przeciwnowotworowej [9,10]. Dlatego też poszukuje się jej nowych analogów, bardziej aktywnych i lepiej rozpuszczalnych w wodzie, które wykazywałyby mniejszą toksyczność oraz większą biodostępność [9,11,12].

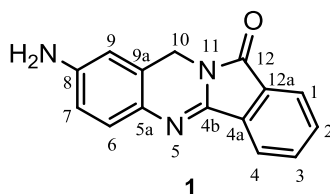
W niniejszej pracy przedstawiłam syntezę oraz badania *in vitro* nowych analogów batracyliny zawierających oligopeptydy jakimi są pochodne tuftsyny/retro-tuftsyny oraz adenozyne jako potencjalnych związków przeciwnowotworowych.

2. CZĘŚĆ LITERATUROWA

2.1. Batracylina (BAT)

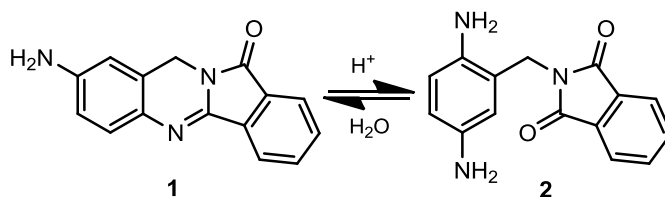
2.1.1. Struktura chemiczna i właściwości biologiczne

Batracylina (BAT) (**1**), związek przeciwnowotworowy wyselekcjonowany w 1978 roku w trakcie poszukiwań nowych potencjalnych leków przeciwnowotworowych przez Narodowy Instytut Rakowy (NCI, Bethesda, USA) ^[9-11]. Z chemicznego punktu widzenia jest ona czteropierścieniowym związkiem o prawie płaskiej strukturze (Rysunek 1).



Rysunek 1. Struktura chemiczna BAT (**1**) ^[10]

W środowisku kwaśnym następuje jej odwracalna hydroliza, czemu towarzyszy otwarcie heterocyklicznego pierścienia (Schemat 1) ^[10].



Schemat 1. Hydroliza BAT (**1**) w środowisku kwaśnym ^[10]

BAT wykazuje silną aktywność przeciwnowotworową potwierdzoną w licznych badaniach *in vitro* i *in vivo*. Aczkolwiek, ze względu na wysoką toksyczność i słabą rozpuszczalność w wodzie nie znalazła ona szerszego zastosowania jako chemioterapeutyk.

Mechanizm działania tego związku nie został do końca poznany i wyjaśniony. Przepuszczalnie BAT może interkalować do DNA, jak również oddziaływać z kompleksem rozszczepialnym topoisomeraza II-DNA ^[16].

2.1.2. Mechanizm działania przeciwnowotworowego

Topoisomeraza typu II jest jednym z najważniejszych enzymów odpowiedzialnych za zmiany w topologii DNA, odgrywającym główną rolę w procesach replikacji, transkrypcji i rekombinacji. Dodatkowo odpowiedzialny jest on za prawidłową strukturę chromatyny. Odgrywa także istotną rolę w kondensacji chromosomów oraz segregacji chromatyd siostrzanych, a także wykazuje zdolność rozpoznawania endogennych i egzogennych zmian patologicznych DNA ^[17].

Największą, a tym samym najważniejszą grupą chemioterapeutyków, wśród inhibitorów ludzkiej topoisomerazy typu II, stanowią związki stabilizujące kompleks rozszczepialny DNA-topoisomeraza II, tzw. trucizny topoisomerazy typu II. Swoje terapeutyczne działanie opierają one na blokowaniu kompleksu rozszczepialnego topoisomeraza II-DNA ^[17,18]. Do trucizn wykazujących najsilniejsze działanie inhibicyjne, zalicza się: doksorubicynę, amsakrynę i jej pochodną m-AMAS, mitoksantron oraz etopozyd. Natomiast: batracylina, menadion i amonafid, to związki charakteryzujące się znacznie słabszą aktywnością w blokowaniu tego rodzaju kompleksu ^[19].

Poznanie mechanizmu działania inhibitorów topoisomerazy typu II przyczyniło się do projektowania nowych związków przeciwnowotworowych oraz poszukiwania metod ich syntezy, co w następstwie doprowadziło m.in. do otrzymania nowych pochodnych batracyliny.

Badania prowadzone na linii komórkowej HT-29, nie tylko potwierdziły mechanizm działania BAT, opierający się na hamowaniu aktywności topoisomerazy typu II, ale również wykazały aktywność tego związku w inhibicji topoisomerazy typu I ^[16].

2.1.3. Aktywność przeciwnowotworowa i rola *N*-acetylowania w procesie metabolizmu batracyliny

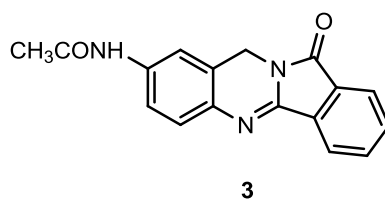
2.1.3.1. Aktywność przeciwnowotworowa

Badania, prowadzone na modelu mysim, wykazały interesujące właściwości inhibicyjne batracyliny we wczesnym i zaawansowanym stadium rozwoju nowotworu Colon 38. Do całkowitego wyleczenia testowanych zwierząt wystarczyło podanie jedynie dwóch dawek tego leku [20,21]. Dalsze badania *in vivo* prowadzone na myszach, potwierdziły aktywność BAT przeciw białaczce P388, odpornej na adriamycynę, cisplatynę i metotreksat oraz nowotworom: wątroby 129, Panc 03 oraz Colon 51 [11,22]. Z drugiej strony, BAT okazała się nieaktywna w badaniach *in vitro* prowadzonych na nowotworach mysich L1210, B16, CD8F1, raku płuc Lewisa czy nowotworach ludzkich MX-1, H-125, CX-1, HCT-8 oraz HCT-116. Niemniej jednak, BAT weszła do toksykologicznych badań na modelach zwierzęcych już w 1988 roku [23].

2.1.3.2. Rola *N*-acetylotransferazy w bioaktywacji batracyliny

Badania biologiczne prowadzone na zwierzętach wykazały, że toksyczność BAT spowodowana jest obecnością jej *N*-acetylowanej pochodnej, tzw. ABAT (**3**) (Rysunek 2) [23]. Zauważono, że po podaniu BAT u testowanych zwierząt wystąpiły niepożądane objawy, takie jak: toksyczność żołądkowo-jelitowa, wątrobowa, nerkowa czy jądrowa, a ich nasilenie zależne było od gatunku. Najbardziej odporne okazały się psy, natomiast szczury, wykazały się największą wrażliwością. Jak później dowiedziono, przyczyną zaobserwowanej różnicy była odmienna aktywność NAT w układach enzymatycznych testowanych gatunków. Odporność psów wynikała z faktu, że aktywność NAT dla tego gatunku jest stosunkowo niewielka. Warto podkreślić, że podanie ABAT w dawce 10-krotnie wyższej w porównaniu do BAT, nie przyczyniło się do wystąpienia objawów niepożądanych, co może wskazywać na bardzo małą przyswajalność ABAT (<50 ng/ml) [24-27].

Różnice w zdolności poszczególnych gatunków do acetylowania aminowych aromatycznych leków nie są niczym nadzwyczajnym i zostały dobrze poznane [28,29]. Udowodniono, że organizmy dzielą się na szybko i wolno acetylujące [29].



Rysunek 2. Struktura chemiczna ABAT (3) [23]

Badania prowadzone na szczepie *Salmonella typhimurium* potwierdziły rolę *N*-acetylowania w zdolności uszkodzenia materiału genetycznego, polegającą na kowalencyjnym łączeniu się BAT z DNA. Zauważono, że szczepy charakteryzujące się większą zdolnością do *N*-acetylowania BAT, okazały się bardziej wrażliwe na jej mutagenne działanie [30,31].

Doświadczenia *in vivo* prowadzone na hepatocytach komórek szczurzych, pozwoliły stwierdzić, że cytochrom P4503A (CYP3A) oraz enzym UDPGT odgrywają znaczną rolę w biotransformacji BAT. Ponadto, produkty ich metabolizmu mogą wpływać na cytotoksyczność i mutagenne działanie tego związku [32,33].

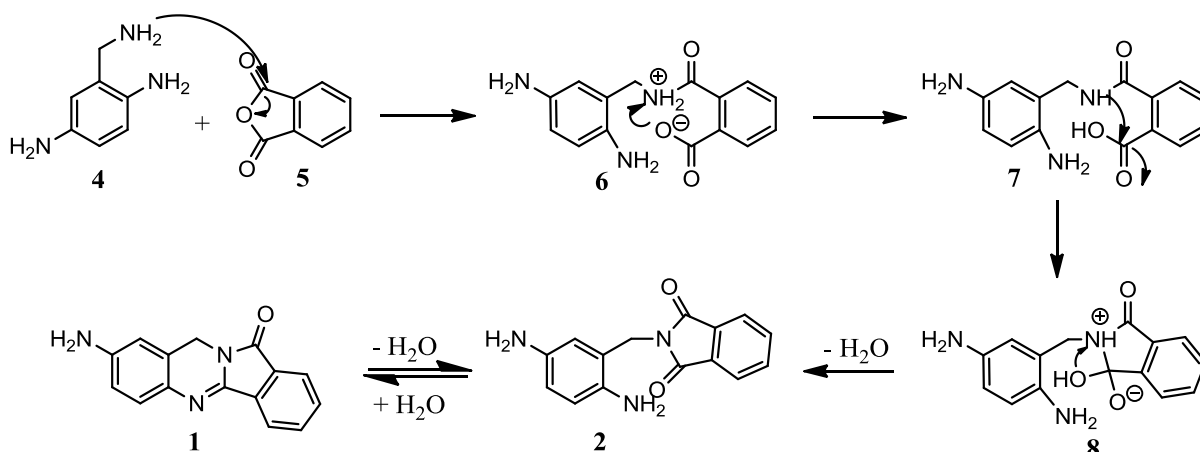
W 1999 roku rozpoczęto badania nad ludzkim metabolizmem batracyliny. Jak wiadomo, ludzka wątroba produkuje dwa rodzaje *N*-acetylotransferaz (NAT1 i NAT2), z których NAT1 jest powolnym acetylatorem, a NAT2 zalicza się do acetylatorów szybkich. W opisywanym eksperymencie, oprócz BAT brały dodatkowo udział PABA – substrat NAT1 oraz SMZ – substrat NAT2. Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że BAT jest acetylowana podobnie do SMZ, czyli może stanowić substrat dla ludzkiej NAT2 [34].

W 2007 roku batracylina weszła do badań klinicznych. Otrzymane wyniki, a dokładniej wpływ, jaki ABAT wywiera na organizm ludzki opublikowano w 2013 roku [35]. W eksperymencie wzięło udział 31 pacjentów, u których wykryto różnego rodzaju nowotwory oraz chłoniaki. W trakcie 28-dniowego cyklu chorzy przyjmowali odpowiednią dawkę BAT, poczynając od 5 mg/dzień (stanowiąca MTD dla szczurów), a kończąc na 400 mg/dzień BAT. Podana dawka była 20-krotnie wyższa od MTD dla szczurów i stanowiła 70% MTD dla myszy. Po zakończeniu badań u pacjentów nie zaobserwowano wystąpienia niepożądanych objawów. Jednakże nie wykazano również odpowiedniego wpływu BAT na zahamowanie nowotworów, co w konsekwencji przyczyniło się do zakończenia testów klinicznych.

Najnowsze badania pokazują, jaki wpływ BAT, a szczególnie ABAT wywiera na DNA szczurów. W wyniku 4-dniowego przyjmowania ABAT w dawce od 16 do 32 mg/kg wystąpiły znaczne uszkodzenia w materiale genetycznym komórek nerkowych oraz pęcherza badanych zwierząt ^[36].

2.1.4. Synteza batracyliny

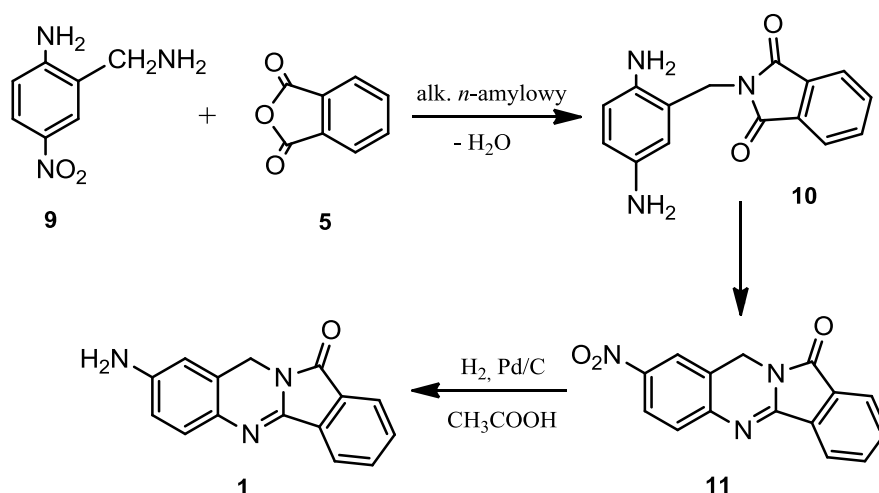
Znanych jest kilka podejść syntetycznych prowadzących do otrzymania batracyliny (**1**) ^[33]. Po raz pierwszy została ona otrzymana w laboratoriach firmy BAYER AG przez Kabbe i in. ^[14] w 1987 roku. Synteza polegała na 4 godz. ogrzewaniu diaminobenzylaminy (**4**) z bezwodnikiem ftalowym (**5**) (Schemat 2).



Schemat 2. Synteza batracyliny (**1**) wg Kabbe ^[14]

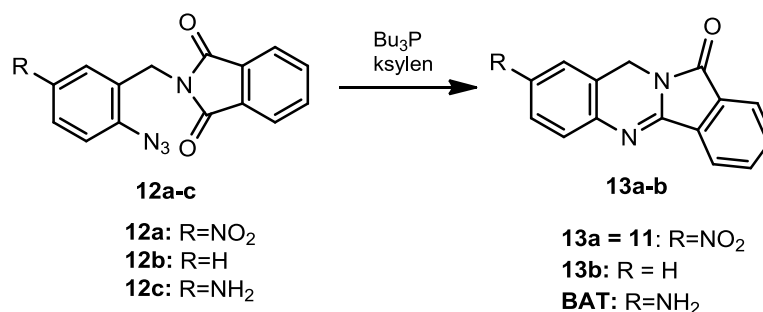
Reakcja przebiegała w łagodnych warunkach, ale końcowa wydajność (54%) nie była zadowalająca ^[14], co przyczyniło się do poszukiwania innych metod syntezy tego związku.

W 1994 roku zespół Meegalla opracował metodę, w której zamiast diaminobenzylaminy (**4**) wykorzystano 2-amino-5-nitrobenzylaminę (**9**). Związek (**9**) poddano reakcji z bezwodnikiem ftalowym (**5**) w obecności alkoholu *n*-amyłowego (Schemat 3). Jak wiadomo, alifatyczna grupa aminowa jest bardziej nukleofilowa niż aromatyczna, co przyczyniło się do powstania 4-nitro-2-ftalimidometyloaniliny (**10**). Otrzymany, w wyniku cyklizacji, 8-nitroizoidolo[1,2-*b*]chinazolino-12(10*H*)-on (**11**) poddano wodorolizie (kat. Pd/C) otrzymując BAT (**1**) (wyd. 77%) ^[38].



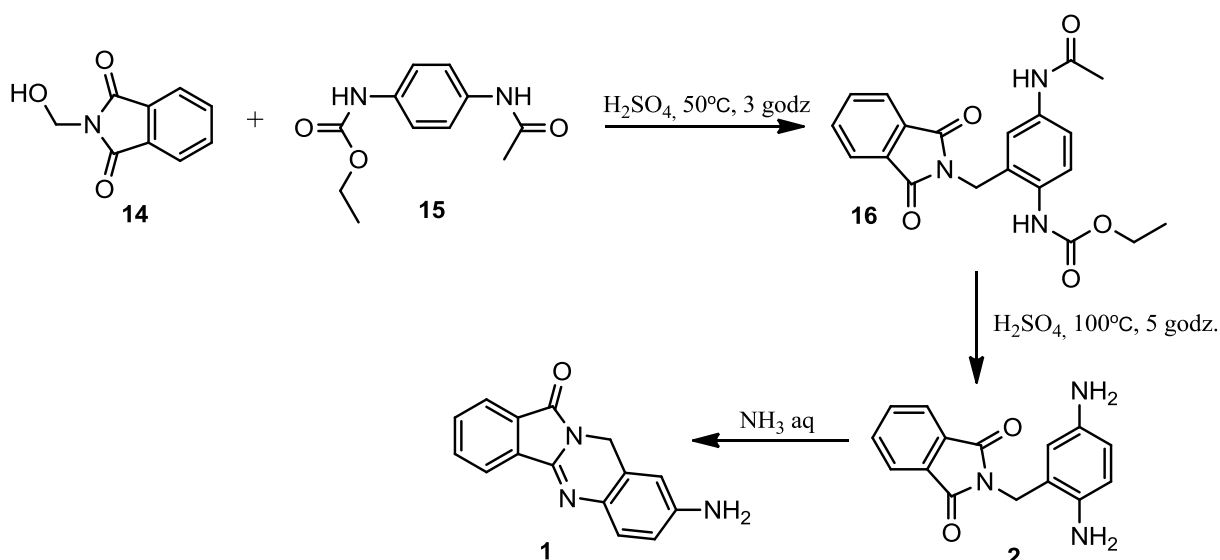
Schemat 3. Synteza BAT wg Meegalla ^[38]

Odmienne podejście do syntezy BAT (**1**) zostało zaproponowane przez Eguchi ^[39], który wykorzystał wewnątrzcząsteczkową cyklizację związku (**12c**) w obecności Bu₃P. Redukcja grupy nitrowej prowadziła do otrzymania BAT (**1**) (Schemat 4).



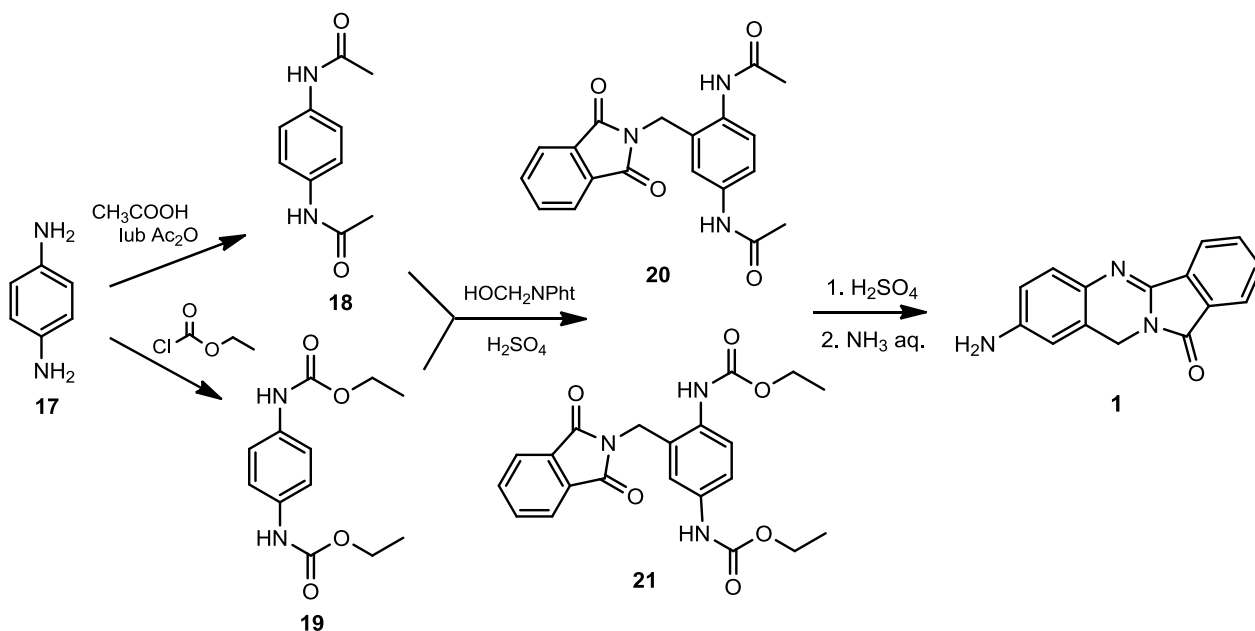
Schemat 4. Synteza BAT wg Eguchi ^[39]

Rosevear i Wilshire ^[15] zaproponowali metodę syntezy batracyliny (**1**) polegającą na reakcji ftalimidometylowania Czerniaka-Einhorna biegnącej mechanizmem substytucji elektrofilowej. Rolę elektrofila pełni *N*-(hydroksymetylo)ftalimid (**18**), który z 4-(acetyloamino)fenylokarbaminianem etylu (**19**) daje [4-(acetyloamino)-2-(ftalimidometylo)fenylo]karbaminian etylu (**20**). W wyniku kwaśnej hydrolizy grup ochronnych, a następnie alkalizacji za pomocą amoniaku otrzymano BAT (**1**) (Schemat 5).



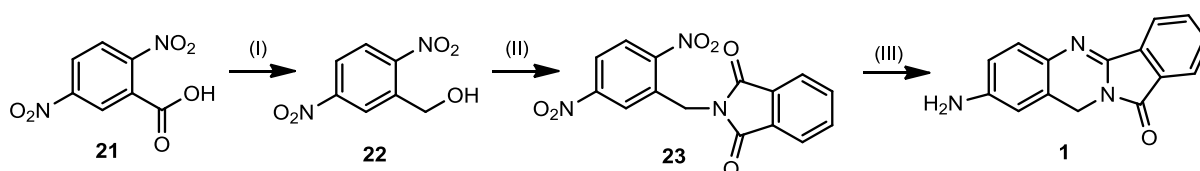
Schemat 5. Synteza BAT (**1**) wg Rosevear'a i Wilshire'a ^[14]

Opisywana metoda jest stosunkowo prosta w wykonaniu, ale wydajność produktu końcowego nie przekracza 40%. Ponadto, w jednym z etapów powstaje nietrwały produkt przejściowy ^[14], co przyczyniło się do zmodyfikowania tej metody przez Dzierzbicką ^[40] poprzez skrócenie drogi syntezy o dwa etapy. Substratami biorącymi udział w reakcji są symetrycznie chronione pochodne 1,4-fenylendiaminy (**18** i **19**), które poddaje się reakcji Czerniaka-Einhorna, a następnie hydrolizie grup acetylowych bądź uretanowych. W wyniku końcowej cyklizacji otrzymuje się batracynę (**1**) (Schemat 6).



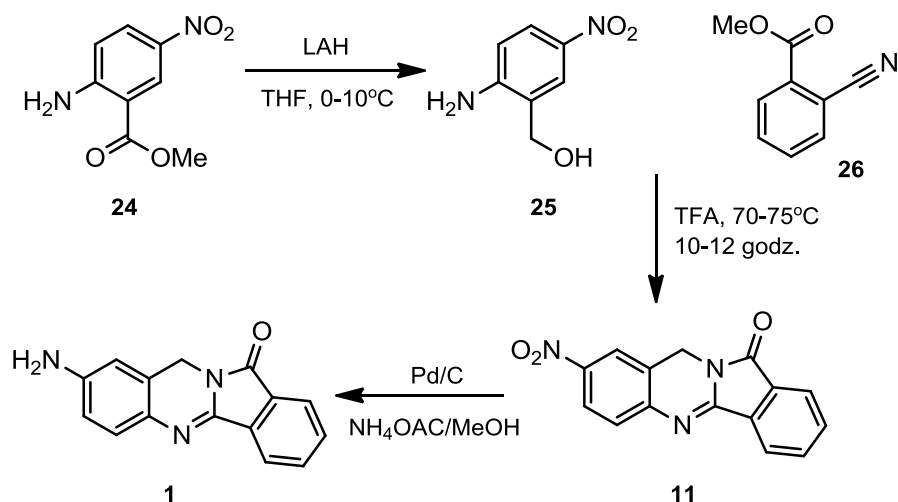
Schemat 6. Synteza BAT (**1**) wg Dzierzbickiej ^[40]

Martinez-Vituro i in. ^[12] przedstawili syntezę BAT (**1**), w której wykorzystano komercyjnie dostępny kwas 2,5-dinitrobenzoesowy (**21**). Związek (**21**) przekształcono w chlorek kwasowy, a następnie w odpowiedni alkohol (**22**), na który podziało fталimidem. Otrzymaną pochodną (**23**) poddano redukcji uzyskując BAT (**1**) (Schemat 7) ^[12].



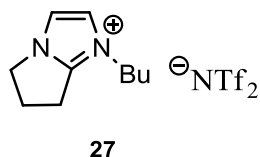
Schemat 7. Synteza BAT (**1**) wg Martinez-Vituro ^[12]. Reagenty i warunki: (I) (1) SOCl_2 ; (2) NaBH_4 , H_2O , 0°C ; (II) fталimid, DEAD, PPh_3 , temp. pok.; (III) HCO_2NH_4 , Pd/C , EtOH ^[12]

Metoda zaproponowana przez Shankar'a i in. ^[41] rozpoczyna się od otrzymania 2-aminonitrofenylometanolu (**25**), który następnie poddano reakcji z 2-cyjanobenzoesanem metylu (**26**) otrzymując pochodną batracyliny (**11**). W wyniku redukcji grupy nitrowej uzyskano BAT (**1**) (wyd. 90%) (Schemat 8).

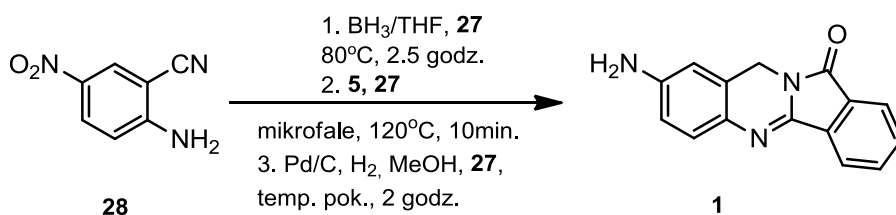


Schemat 8. Synteza BAT (**1**) wg Shankar'a ^[41]

Synteza BAT (**1**) zaproponowana przez Tseng'a i in. ^[42] prowadzona była z zastosowaniem promieniowania mikrofalowego w nie mieszającym się z wodą i chemicznie stabilnym jonowym roztworze [b-3C-im][NTf₂] (**27**) (Rysunek 3) pozwalającym na uzyskanie BAT (**1**) z wyd. 81% (Schemat 9).



Rysunek 3. Struktura chemiczna jonowego roztworu [b-3C-im][NTf₂] (**27**) ^[42]

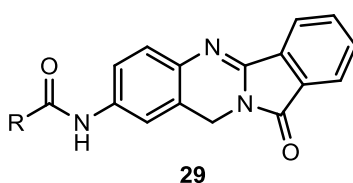


Schemat 9. Synteza BAT (**1**) wg Tseng'a ^[42]

2.1.5. Analogi batracyliny – synteza i aktywność biologiczna

Ograniczenia w chemioterapeutycznym wykorzystaniu BAT, wynikające głównie z jej słabej rozpuszczalności w wodzie i dużej toksyczności, sprawiły, że dalsze badania skupiły się na projektowaniu oraz syntezie nowych analogów, charakteryzujących się lepszymi właściwościami farmakologicznymi ^[10].

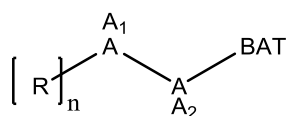
W 1990 roku otrzymano analogi BAT (**29**) z aminokwasami, di- i tripeptydami (Rysunek 4) ^[43]. Ulegały one jednak szybkiej enzymatycznej degradacji za pomocą peptydazy.



R = Gly, Ala, Leu, Ile, Val, Ser
R = dipeptydy, tripeptydy

Rysunek 4. Struktura chemiczna analogów BAT z aminokwasami i peptydami (**29**) ^[43]

Dwa lata później zostały opatentowane analogi BAT zawierające w swojej strukturze pierścień fukozy (**30**). Charakteryzowały się one nie tylko lepszą rozpuszczalnością w wodzie, ale także korzystniejszymi właściwościami biologicznymi (Rysunek 5) ^[44].

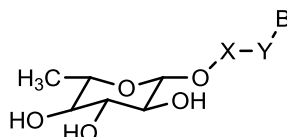


30

AA₁ i AA₂ - aminokwasy D- lub L- (Ala, Val, Leu, Ile, Nva, Gly, Phe)

n = 0-2

R =



gdzie:

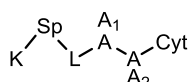
X - alkilen lub arylen

Y - CO, NH, O

B - wiązanie lub reszta diacyłowa kwasu dikarboksylowego

Rysunek 5. Struktura chemiczna analogów BAT z pierścieniem fukozy (**30**) ^[44]

Zaprojektowano i zsyntezowano serię połączeń cytostatyków (w tym BAT) z cukrami (Rysunek 6) ^[45] oraz z tiokarbonyłowymi aminokwasami (Rysunek 7) ^[46]. Otrzymane związki wykazywały lepszą rozpuszczalność w roztworach wodnych oraz wyższą selektywność i aktywność cytotoksyczną w porównaniu do BAT ^[45,46].

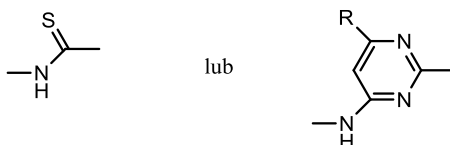


31

Cyt - cytostatyki np. batracylina, metotreksat, chinolon-a, etopozyd, melfalan, taksol, kamptotecyna, daunomycyna, dokсорubicyna

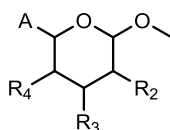
AA₁ i AA₂ - reszta aminokwasowa o konfiguracji D- lub L-, np.: Ala, Lys, Gly, Ser, Orn, Val, Glu, Tyr,

L =



Sp - arylen w pozycji *ortho*, *meta*, *para*, posiadający do 4 dodatkowych podstawników, alken liniowy lub rozgałęziony

K - węglowodan o strukturze:

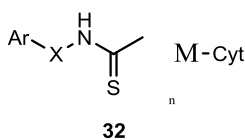


gdzie:

A - metyl, hydroksymetyl, kaboksyester lub amid, alkoksymetyl, acyloksymetyl, ester lub amid karboksyaloksymetylu

R₂, R₃, R₄ - H, hydroksy, alkoksy, kaboksyalkiloksy, hydroksyaloksy, aminoalkiloksy, acyloksy i wiele innych.

Rysunek 6. Struktura chemiczna analogów cytostatyków z cukrami (31) [45]



32

Ar - reszta aryłowa, zawierająca takie podstawniki jak: alkil, alkoksyl, alkoksykarbonyl, hydroksyl, karboksyl, karboksyaloksyalkil, nityl, grupa nitrowa, halogen i inne

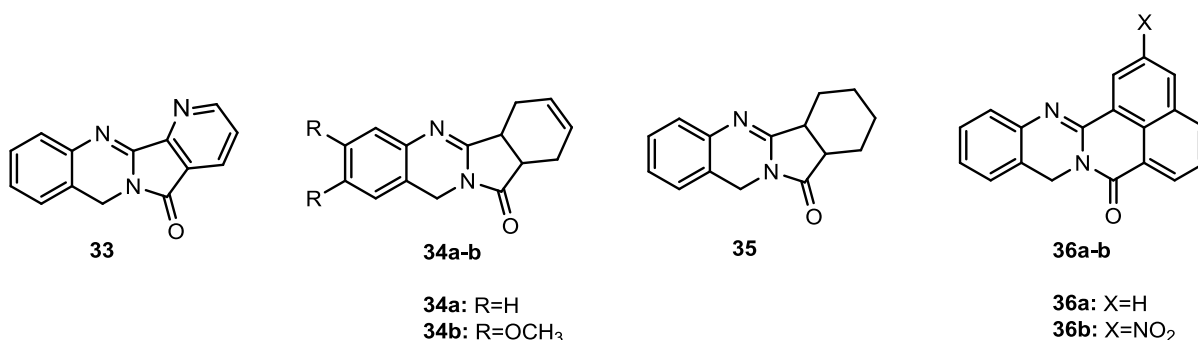
X - bezpośrednie wiązanie lub reszta alkilenowa do 6 atomów węgla

M - mono- di-, tr- lub tetrapptyd

Cyt - cytostatyki np. batracylina, chinolon-a, metotreksat, etopozyd, daunomycyna, dokсорubicyna, taksol i inne

Rysunek 7. Analogi cytostatyków z ugrupowaniem tiokarbonylowym (32) [46]

W 1993 roku rozpoczęto poszukiwania związku, który byłby strukturalnie podobny do BAT (1), lecz posiadałby mniejszą toksyczność. Zaproponowano analogi (33-36), w których modyfikacji uległy pierścień D (33-35) lub pierścienie C i D (35) (Rysunek 8) [47].

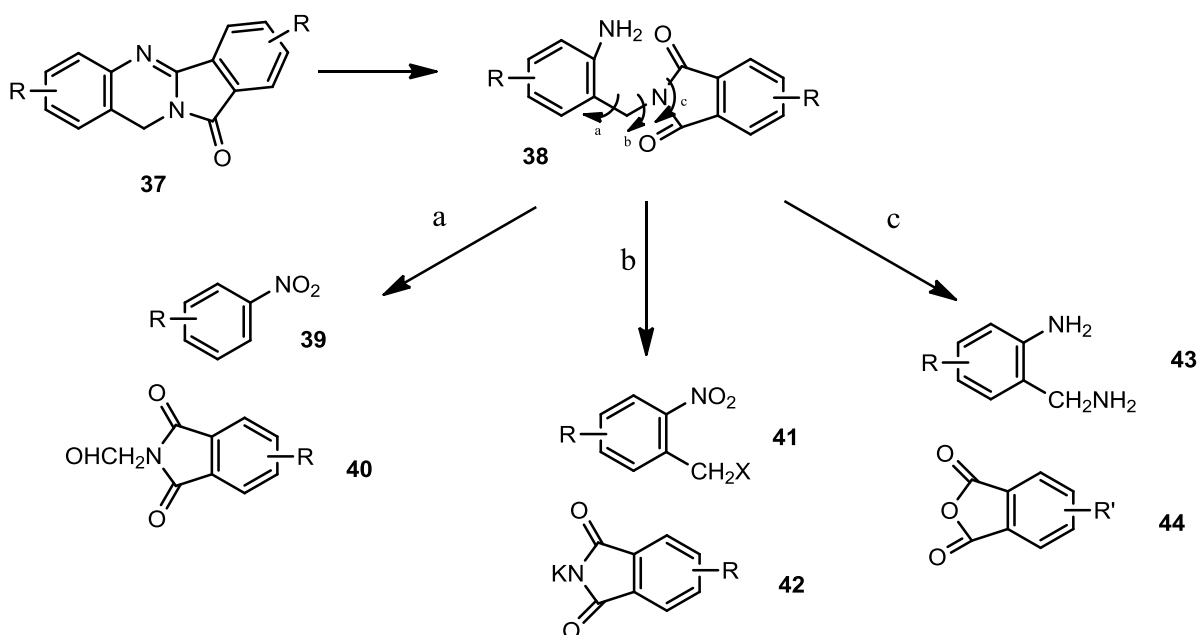


Rysunek 8. Analogi BAT (**33-36a-b**), w których zmodyfikowano pierścień A, C i /oraz D ^[47]

Utworzenie systemu pierścieniowego izoindolo[1,2-*b*]chinazolin-12(10*H*) (**37**) (Schemat 10) uzyskano następującymi metodami:

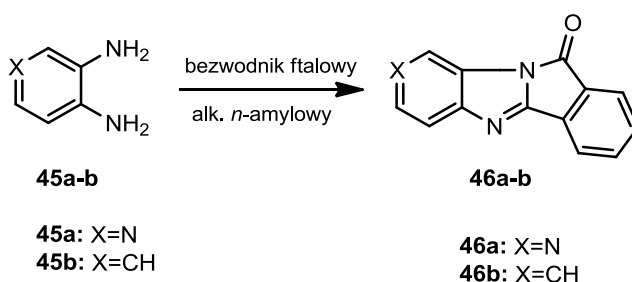
- metoda a: kondensacja podstawionego nitrobenzenu (**39**) z *N*-(hydroksymetylo)-ftalimidem (**40**), poprzedzona redukcją i cyklizacją;
- metoda b: kondensacja odpowiedniego halogenku podstawionego 2-nitrobenzylu (**41**) z solą potasową podstawionego ftalimidu (**42**), poprzedzona redukcją i cyklizacją;
- metoda c: kondensacja podstawionej 2-aminobenzylaminy (**43**) z podstawionym bezwodnikiem ftalowym (**44**), poprzedzona cyklizacją produktu pośredniego.

Wszystkie związki z wolną grupą aminową wykazały aktywność biologiczną w testach *in vitro* na linii HL-60 oraz hamowały aktywność topoizomerazy II. Sugerowało to, że metaboliczne reakcje substytucji mogą prowadzić do powstania związków o pożądanej aktywności biologicznej. Otrzymane dane wskazują, że mechanizm aktywności przeciwnowotworowej BAT nie opiera się wyłącznie na oddziaływaniu z kompleksem rozszczepialnym DNA-topoizomeraza II ^[47].

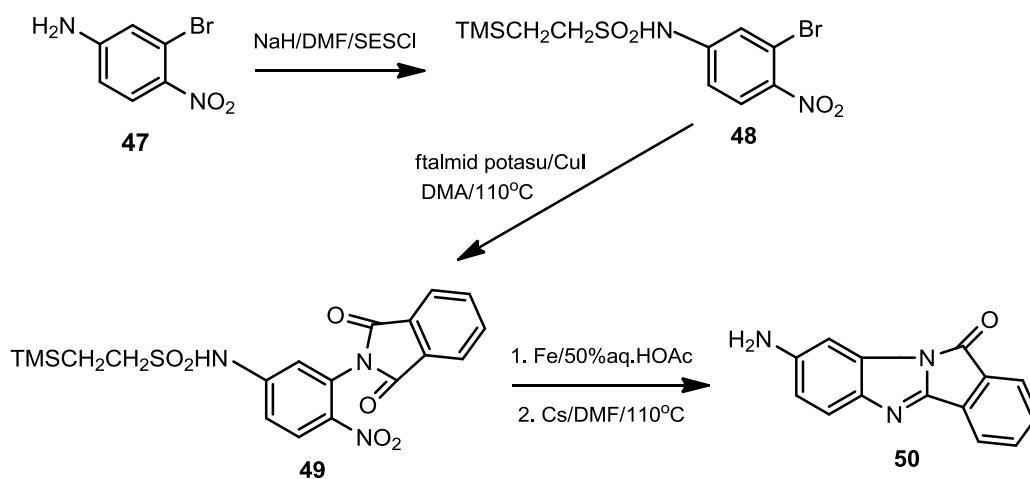


Schemat 10. Tworzenie pierścienia izoindolo[1,2-*b*]chinazolin-12(10*H*) (**42**)^[47]

Izoindolo[2,1-*a*]benzimidazole (**46**) oraz benzimidazolowy analog BAT (**50**) stanowią kolejne przykłady pochodnych BAT wykazujących dobrą aktywność cytotoksyczną (Schemat 11 i 12). Badania prowadzone na: liniach ostrych białaczek limfoblastycznych T-komórkowych CCRF-CEM, kompleksie rozszczepialnym topoizomeraza II-DNA oraz hepatocytach komórek szczurzych nie potwierdziły właściwości mutagennych wspomnianych pochodnych. Może to przyczynić się do stwierdzenia, że właściwości mutagenne BAT wynikają z obecności wolnej grupy aminowej^[38].

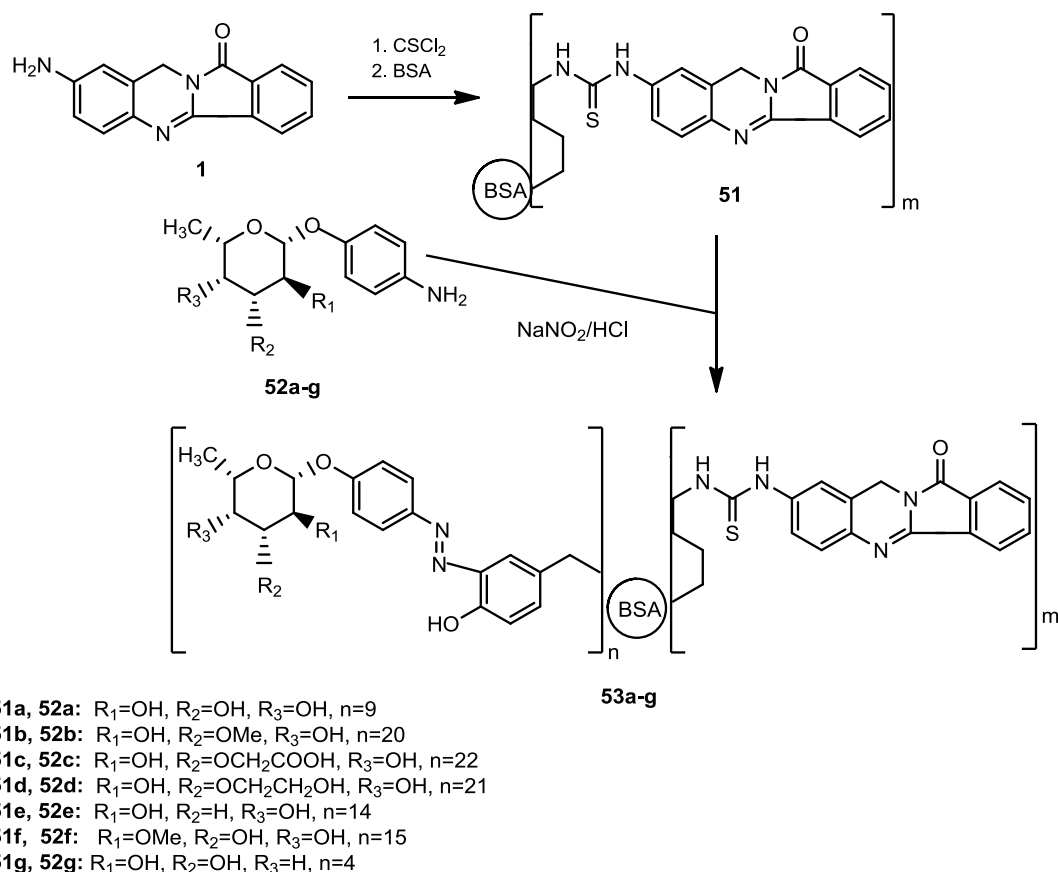


Schemat 11. Synteza izoindolo[2,1-*a*]benzimidazolu (**46**)^[38]



Schemat 12. Synteza benzimidazolowego analogu BAT (**50**) wg Meegalla ^[38]

W 1999 roku opublikowano pochodne BAT, których synteza polegała na połączeniu BAT z tiofosgenem, a następnie z lizyną, która zawierała BSA. W kolejnym etapie otrzymany koniugat (**51**) poddano reakcji z aminofenyloglikozydem lub jego pochodnymi (**52a-g**) (Schemat 13). Zsyntezowane pochodne (**53a-g**) nie wykazały aktywności cytotoksycznej w badaniach prowadzonych na linii SW480 ^[48].



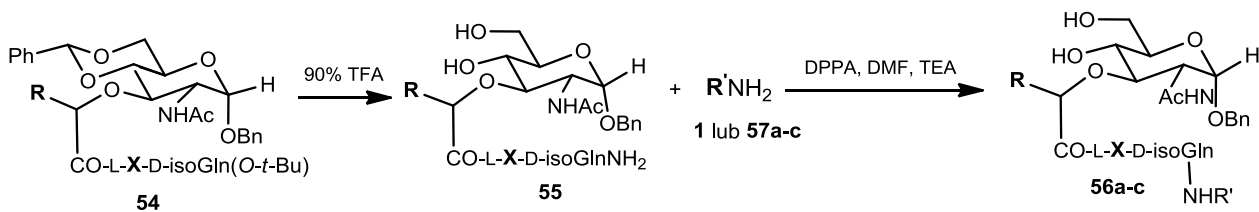
Schemat 13. Synteza analogów BAT z BSA (**53a-g**)^[48]

Dzierzbicka^[40] przedstawiła wyniki pracy dotyczące syntezy nowych koniugatów MDP i nor-MDP zmodyfikowanych w części peptydowej batracyliną lub jej pochodnymi (Schemat 14). Otrzymane koniugaty (**56a-c**) poddano badaniom aktywności biologicznej w NCI oraz GUMed.

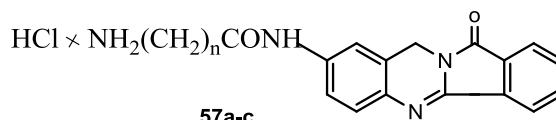
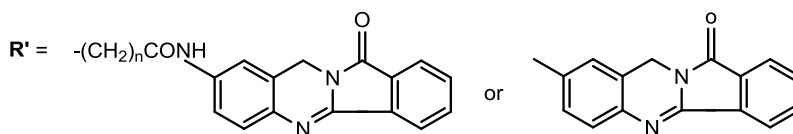
Z oznaczeń przeprowadzonych w NCI wynikało, że w badanym zakresie stężeń (10^{-4} - 10^{-8}) koniugaty są nieaktywne. Celem badań w GUMed było oznaczenie immunomodulujących właściwości związków (**56a, 56c, 56e, 56h**) wobec subpopulacji leukocytów krwi obwodowej hodowanych w obecności komórek linii: K562, WEHI 164 oraz Ab/Ma. W przypadku linii nowotworowej WEHI 164 związek (**56a**) przyczynił się do znacznego obniżenia żywotności komórek po 4- i 24-godzinnej inkubacji w hodowli z dodatkiem monocytów oraz po 12-godzinnej inkubacji w hodowli z dodatkiem PBL, w porównaniu do batracyliny.

Ponadto, za pomocą cytometru przepływowego wykonano pomiar frakcji sub-G1 oraz rozdział elektroforetyczny na żelu agarozowym badanego DNA. Otrzymane wyniki

pokazują, że przyczyną śmierci komórek nowotworowych linii K562 i Ab/Ma jest nekroza, zaś w przypadku linii WEHI 164 zaobserwowano zjawisko występowania apoptozy [49].



gdzie:
R=H, CH₃
X=Ala, Val, Pro
n=2,3,5



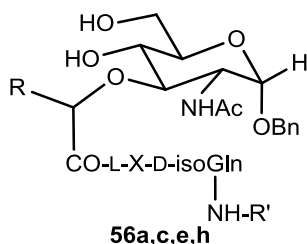
57a-c

57a: n=2

57b: n=3

57c: n=5

Schemat 14. Otrzymywanie koniugatów MDP lub nor-MDP (**56a-c**) z BAT (**1**) lub jej pochodnymi (**57a-c**) [40]

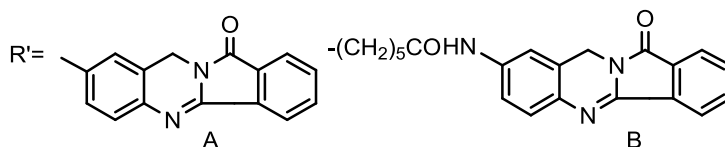


56a: R=CH₃, X=Ala, R'=A

56c: R=H, X=Ala, R'=A

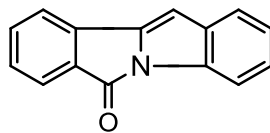
56e: R=CH₃, X=Val, R'=A

56h: R=CH₃, X=Pro, R'=B



Rysunek 9. Struktura chemiczna pochodnych MDP-BAT (**56a**, **56c**, **56e**, **56h**) [49]

Opublikowane w 2006 roku pochodne izoindolo[2,1-*a*]indol-6-onu (**56**) stanowią obszerną grupę związków będących analogami BAT (Rysunek 10) ^[50].

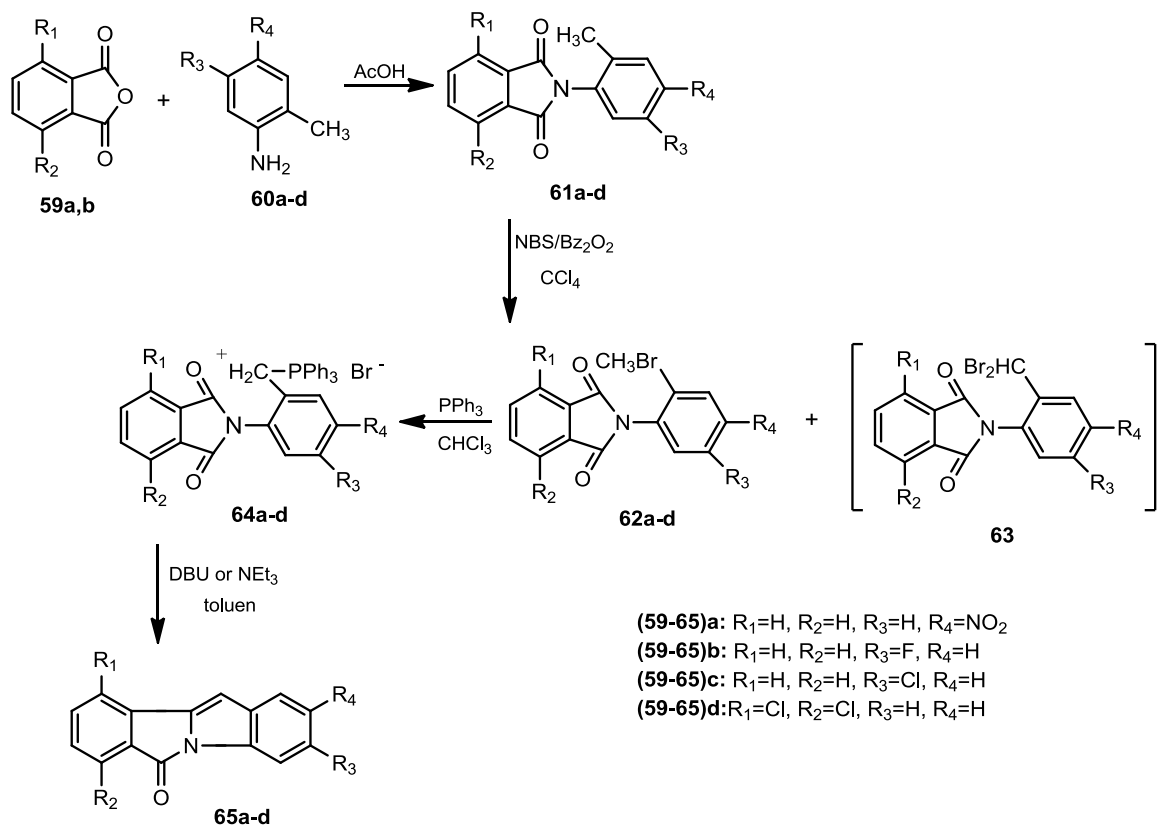


56

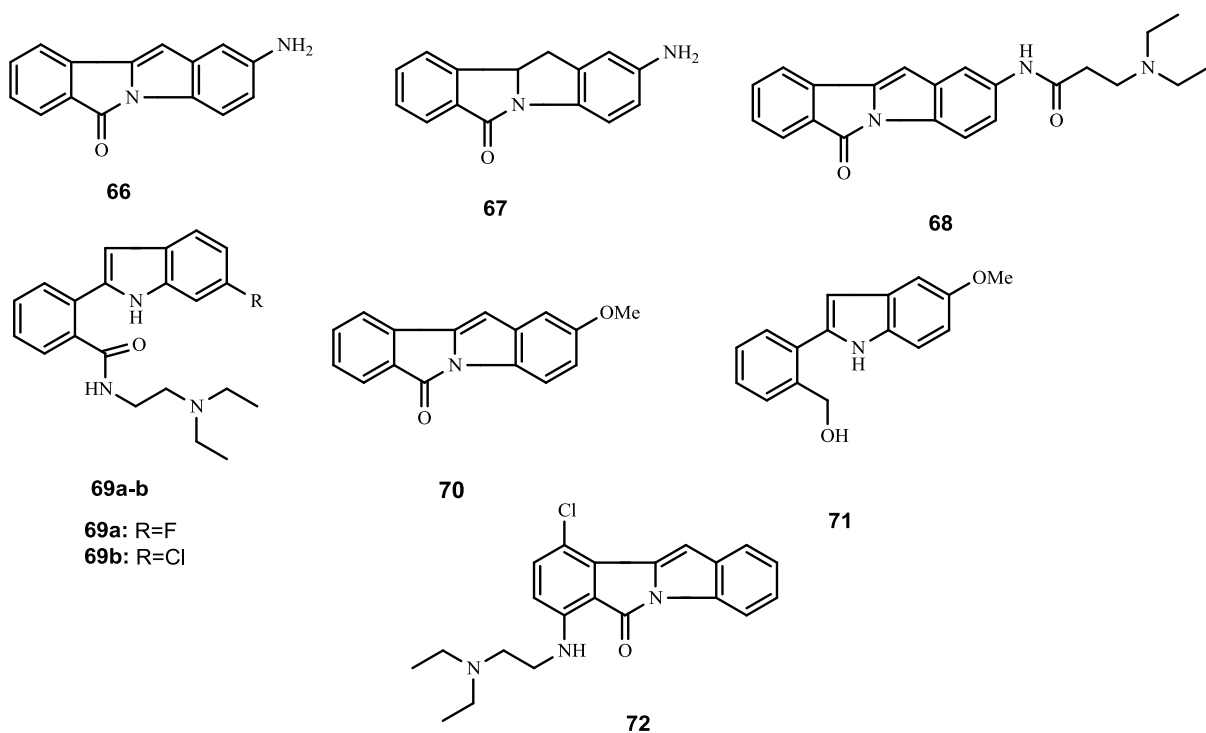
Rysunek 10. Struktura chemiczna izoindolo[2,1-*a*]indol-6-onu (**56**) ^[50]

Synteza tych analogów bazowała na wewnątrzcząsteczkowej reakcji Wittig'a. Odpowiednie bezwodniki ftalowe (**59a, b**) poddano reakcji z pochodnymi aniliny (**60a-d**) otrzymując podstawione ftalimidy (**61a-d**), które następnie bromowano, uzyskując (**62a-d**). W reakcji (**64a-d**) z DBU otrzymano pochodne izoindolo[2,1-*a*]indol-6-onu (**65a-d**) (Schemat 15), które w dalszych reakcjach chemicznych dały analogi (**66-72**) (Rysunek 11).

W przeprowadzonych testach biologicznych badano aktywność analogów (**66-72**) w hamowaniu ludzkiej topoizomerazy typu I i II. Jak wykazano, żaden ze związków nie posiadał właściwości charakterystycznych dla tego typu inhibitorów. Jedynie w przypadku analogów (**66**), (**68**) i (**72**) zaobserwowano aktywność, porównywalną do działania etopozylu. Związek (**68**) przy większym stężeniu okazał się toksyczny. W badaniach *in vitro* prowadzonych na komórkach L1210 oraz HT-29 analogi (**66-69a,b**) i (**72**) nie wykazały lepszej aktywności cytotoksycznej w porównaniu do adriamycyny czy kamptotecyny ^[50].

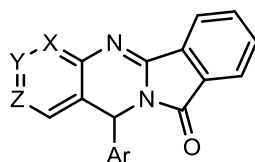


Schemat 15. Synteza pochodnych BAT (**65a-d**)^[50]



Rysunek 11. Struktury chemiczne analogów (**66-72**)^[50]

Rok później opisano syntezę azowych pochodnych batracyliny. Pierścień anilinowy **A** zastąpiono pirydynowym (Rysunek 12). Na Schemacie 16 przedstawiono kolejne etapy syntezy otrzymywania pochodnych (**97-99**)^[51].



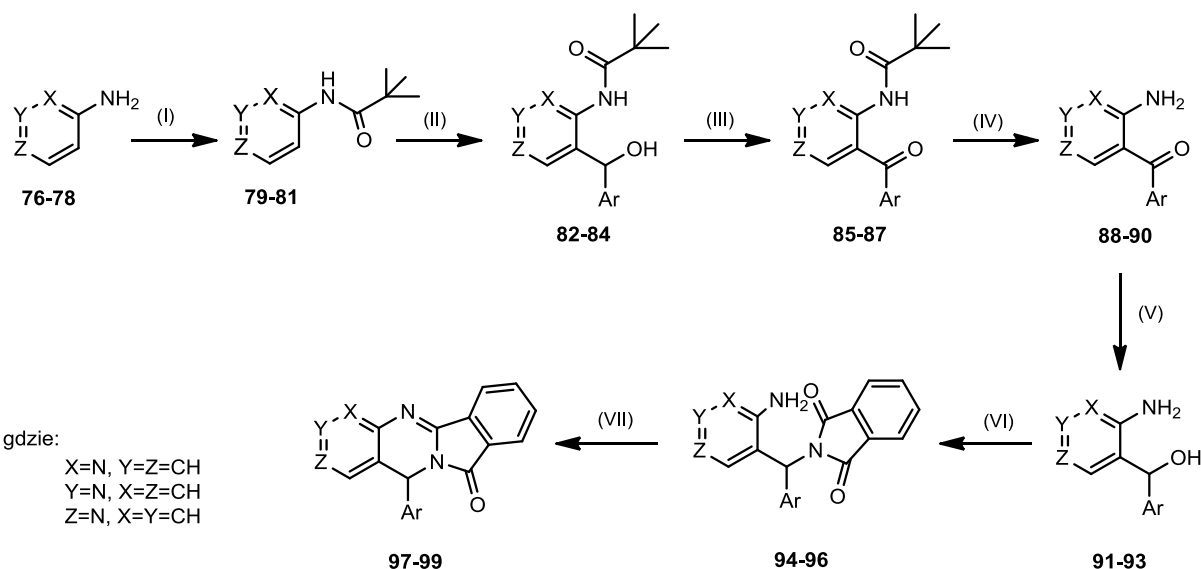
73-75

73: X=N, Y=Z=CH

74: Y=N, X=Z=CH

75: Z=N, X=Y=CH

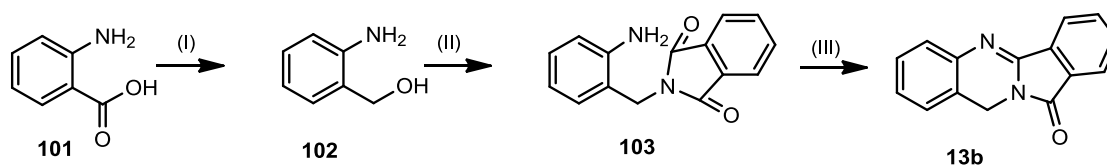
Rysunek 12. Azowe pochodne batracyliny (**73-75**)^[51]



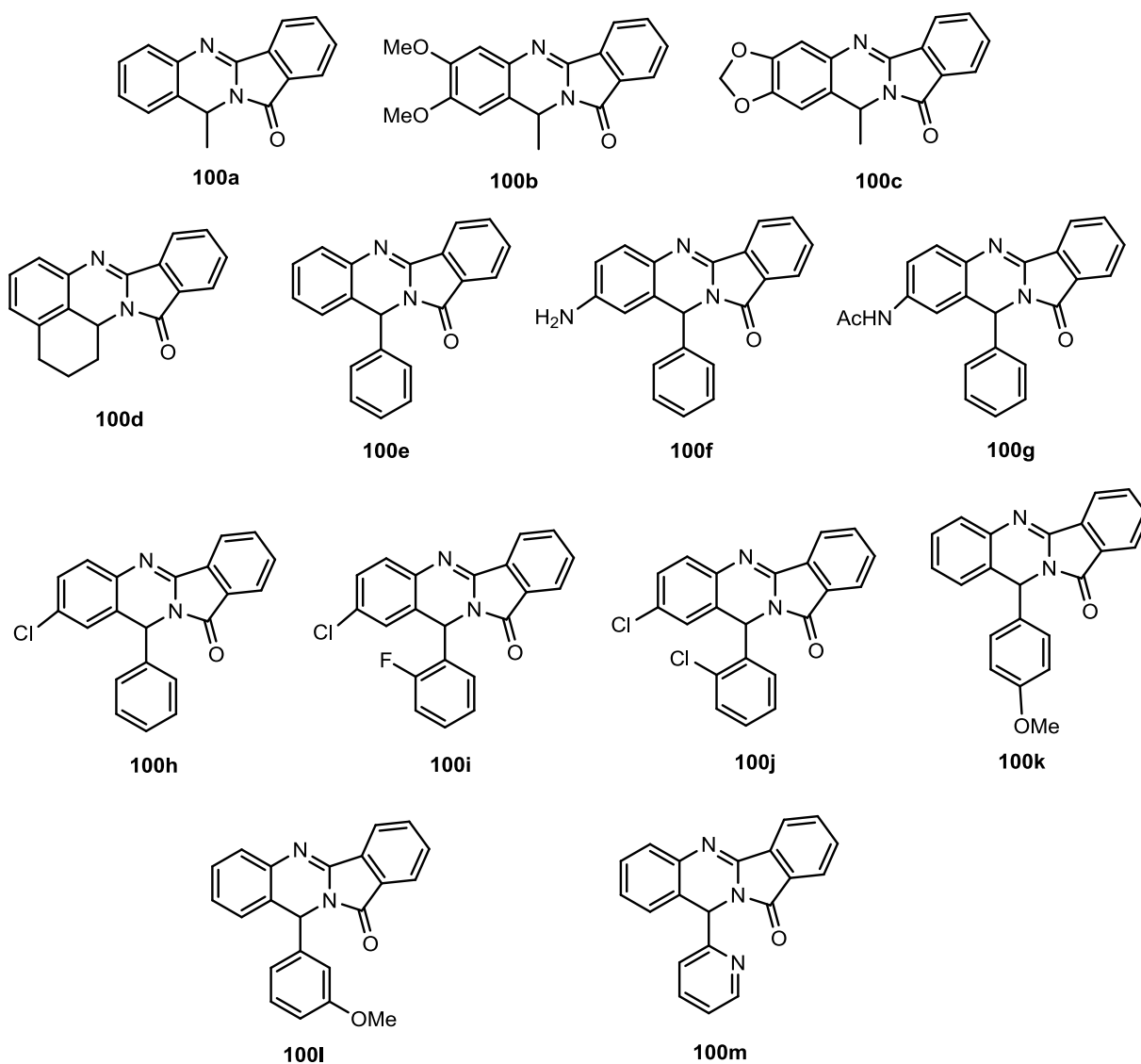
Schemat 16. Reagenty i warunki: (I) Me_3CCOCl , Et_3N , $\text{THF}/\text{Et}_2\text{O}$, 0°C ; (II) (1) $n\text{-BuLi}$, TMEDA , Et_2O , od -70°C do -20°C ; (2) ArCHO ($n-1$), THF od -70°C do t. pok.; (III) MnO_2 , CH_2Cl_2 , t. pok.; (IV) HCl 3 M, 95°C ; (V) NaBH_4 , EtOH ; (VI) ftalimid, DEAD lub DIAD , PPh_3 , THF , t. pok.; (VII) PTSA , PhMe ^[51]

Duża grupa analogów BAT (**100a-m**) (Rysunek 13), których synteza opiera się na reakcji Mitsunobu^[52] została opublikowana w 2008 roku^[12]. Jej kluczowym etapem było powstanie 2-ftalimidometyloaniliny oraz reakcja cyklodehydratacji, w wyniku której

otrzymano serię analogów z różnymi podstawnikami w pozycji 7, 8, 9 oraz 10 (Schemat 17) ^[12].

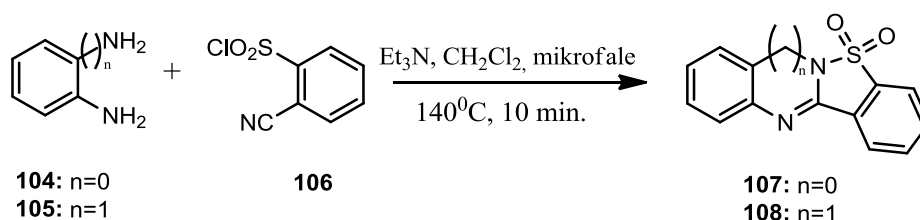


Schemat 17. Synteza pochodnej (**13b**). Reagenty i warunki: (I) NaBH₄, EtOH; (II) ftalimid, DEAD lub DIAD, PPh₃, THF, temp. pok.; (III) THF, temp. pok. ^[12]



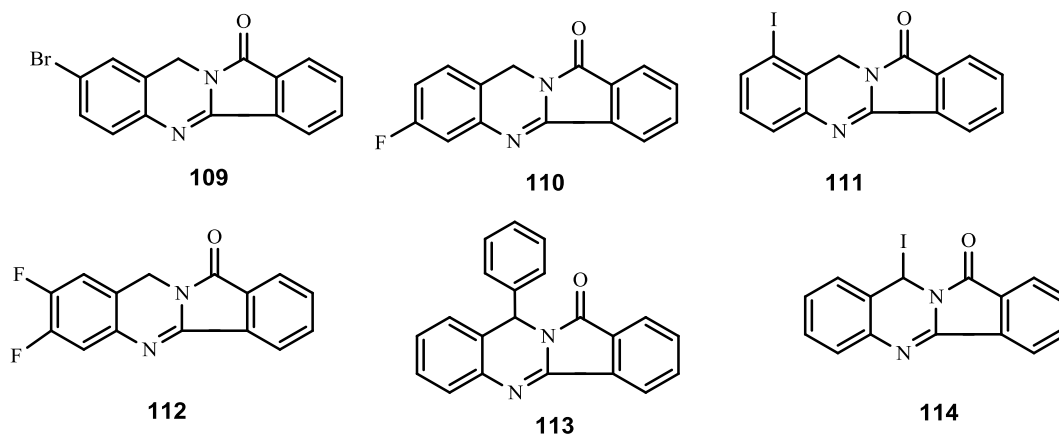
Rysunek 13. Struktury chemiczne analogów (**100a-m**) ^[12]

Rok później amerykańska grupa badawcza przedstawiła otrzymywanie 5-tio-4*b*,10-diazoindeno[2,1-*a*]inde-5,5-ditlenku (**107**) oraz 10*H*-11-tio-5,10*α*-diazobenzo[*b*]fluoreno-11,11-ditlenku (**108**) będących kolejnymi pochodnymi BAT. Synteza prowadzona była w obecności mikrofal i polegała na reakcji chlorku 2-cyjanobenzosulfonylu (**106**) z fenylenodiaminą (**104**) lub 2-aminobenzylodiaminą (**105**) (Schemat 18) ^[54].

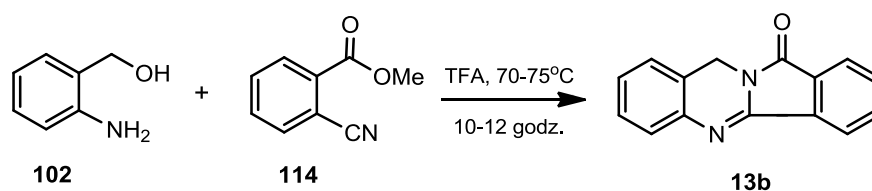


Schemat 18. Synteza (**107**) oraz (**108**) wg Cole'a ^[54]

Dobłą metodą syntezy analogów BAT z różnie podstawionymi pierścieniami C i D (**109-113**) (Rysunek 14) ^[41] jest wykorzystanie 8-deaminobatracyliny (**13b**), którą otrzymano w reakcji cyklizacji alkoholu 2-aminobenzylowego (**102**) z benzoesanem 2-cyjanometylowym (**114**) (Schemat 19).

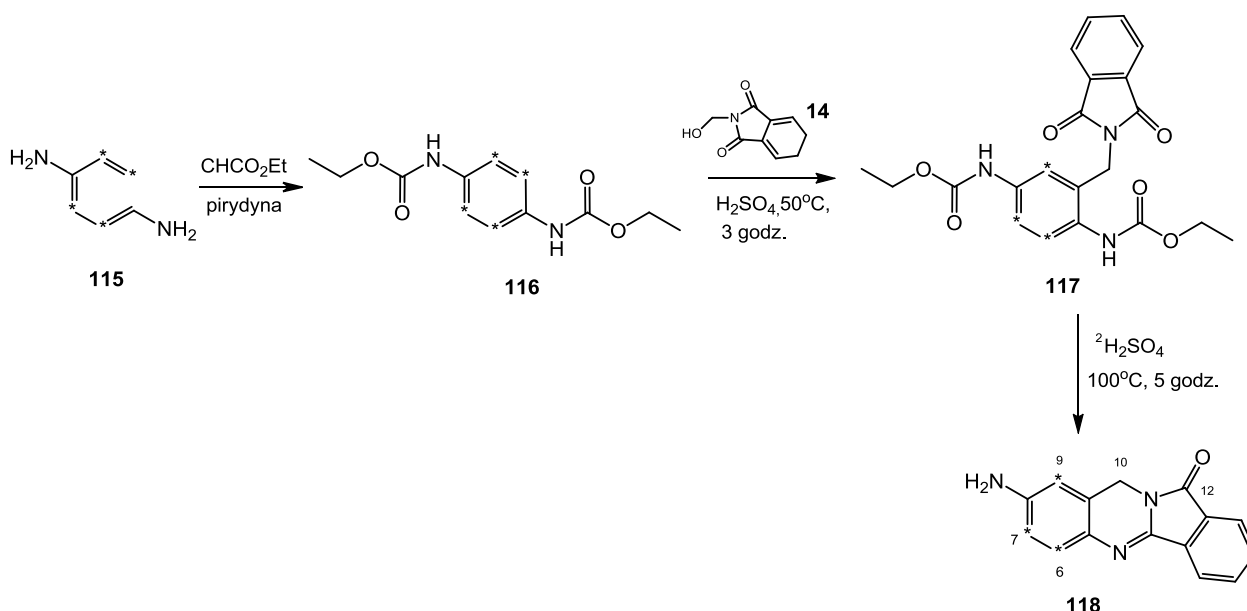


Rysunek 14. Struktury chemiczne analogów (**109-114**) ^[41]



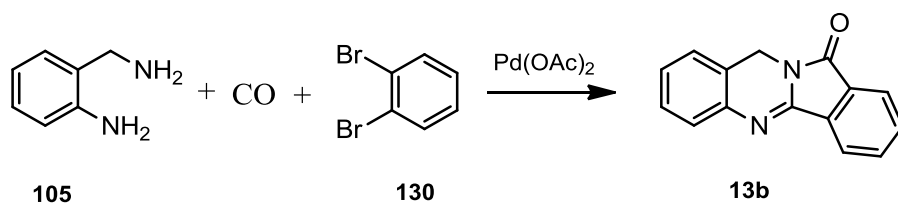
Schemat 19. Synteza 8-deaminobatracyliny (**13b**) ^[41]

W 2011 roku opisano syntezę znakowanej BAT (**118**) (Schemat 20) ^[55] zawierającej 28% deuteru. Analiza przy użyciu spektrometru mas wykazała różnice w zawartości deuteru w poszczególnych etapach syntezy. Związek wyjściowy (**115**) zawierał 74% d₄, związek (**116**) 84% d₄ zaś znakowana BAT (**118**) 72% d₄.

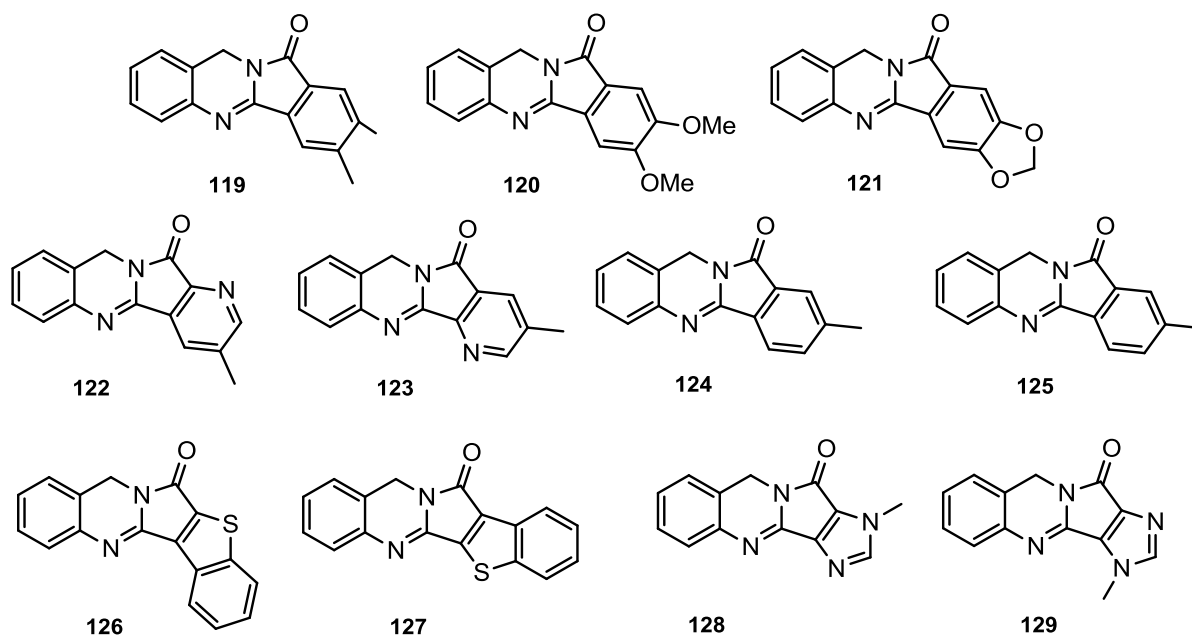


Schemat 20. Synteza znakowanej BAT (**118**) ^[55]

W 2014 roku zespół Chen'a ^[56] przedstawił katalizowaną palladem syntezę izoindolochinazolinonów (**119-129**) (Rysunek 15) otrzymanych w wyniku dekarbonylacji 1,2-dibromobenzenów (Schemat 21) ^[56].

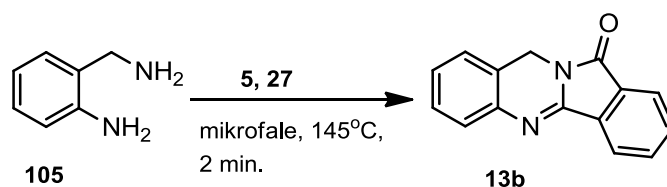


Schemat 21. Otrzymywanie 8-deaminobatracyliny (**13b**) wg Chen'a ^[56]

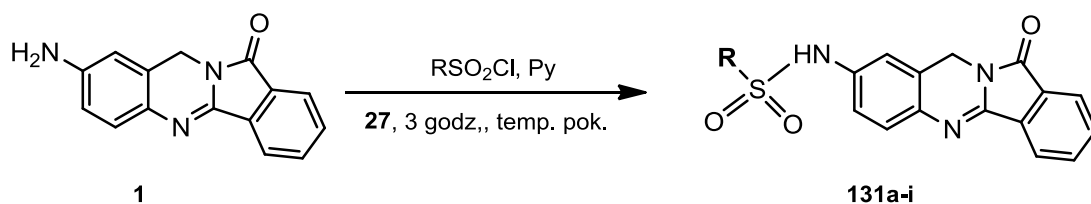


Rysunek 15. Struktury chemiczne analogów **119-129** ^[56]

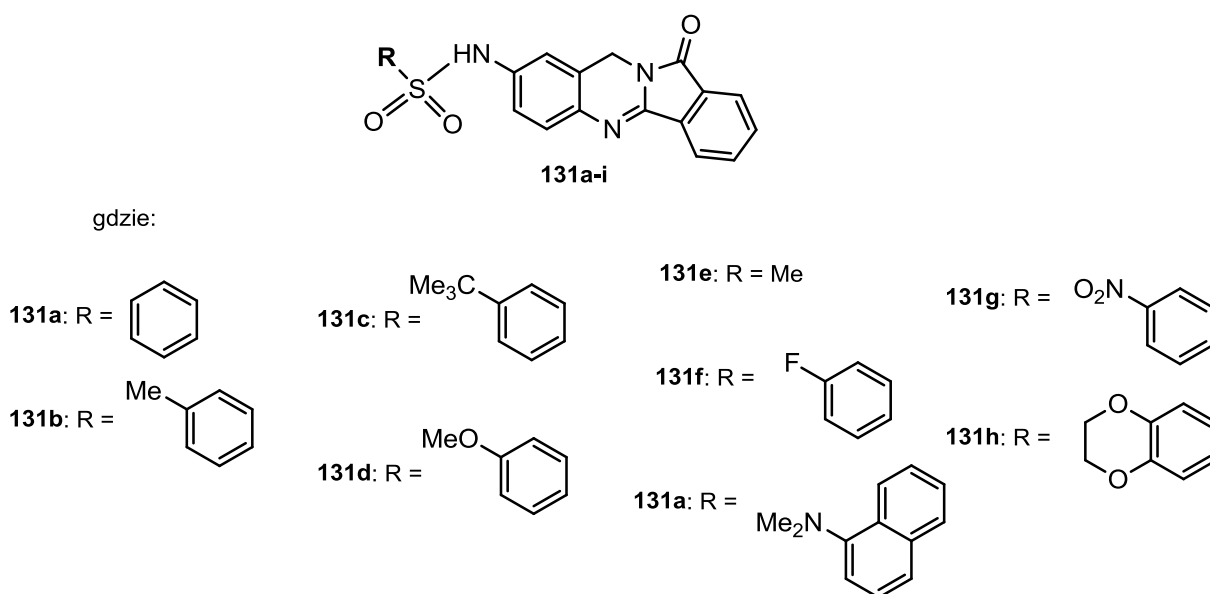
Tseng i in. ^[42] otrzymali 8-deaminobatracylinę (**13b**) (Schemat 22) oraz *N*-sulfonylamidowe analogi batracyliny (**131a-i**) (Schemat 23) w jonowym roztworze [b-3C-im][NTf₂] (**27**). Otrzymane związki hamowały aktywność topozomerazy typu II ^[42].



Schemat 22. Synteza 8-deaminobatracyliny (**13b**) wg Tseng'a ^[42]



Schemat 23. Synteza *N*-sulfoamidowych analogów BAT (**131a-i**)^[42]



Rysunek 16. Struktury chemiczne *N*-sulfoamidowych analogów BAT (**131a-i**)^[42]

Struktury chemiczne otrzymanych i badanych w pracy analogów zbudowane są z batracyliny połączonej wiązaniem amidowym z pochodnymi tuftsyny/retro-tuftsyny oraz z adenozyną. Poniżej przedstawię krótką charakterystykę wspomnianych wyżej związków.

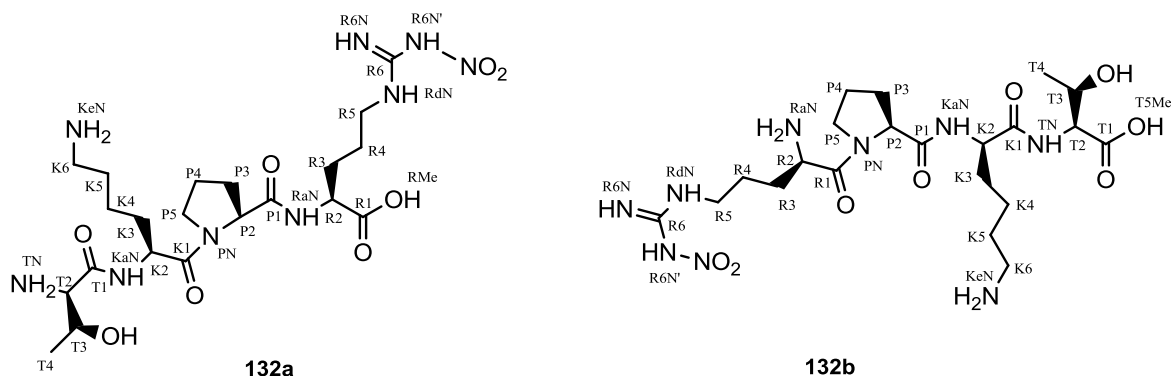
2.2. Tuftsyna (Thr-Lys-Pro-Arg, TKPR)

2.2.1. Struktura chemiczna i właściwości biologiczne

Tuftsyna (Thr-Lys-Pro-Arg, TKPR) (**132a**) jest tetrapeptydem wyselekcjonowanym w 1970 roku przez Nijjar'a i Nioshioka (Uniwersytet Tufts, Boston, USA)^[57,58]. Retro-tuftsyna jest peptydem o odwróconej sekwencji: Arg-Pro-Lys-Thr (**132b**) (Rysunek 17)^[57].

Tuftsyna (**132a**) charakteryzuje się krótkim połowicznym czasem degradacji w organizmie, wynoszącym około 16 min. Jest ona łatwo degradowana pod wpływem

licznych proteaz, np. aminopeptydazy leucytowej, karboksypeptydazy B czy subtylizyny, nie ulega natomiast rozpadowi pod wpływem: trypsyny, chymotrypsyny, papainy czy pepsyny. Produktami hydrolizy enzymatycznej tuftsyny są dwa tripeptydy: Thr-Lys-Pro oraz Lys-Pro-Arg, wykazujące działanie inhibujące w stosunku do wyjściowego tetrapeptydu [57].



Rysunek 17. Struktura chemiczna tuftsyny (**132a**) oraz retro-tuftsyny (**132b**) [57]

Tuftsyna jest jednym z najmniejszych naturalnych immunomodulatorów, występującym we krwi człowieka i innych ssaków [60]. Aktywuje ona monocyty, makrofagi i neutrofile. Sama aktywowana jest wyłącznie w formie wolnego peptydu stanowiącego fragment domeny (289-292) łańcucha ciężkiego F_c immunoglobuliny typu G, z którego uwalniana jest za pomocą dwóch specyficznych enzymów: endokarboksypeptydazy tuftsunowej śledziony i leukokininazy [61,62].

2.2.2. Aktywność biologiczna tuftsyny

Tuftsyna wykazuje szeroką aktywność biologiczną. Poprzez wiązanie się do specyficznych receptorów tuftsynowych obecnych na powierzchni komórek efektorowych układu immunologicznego, omawiany tetrapeptyd aktywuje szereg funkcji m.in. aktywację fagocytozy granulocytów i makrofagów oraz zwiększa ruchliwość oraz cytotoksyczności tych komórek [61, 63-65]. Posiada ona zdolność indukcji pinocytozy, jak również wybuchu tlenowego fagocytów [66-74]. Wpływa na wydzielanie cytokin IL-1, IL-6 oraz TNF- α [69], posiada zdolność do regulowania cyklu komórkowego PMBC i PMN oraz poprawia komunikację pomiędzy elementami układu immunologicznego [58]. Udowodniono,

że poprzez aktywację procesów immunologicznych może w sposób pośredni wpływać na układ nerwowy [70-74].

Tuftsyna wykazuje działanie przeciwbakteryjne, przeciwnowotworowe i przeciwwirusowe. W terapii wielolekowej przejawia działanie synergistyczne. Jej dodatek pozwala na zmniejszenie skutecznej dawki niektórych leków oraz na poszerzenie spektrum ich działania [61]. Umieszczona na powierzchni liposomów zawierających antybiotyki (amfoterycyna B, rifampicyna, nystatyna) zwiększa specyficzne wiązanie tych nośników z komórkami fagocytującymi oraz ich aktywność cytotoksyczną [75,76]. Podawanie tuftsyny, przy jednoczesnym przyjmowaniu leku polienowego (nystatyny) podnosi jego aktywność przeciwgrzybową [77].

Niedobór tuftsyny obserwuje się u chorych na AIDS czy ARC (AIDS-related complex) [78], białaczkę Hodgkina czy anemię sierpowatą [61]. Badania prowadzone na ludziach wykazały zależność między prawidłowo funkcjonującą śledzioną a aktywnością tuftsyny. U osobników z wyciętą śledzioną, zauważono niekorzystny dla organizmu nabyty deficyt tuftsyny wiążący się z osłabieniem układu immunologicznego oraz zwiększoną podatnością na infekcje [61]. Aktywność i stężenie tuftsyny jest niższe w przypadku marskości wątroby [79].

Badania prowadzone na myszach wykazały m.in., że fragment H-Thr-Lys-Pro-OH podany zarówno przed, jak i po wywołaniu śródmózgowego krwotoku, znacznie redukuje wielkość urazu oraz degradację komórek nerwowych [80,81]. Ten sam fragment tuftsyny wykorzystano jako czynnik regulujący aktywację komórek mikroglejowych oraz makrofagów [82].

Do innych aktywności biologicznych tuftsyny można zaliczyć: działanie przeciwbólowe [83], zdolność inhibicji hydrolazy tyrozynowej [84, 85], hamowanie kurczenia się mikronaczynek limfatycznych [86] czy zdolność modyfikacji aktywności monoaminooksydazy i acetylocholino esterazy w synaptosomalnych i komórkowych frakcjach mitochondrialnych pozyskiwanych z kory mózgowej [87]. Ponadto, posiada właściwości przeciwzakrzepowe oraz łagodzi objawy głodu narkotycznego [88]. Profilaktyczne i terapeutyczne podawanie tuftsyny powoduje ograniczenie owrzodzenia oraz szybsze wygojenie chorej tkanki [89].

2.2.3. Synteza tuftsyny

Syntezę tuftsyny prowadzi się najczęściej metodą klasyczną w roztworze z wykorzystaniem EEDQ lub DCC jako odczynników kondensujących. Często stosowana jest również metoda mieszanych bezwodników lub estrów aktywnych [61].

Przy wyborze odpowiedniej metody syntezy brane są pod uwagę: koszt, wydajność, prostota wykonania, czas reakcji, łatwość wprowadzania i usuwania grup ochronnych, czystość otrzymanego produktu oraz możliwość zwiększenia skali syntezy [61, 90]. Poniżej przedstawiłam dwie najczęściej stosowane metody syntezy.

Synteza na fazie stałej (SPPS)

Pierwszy aminokwas z wolną grupą karboksylową zostaje połączony z nierozpuszczalnym polimerem. Następnie syntetyzuje się cały łańcuch peptydowy od C-końca. W tym celu *N*-chroniony aminokwas poddaje się reakcji z reaktywną grupą polimeru, z tak powstałego związku usuwa się ochronę grupy α -aminowej. Otrzymany aminoacylopolimer przereagowuje z następnym *N*-chronionym aminokwasem. Ostatni etap syntezy polega na rozszczepieniu wiązania kowalencyjnego między C-końcowym aminokwasem zsyntetyzowanego łańcucha peptydowego, a grupą na nośniku, z którym był związany. Nierozpuszczalny nośnik można oddzielić od znajdującego się w roztworze polipeptydu przez odsączenie. Zaletą tej metody są niewielkie straty czysto mechaniczne oraz brak konieczności oczyszczania produktów pośrednich [91,92].

Synteza na nośniku stałym znalazła m.in. zastosowanie do otrzymania analogów tuftsyny z wiązaniem izopeptydowym [94] czy do łączenia fragmentów nośnikowych bazujących na sekwencji tuftsyno-podobnej, z peptydowym epitopem otoczki wirusa HSV [95]. Metoda syntezy, zaproponowana w 2002 roku, wykorzystuje przepuszczalny woreczek polipropylenowy (typu „tea-bag”), który można włożyć do naczynia w celu przyłączenia określonego Fmoc chronionego aminokwasu przy użyciu HOBt czy HBTU jako odczynnika kondensującego. Uwolnienie końcowego peptydu zachodzi po użyciu mieszaniny TFA/EDT/anizol [96].

Synteza w roztworze

Synteza klasyczna przebiega w roztworze w fazie homogenicznej. Uzyskane produkty pośrednie są oczyszczane, a po zakończeniu syntezy przeprowadzana jest deprotekcja grup ochronnych. Do odczynników kondensujących powszechnie stosowanych można zaliczyć DCC oraz estry aktywne, oparte na metodologii bezwodników mieszanych lub trimerycznych chlorków fosfonitrylowych ^[93]. Na przykład synteza tuftsyny przy użyciu estru aktywnego 5-chloro-8-hydroksychinoliny ^[95].

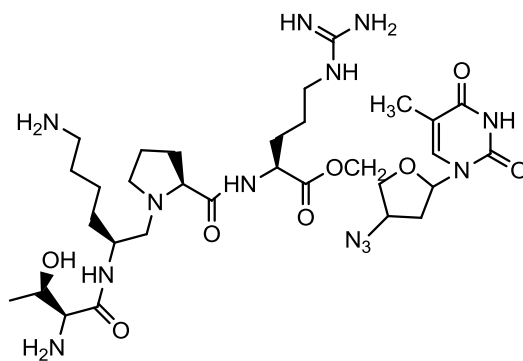
Na uwagę zasługuje synteza opisana przez Fridkin'a ^[97]. Peptyd zostaje wydłużony od *N*-końca, poprzez zastosowanie polimerycznego aktywnego PHNB ^[97]. Kolejnym przykładem może być synteza wykorzystująca metodę mieszanych bezwodników ^[98].

2.2.4. Analogi tuftsyny

Początkowo modyfikacje dotyczyły zmiany składu aminokwasowego i sekwencji poszczególnych aminokwasów w łańcuchu ^[99] oraz przedłużenia łańcucha peptydowego o kolejne aminokwasy ^[86]. Powstały tioanalogi czy cykliczne analogi, w tym tzw. c-[T-K-P-R-G] wykazujący aktywność biologiczną porównywalną do tuftsyny już przy 50-krotnie niższym stężeniu ^[74]. Ponadto, zsyntezowano szereg oligopeptydów, które okazały się nietoksyczne w stosunku do mysich komórek śledziony ^[100].

Analog tuftsyny o sekwencji: H-Thr-Lys-Pro-Arg(NO₂)-OH w badaniach *in vivo* na mysim modelu sepsy wykazał silne działanie stymulujące aktywność makrofagów i komórek Kupffera w wątrobie i nerkach. Stymulował również aktywność PBMC oraz monocytów krwi obwodowej, a także posiadał zdolność stymulacji sekrecji IL-6 ^[100-102].

W 2005 roku w projektowaniu analogów tuftsyny z AZT wzięto pod uwagę fakt, że makrofagi stanowią jeden z głównych celów wirusa HIV, a receptory tuftsynowe zlokalizowane są właśnie na ich powierzchni. W badaniach *in vitro* wykazano, że otrzymany koniugat (**133**) hamuje aktywność odwrotnej transkryptazy HIV, wykazuje lepsze właściwości immunostymulujące w porównaniu do tuftsyny oraz podobnie jak ona wpływa na wydzielanie IL-1. Kolejne testy potwierdziły jego mniejszą cytotoksyczność wobec limfocytów T, co niesie nadzieję na wykorzystanie tego typu związków w terapii AIDS ^[93].

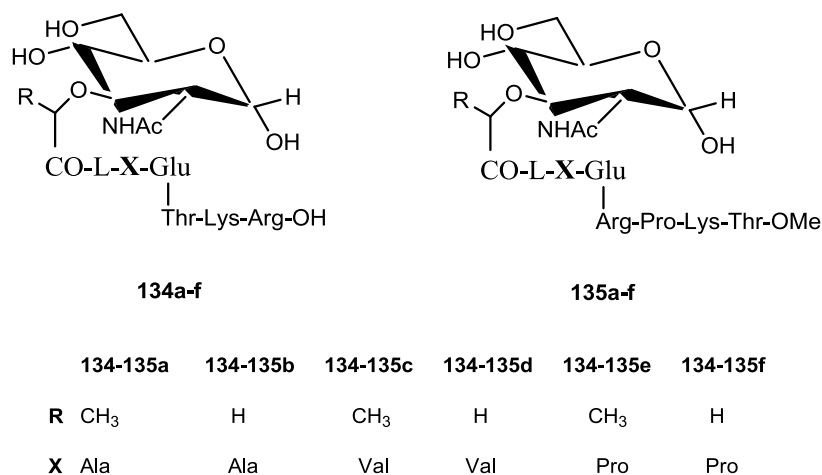


133

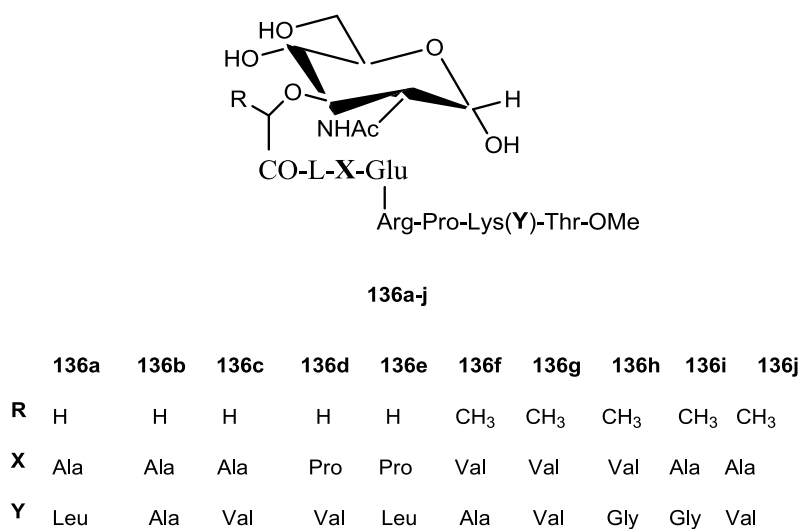
Rysunek 18. Struktura chemiczna koniugatu AZT-tuftsyna (**133**)^[93]

W tym samym roku opublikowano syntezę analogów tuftsyny z MDP i nor-MDP (**134a-f**) (Rysunek 18)^[103]. Przy projektowaniu tej grupy pochodnych wzięto pod uwagę fakt, że w wyniku połączenia związków wykazujących zbliżoną aktywność biologiczną może powstać produkt o lepszych właściwościach farmakologicznych w porównaniu do związków wyjściowych. Synteza analogów (**134a-f**) polegała na acylowaniu chronionej tuftsyny grupą karboksylową izoglutaminy w MDP/nor-MDP. Badania biologiczne potwierdziły działanie cytotoksyczne analogów oraz wydzielanie cytokin: TNF- α i IL-6 przez monocyty i w hodowlach komórek PMBC, PBL^[102, 104].

Ponadto, zsyntezowano grupę analogów tuftsyny/retro-tuftsyny zawierających dodatkowy aminokwas (np. Val, Gly, Ala, β -Ala) na grupie ϵ -aminowej lizyny (**135a-d**) (Rysunek 19) oraz (**136a-j**) (Rysunek 20). Dzięki obecności wiązania izopeptydowego, otrzymane związki mogą okazać się bardziej stabilne metabolicznie, a obecność dodatkowego aminokwasu może przyczynić się podniesienia ich właściwości biologicznych^[103-105].



Rysunek 19. Struktura chemiczna analogów tuftsyny/retro-tuftsyny z MDP/nor-MDP (**134a-f**, **135a-f**)^[103]

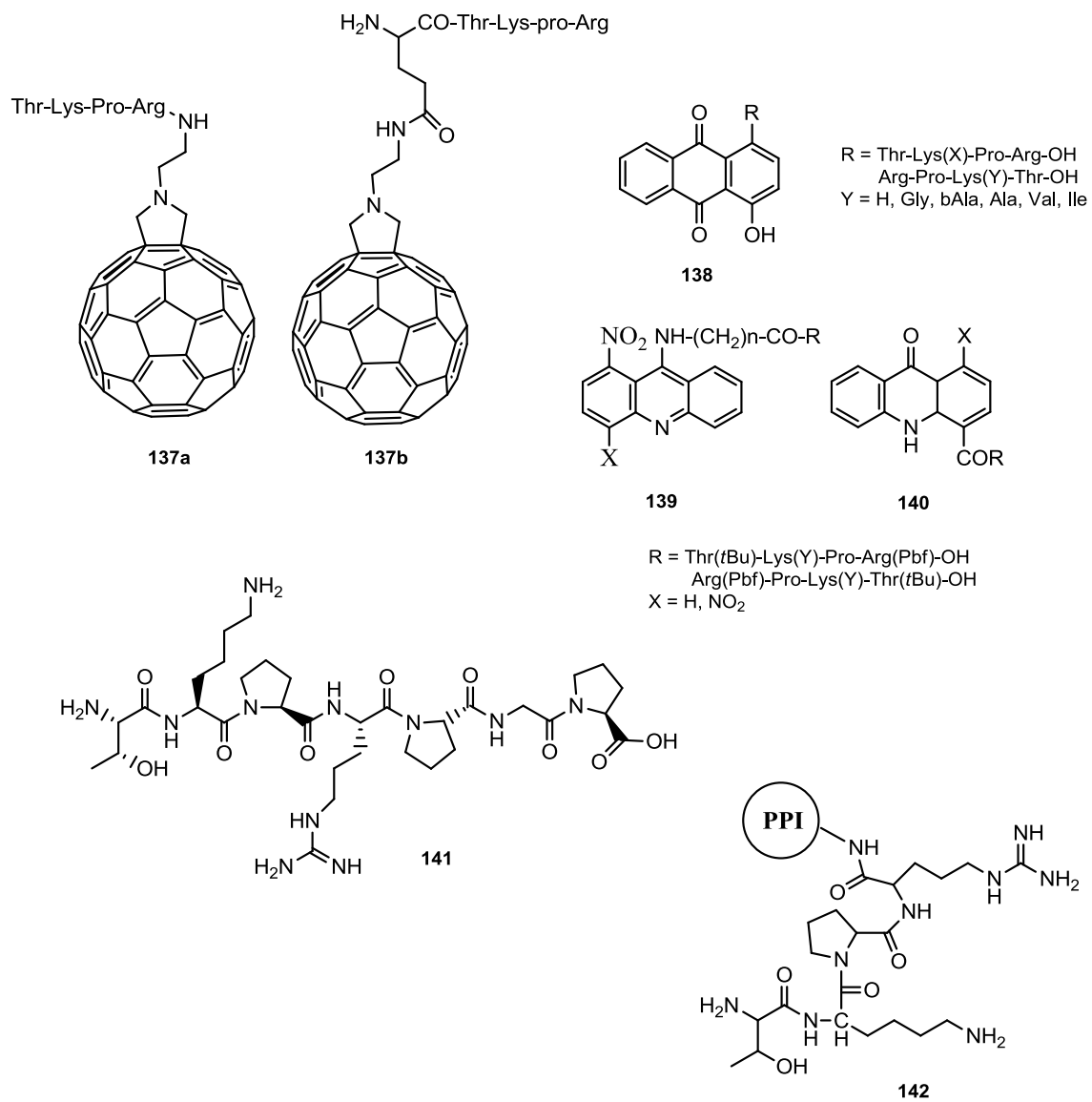


Rysunek 20. Struktura chemiczna analogów MDP/nor-MDP z pochodnymi retro-tuftsyny (**136a-j**)^[103]

W ostatnich latach ukazało się szereg publikacji na temat nowych pochodnych tuftsyny (Rysunek 21). Tuftsynę połączono m.in. z:

- aminokombretastatyną A-4 (amino-CA-4)^[106];
- fulerenem C₆₀ - otrzymane analogi (**137a-b**) były odporne na degradacyjne działanie aminopeptydazy leucynowej oraz silnie stymulowały mysie makrofagi otrzewnowe, poprzez zwiększenie fagocytozy i chemotaksji^[107];

- 1,4-dihydroksyantrachinonem oraz pochodnymi 1-nitroakrydyny i 4-karboksyakrydonu – otrzymane pochodne (**138-140**) charakteryzowały się aktywnością cytotoksyczną na liniach komórkowych ludzkiego niedrobnokomórkowego raka płuc oraz ludzkiej ostrej białaczki promielocytowej ^[108];
- Pro-Gly-Pro – analog Selank (**141**) powstały w wyniku wydłużenia łańcucha tuftsyny na C-końcu o sekwencję Pro-Gly-Pro wykazywał aktywność w testach prowadzonych na komórkach śledziony i hipokampie szczurów. Co więcej, posiadał właściwości przeciwwirusowe oraz hamował aktywność enzymów rozkładających enkefalinę w ludzkiej krwi ^[109,110];
- CA125 – analogi okazały się aktywne m.in. przeciwko nowotworom jelit ^[111];
- kwasami nukleinowymi – otrzymane związki są w trakcie badań biologicznych ^[112];
- fosforylocholiną – fosforylocholina została połączona z cząsteczką tuftsyny wydłużoną na C-końcu o dwa dodatkowe aminokwasy (Gly i Tyr) za pomocą 4-aminofenylofosforylochlorku. Badania biologiczne wykazały, że koniugat tuftsyna-fosforylocholina działa zapobiegawcze wobec zapalenia okrężnicy oraz osłabia rozwój zapalenia kłębuszków nerwowych na modelu mysim ^[113, 114];
- peptydem T połączonym z czterema cząsteczkami tuftsyny. Uzyskany związek pełnił rolę immunomodulatora, aktywując funkcję makrofagów oraz wykazując wysoką inhibicję w stosunku do pooperacyjnego guza resztkowego na modelu mysim ^[115];
- fragmentami wirusa wątroby typu A i E, dzięki czemu mogą powstać szczepionki o większej aktywności i selektywności ^[116];
- związkami pełniącymi rolę biomarkerów (fluoresceina, Gd czy Tb) – pochodne FITS-tuftsyny pełnią rolę markerów fluorescencyjnych wykrywających komórki makrofagowe w układach biologicznych. Pochodne Tb-DOTA-tuftsyny mogą znaleźć zastosowanie jako znaczniki w monitorowaniu przebiegu chorób z udziałem makrofagów. Pochodne Gd-DOTA-tuftsyna stosuje się jako reagenty kontrastujące przydatne w identyfikacji uszkodzeń mózgu ^[117];
- poli(propylenoiminowymi)dendrymerami – PPI połączone z tuftsyną oraz lekiem o aktywności skierowanej przeciwko wirusowi HIV dają pochodną (**142**) wykazującą szereg cech wspomagających leczenie AIDS ^[118].



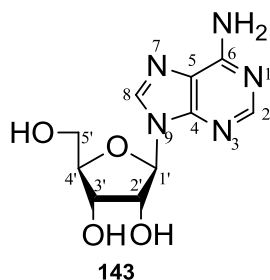
Rysunek 21. Struktury chemiczne niektórych nowych analogów tuftsyny (137-142) ^[107-110, 118]

2.3. Adenozyna

2.3.1. Struktura chemiczna i właściwości biologiczne

Adenozyna (**143**) (ADO) (Rysunek 22) jest nukleozydem purynowym obecnym we wszystkich komórkach organizmu, stanowiącym budulec kwasów nukleinowych oraz biorącym udział w przemianach energetycznych ^[119,120]. W warunkach fizjologicznych poziom ADO w przestrzeni pozakomórkowej utrzymywany jest na stałym, niskim poziomie poniżej 1 μM , aczkolwiek stężenie to może wzrosnąć, nawet do 100 μM , w odpowiedzi na stres metaboliczny ^[121,122]. Odkryto, że adenozyna wykazuje właściwości rozszerzające obwodowe naczynia krwionośne oraz zwalniające rytm serca ^[123].

Adenozyna chroni komórki i tkanki w wyniku wiązania się z czterema podtypami receptorów adenozyny (AR): A₁, A_{2A}, A_{2B} i A₃ należącymi do rodziny receptorów sprzężonych z białkami G ^[121,124]. Co więcej, stanowi czynnik protekcyjny w stanach niedokrwienia i niedotlenienia serca oraz innych tkanek ^[125,126].



Rysunek 22. Struktura chemiczna adenozyny (ADO) (**143**) ^[119]

2.3.2. Receptory adenozyny

Adenozyna obecna w przestrzeni pozakomórkowej wiąże się z receptorami adenozyny zlokalizowanymi w błonach prawie wszystkich komórek organizmu ^[121,124,127]. AR są zbudowane z łańcucha polipeptydowego tworzącego siedem transbłonowych domen o strukturze α helisy, połączonych przez trzy pętle zewnątrzkomórkowe oraz trzy pętle cytoplazmatyczne ^[128]. Receptory adenozyny charakteryzują się odmiennymi właściwościami biochemicznymi, farmakologicznymi oraz dystrybucją tkankową. Ich naturalnym ligandem jest adenozyna. Stymulacja receptorów A_{2A} i A_{2B} prowadzi do aktywacji cyklazy adenylowej (AC) (EC 4.6.1.1) ^[121].

W normalnych warunkach stężenie ADO jest wystarczające by pobudzić receptory A_1 , A_{2A} oraz A_3 . Aktywacja receptora A_{2B} zachodzi tylko w warunkach patologicznych [129]. Ligandem dla receptora A_3 jest również inozyna, wiążąca i aktywująca ten receptor w zakresie stężeń 10 - 50 μM [130]. Inhibitorami receptorów A_1 , A_{2A} , A_{2B} i A_3 są naturalnie występujące metyloksantyny, takie jak kofeina czy teofilina [131].

2.3.3. Metabolizm i transport adenozyiny

Na stężenie adenozyiny w komórce oraz w przestrzeni pozakomórkowej wpływ mają procesy jej syntezy, metabolizmu i transportu przez błony komórkowe [132]. Hydroliza *S*-adenozylohomocysteiny oraz enzymatyczna defosforylacja AMP stanowi główne źródło adenozyiny w komórce. W warunkach dobrego utlenowania duża jej część powstaje z SAH, zaś w trakcie niedokrwienia i hipoksji aktywowana jest przede wszystkim 5'-nukleotydaza [133]. Pozakomórkowym źródłem ADO jest enzymatyczna hydroliza nukleotydów purynowych [134-136].

Stres metaboliczny przyczynia się do gwałtownego podniesienia poziomu adenozyiny w przestrzeni pozakomórkowej [137], tym samym wpływając na jej transport [138]. Istnieją dwa rodzaje systemu transportu nukleotydów przez błonę cytoplazmatyczną. Pierwszy - transport bierny nośnikowy (ENT), zgodny z gradientem stężeń, drugi - transport Na^+ , niezależny od gradientu stężenia nukleotydu (CNT) [139].

Wyróżnia się cztery typy białek ENT. ENT1 i ENT2 są selektywne zarówno wobec nukleotydów purynowych, jak i pirymidynowych [140]. hENT3 ma podobną specyficzność substratową do hENT2, nie transportuje jednak hipoksantyny [141]. hENT4 jest wybiórczy tylko wobec adenozyiny, ale transportuje także różne kationy organiczne [142]. hENT1, hENT2 oraz hENT4 są zlokalizowane w błonie cytoplazmatycznej, zaś hENT3 znajdują się wewnątrz komórki, częściowo w późnych endosomach i lizosomach, ale także w mitochondriach [141-143].

Wśród transporterów przemieszczających nukleotydy z jonami sodu do wnętrza komórki niezależnie od gradientu stężeń nukleotydu (CNT), zidentyfikowano sześć izoform, z których na dzień dzisiejszy tylko trzy zostały wyizolowane: CNT1, CNT2 i CNT3 [144]. Ich podział oparty jest na specyficzności substratowej i wrażliwości na inhibitory [145]. CNT1 transportuje nukleotydy pirymidynowe i wykazuje powinowactwo do adenozyiny, CNT2 odpowiada za transport nukleotydów purynowych oraz urydyny, zaś CNT3 przemieszcza zarówno nukleotydy purynowe jak i pirymidynowe [146, 147].

2.3.4. Analogi i koniugaty adenozyiny

Ograniczenia związane z krótkim czasem półtrwania adenozyiny we krwi, sprawiły, że część badań została skierowana w kierunku modyfikacji jej struktury, co mogłoby pozwolić na otrzymanie analogów o lepszych właściwościach farmakologicznych.

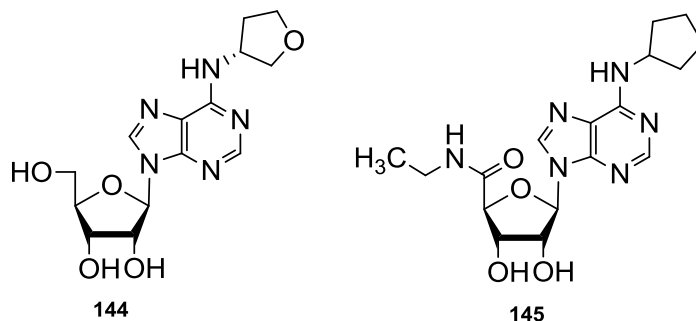
2.3.4.1. Analogi działające poprzez receptory A₁

Związki o działaniu przeciwartrytmicznym

Zwiększenie selektywności w stosunku do receptora A₁ uzyskano poprzez modyfikację adenozyiny za pomocą grup alkilowych, cykloalkilowych oraz aryloalkilowych [148]. N⁶-podstawione lipofilowe pochodne adenozyiny, takie jak Selodenoson i Tecadenoson charakteryzujące się znacznie dłuższym czasem półtrwania, mogą stanowić alternatywę dla adenozyiny jako leki przeciwartrytmiczne w PSVT.

Selodenoson (**144**) (Rysunek 23) jest pochodną adenozyiny powstałą w wyniku zamiany grupy metylohydroksylowej na N-etylouromamid w cząsteczce rybozy oraz przyłączeniu podstawnika cyklopentylowego w pozycji N⁶. Jego działanie polega na kontroli rytmu serca bez konieczności obniżania ciśnienia krwi i osłabiania kurczliwości mięśnia sercowego [149].

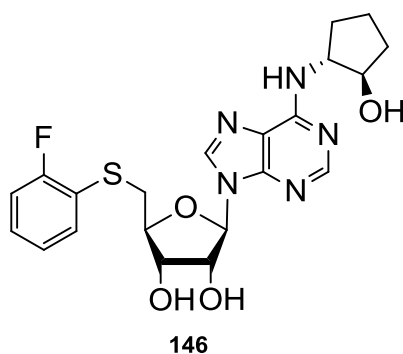
Tecadenoson (CVT-510, **145**) (Rysunek 23), pochodna adenozyiny, w której w pozycji N⁶ występuje podstawnik tetrahydrofuranylowy. Tecadenoson (**145**) jest związkiem selektywnym dla receptorów A₁, przywracającym normalny rytm serca bez wywoływania poważniejszych skutków ubocznych [125, 150].



Rysunek 23. Struktury chemiczne Selodenosonu (**144**) i Tecadenosonu (**145**) [149, 150]

Związki wykorzystywane w leczeniu cukrzycy typu II

GS 9667 (CVT-3619, **146**) (Rysunek 24), związek z podstawnikiem 2-hydroksycyklopentylowym w pozycji N^6 oraz 2-fluorofenylotiometylowym w cząsteczce rybozy, będący selektywnym, częściowym agonistą receptora A_1 . Jego działanie opiera się na obniżeniu poziomu wolnych kwasów tłuszczowych we krwi ^[151].



Rysunek 24. Struktura chemiczna GS 9667 (CVT-3619) (**146**) ^[151]

2.3.4.2. Analogi działające poprzez receptory A_{2A}

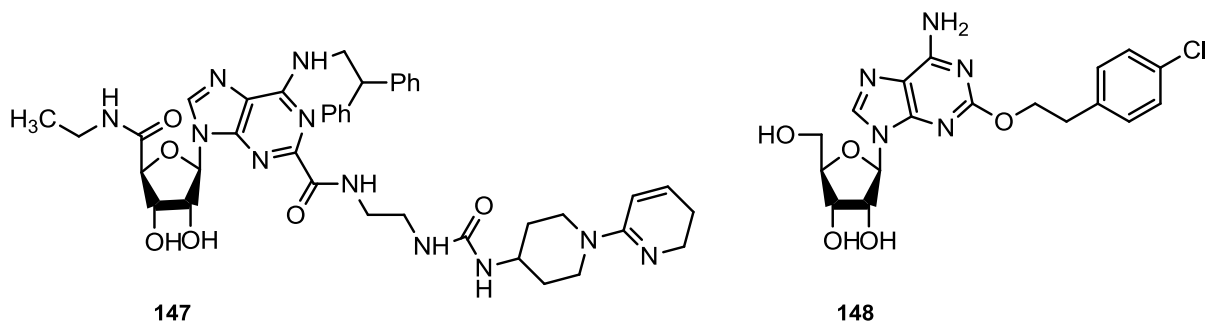
Związki o działaniu immunomodulującym

Aktywacja receptorów A_{2A} wpływa na funkcje neutrofilów – hamowanie degranulacji i syntezy ponadtlenków. Ponadto, następuje obniżenie produkcji czynnika martwicy nowotworu typu α przez monocyty i makrofagi oraz zahamowanie przylegania neutrofilów do komórek śródbłonnka naczyń ^[152, 153].

Pochodne tej grupy przebadano pod kątem potencjalnych właściwości immunologicznych:

- UK-432097 (**147**) (Rysunek 25) – lek stosowany w leczeniu przewlekłej obturacyjnej choroby płuc;
- Sonedenoson (MRE-0094, **148**) (Rysunek 25) – lek indukujący gojenie wrzodów w zespole stopu cukrzycowej.

Powyższe pochodne znajdują się w II fazie badań klinicznych ^[126, 154].

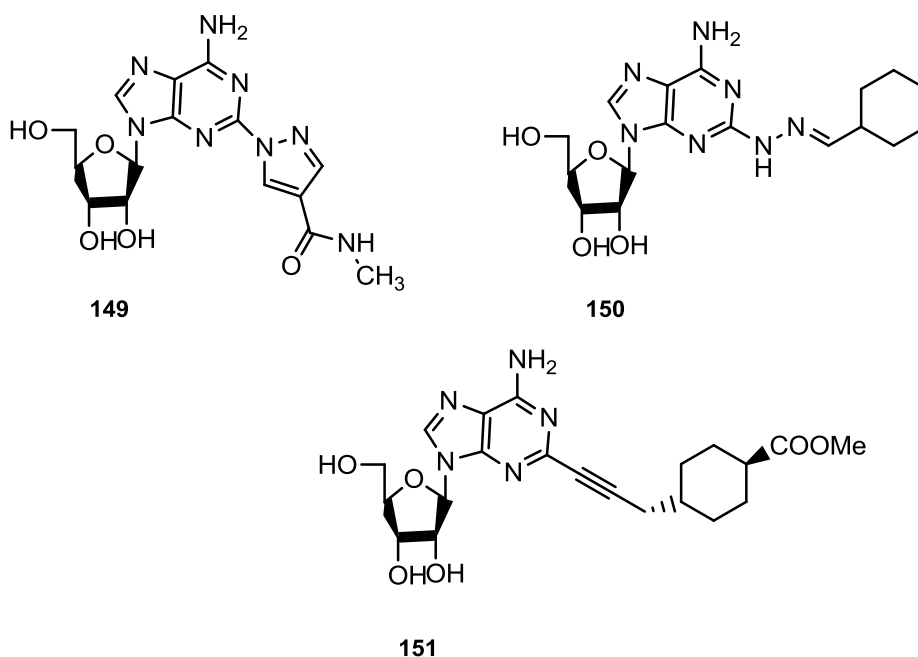


Rysunek 25. Struktury chemiczne (**147**) i (**148**) ^[126, 154]

Związki o działaniu rozszerzającym naczynia krwionośne

Do tej klasy związków można zaliczyć:

- Regadenoson (Lexiscan®), Astellas Pharma US, Inc., **149**) (Rysunek 26) – lek wykazujący niskie powinowactwo do receptorów A_{2A} i porównywalną skuteczność do adenozyiny. Dożylne jego podanie pozwala na maksymalne rozszerzenie naczyń, przy jednoczesnym zminimalizowaniu skutków ubocznych w tkankach o większej gęstości receptorowej ^[155].
- Binodenoson (CorVue™), King Pharmaceuticals, **150**) (Rysunek 26) – związek wywołujący mniej skutków ubocznych niż adenozyina. Jednakże, w związku z nieścisłościami dot. wyników badań klinicznych FDA zablokował jego rejestrację ^[156, 157].
- Apadenoson (Stedivaze™, ATL46e, **151**) (Rysunek 26) – związek znajdujący się obecnie w III fazie badań klinicznych. Wykazał się obiecującymi efektami u pacjentów z astmą i przewlekłą obturacyjną chorobą płuc ^[148, 157].



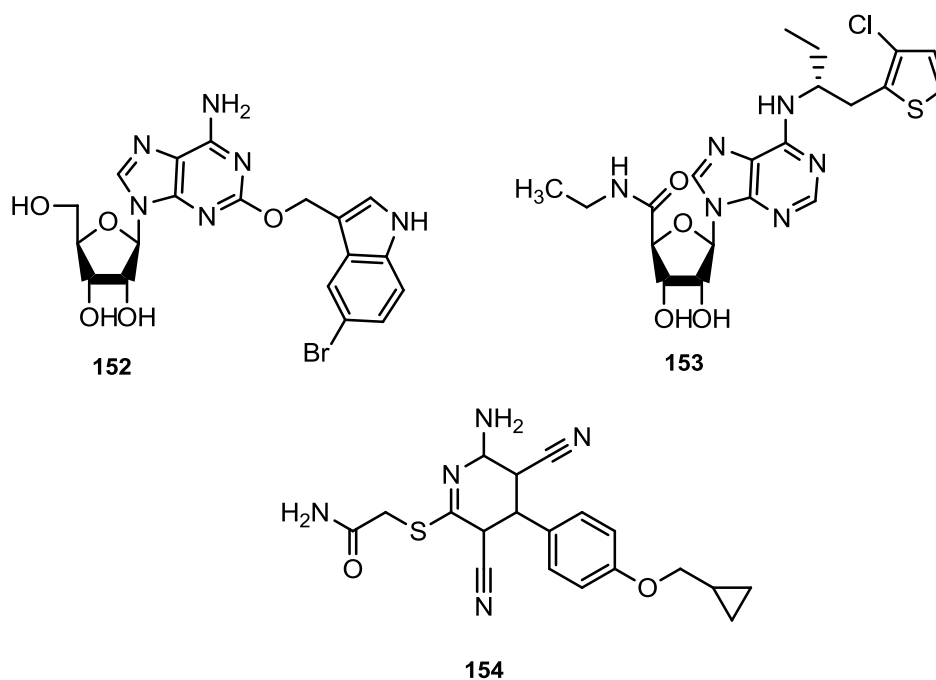
Rysunek 26. Struktury chemiczne (**149**), (**150**) i (**151**) ^[155-157]

2.3.4.3. Analogi działające poprzez receptory A_{2B}

Związki będące agonistami receptora A_{2B} pełnią w organizmie funkcję ochronną serca, płuc i nerek przed uszkodzeniami spowodowanymi dłuższym niedokrwieniem. Mają one potencjalne zastosowanie w leczeniu choroby wieńcowej dzięki hamowaniu agregacji płytek krwi oraz działaniu rozszerzającemu na naczynia krwionośne ^[158-160].

Rola receptorów A_{2B} w chorobach układu oddechowego nie jest do końca poznana. Wiadomo, że w trakcie ostrego uszkodzenia płuc wzrasta poziom pozakomórkowej adenozyiny. Wyniki badań wskazują na ochronną rolę agonistów A_{2B} AR oraz na patologiczne działanie podwyższonego poziomu adenozyiny ^[161,162].

Do innych potencjalnych zastosowań agonistów A_{2B} należy zaliczyć: leczenie zaburzenia erekcji, stymulację wzrostu włosów, ochronę przed stwardnieniem kłębuszków nerkowych oraz działanie lecznicze w zaparciach poprzez wpływ na motorykę jelit ^[163-166].



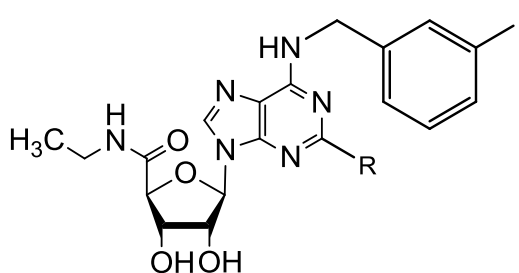
Rysunek 27. Struktury chemiczne agonistów A_{2B} AR : MRS3997 (**152**), AMP579 (**153**), BAY 60-6583 (**154**)^[166]

2.3.4.4. Analogi działające poprzez receptory A_3

Do tej grupy pochodnych należy zaliczyć: IB-MECA (CF101, Can-Fite Biopharma, (**155**) oraz jego 2-chloro-analog Cl-IB-MECA (CF102, **156**) (Rysunek 28) charakteryzujące się dobrą selektywnością w stosunku do receptorów A_3 występujących u szczurów.

IB-MECA (**155**) stosuje się u pacjentów z łuszczycą, chorobą Crohna czy reumatoidalnym zapaleniem stawów^[167]. Badania kliniczne (II faza) na pacjentach z łuszczycą zwykłą pokazały bezpieczeństwo, dobrą tolerancję i skuteczność doustnie przyjmowanego związku^[168].

Cl-IB-MECA (**156**) obecnie znajduje się w fazie I/II badań klinicznych jako związek przeciwnowotworowy u pacjentów z zaawansowanym rakiem wątrobowo-komórkowym oraz w tej samej fazie badań u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C^[169, 170].



155: R = H: IB-MECA (CF101)
156: R = Cl: Cl-IB-MECA (CF102)

Rysunek 28. Struktury chemiczne (**155**) i (**156**)^[167, 170]

2.3.4.5. Koniugaty adenozyzny

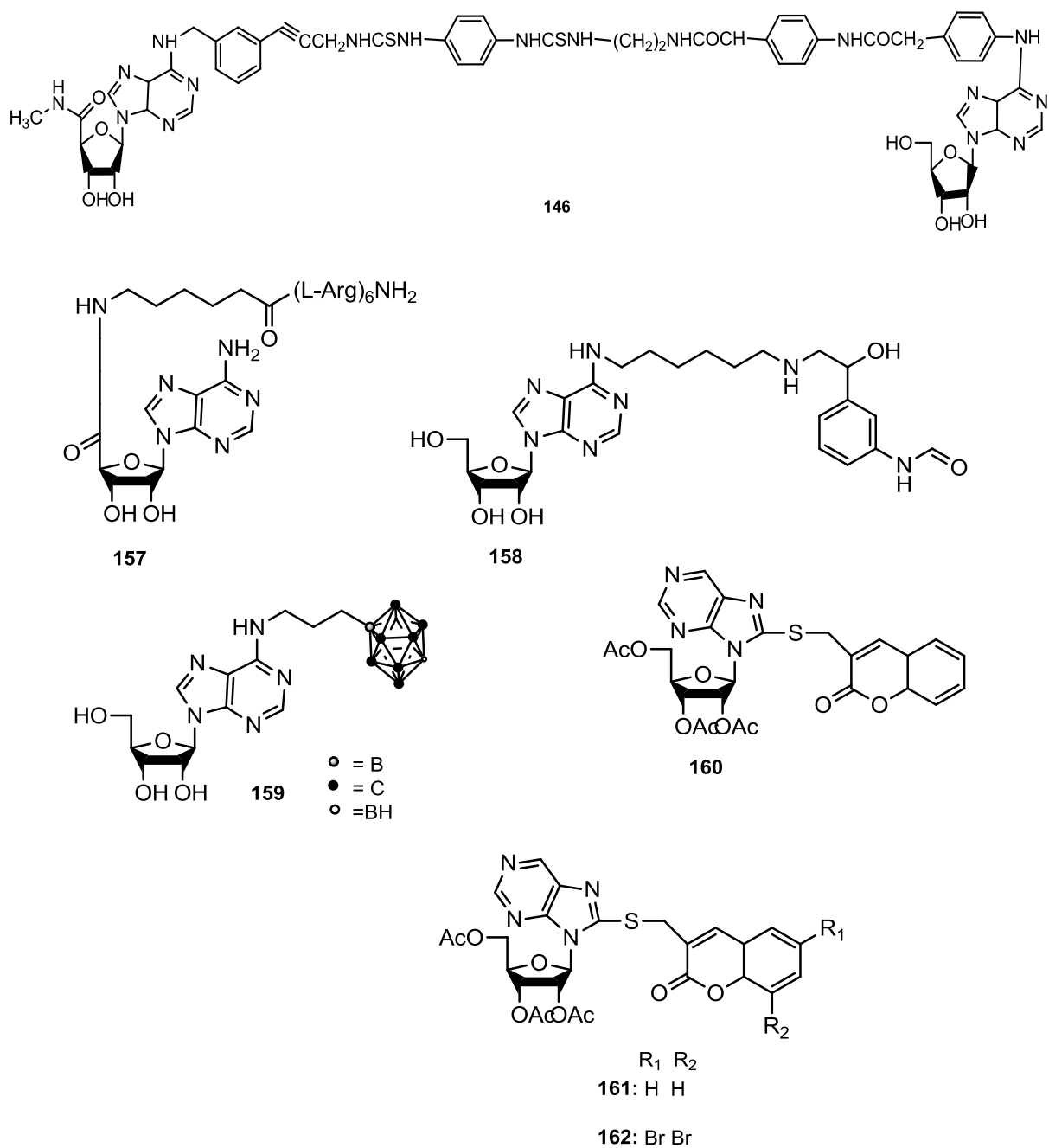
W 2000 roku opisano syntezę koniugatu adenozyzny polegającą na połączeniu dwóch pochodnych: pochodnej IB-MECA oraz pochodnej ADAC. Powstały produkt, podwójny agonista, MRS 1741 (**157**) (Rysunek 29) aktywował jednocześnie receptory A₁ oraz A₃ wywołując silny efekt kardioprotekcyjny. Wyniki badań biologicznych wskazały, że koniugat (**157**) wywołuje efekt synergistyczny^[171].

Koniugat (**158**) (Rysunek 29), powstały w wyniku połączenia adenozyzny z oligoargininą, jest inhibitorem kinaz proteinowych. W prowadzonych badaniach biologicznych oddziaływał z miejscem wiązania ATP oraz substratu kinazy^[172].

W publikacji^[173] zaprezentowano metodę połączenia pochodnej adenozyzny z pochodną fentanylu. Otrzymany związek (**159**) (Rysunek 29) wykazywał właściwości antagonistyczne w stosunku do receptorów adenozyzny A₁ oraz opioidowego μ .

Bednarska i in.^[174] zaprojektowali połączenia pochodnych adenozyzny z klasterem boru. Adenozyzna modyfikowana w pozycji 2'-C oraz N⁶-*para*-karboranowym klasterem (C₂B₁₀H₁₁) hamowała produkcję reaktywnych form tlenu poprzez aktywowane neutrofile. Otrzymane koniugaty charakteryzowały się wysokim powinowactwem do receptora A_{2A}. Najlepsze wyniki otrzymano dla związku (**160**) (Rysunek 29).

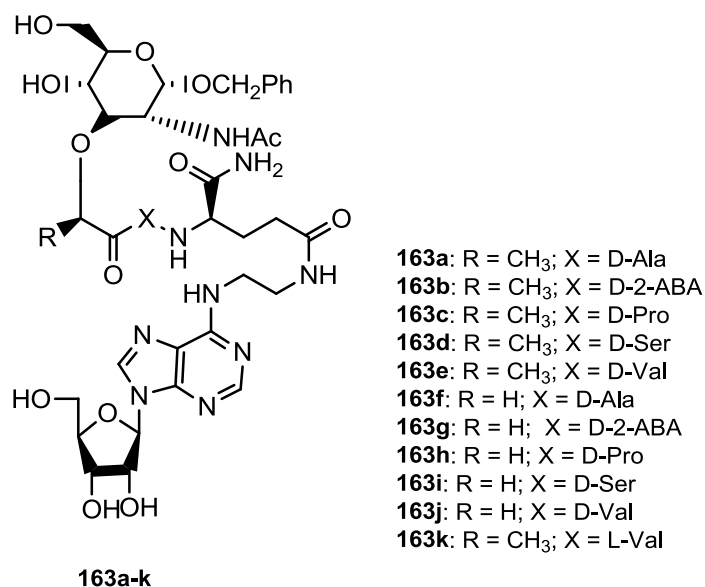
W 2011 roku^[175] opisano syntezę koniugtów adenozyzny z kumaryną. W pozycję C8 rybofuranozydu puryny przyłączono cząsteczkę kumaryny modyfikowaną różnymi podstawnikami. 7 spośród 26 uzyskanych związków hamowało replikację subgenomowego replikonu HCV w linii komórkowej Huh 5-2. Najlepsze wyniki uzyskano dla koniugatów (**160-162**) (Rysunek 29).



Rysunek 29. Struktury chemiczne koniugatów adenozyiny (**157-162**) ^[172-175]

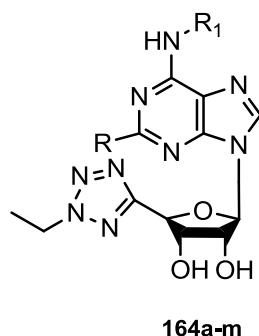
W ostatnich latach przedstawiono wyniki odnoszące się do syntezy i badań *in vitro* nowych koniugatów adenozyiny z pochodnymi MDP/nor-MDP zawierającymi w części peptydowej D-aminokwasy (D-Ala, D-Val, D-Ser, D-Pro, D-2-ABA) (**163**) (Rysunek 30). Badania *in vitro* zsyntezowanych związków przeprowadzono wobec dwóch limfoidalnych linii komórkowych: Jurkat (pochodzenia ludzkiego) oraz L1210 (pochodzenia mysiego), a także wobec komórek PBMC. Linia komórkowa Jurkat okazała się oporna na działanie

koniugatów. Związki (**163a-g**) i (**163j**) wykazały aktywność cytotoksyczną wobec linii komórkowej L1210 ^[176].



Rysunek 30. Struktury chemiczne koniugatów adenozy z pochodnymi MDP oraz nor-MDP (**163a-k**) ^[176]

Ostatnio zsyntezowano serię pochodnych *N*⁶-podstawionej-5'-*C*-(2-ethyl-2*H*-tetrazol-5-yl)-adenozy (**164a-m**) (Rysunek 31), będących podwójnie działającymi agonistami hA₁AR i antagonistami hA₃AR. Właściwości te mogą być wykorzystywane w leczeniu jaskry oraz innych chorób ^[180].



164a R = R₁ = H

164f: R = Cl, R₁ = cyklopentyl

164k: R = H, R₁ = 2-fluoro-4-chlorofenyl

164b: R = Cl, R₁ = H

164g: R = H, R₁ = endo-2-norbornyl

164l: R = Cl, R₁ = 2-fluoro-4-chlorofenyl

164c: R = H, R₁ = CH₃

164h: R = Cl, R₁ = endo-2-norbornyl

164m: R = Cl, R₁ = 2-jodobenzyl

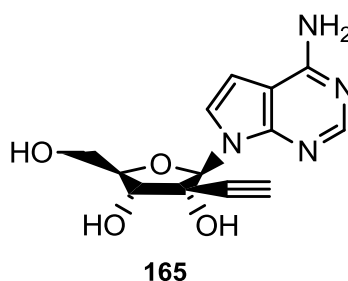
164d: R = Cl, R₁ = CH₃

164i: R = H, R₁ = tetrahydrofuranyl

164e: R = H, R₁ = cyklopentyl **164j:** R = Cl, R₁ = tetrahydrofuranyl

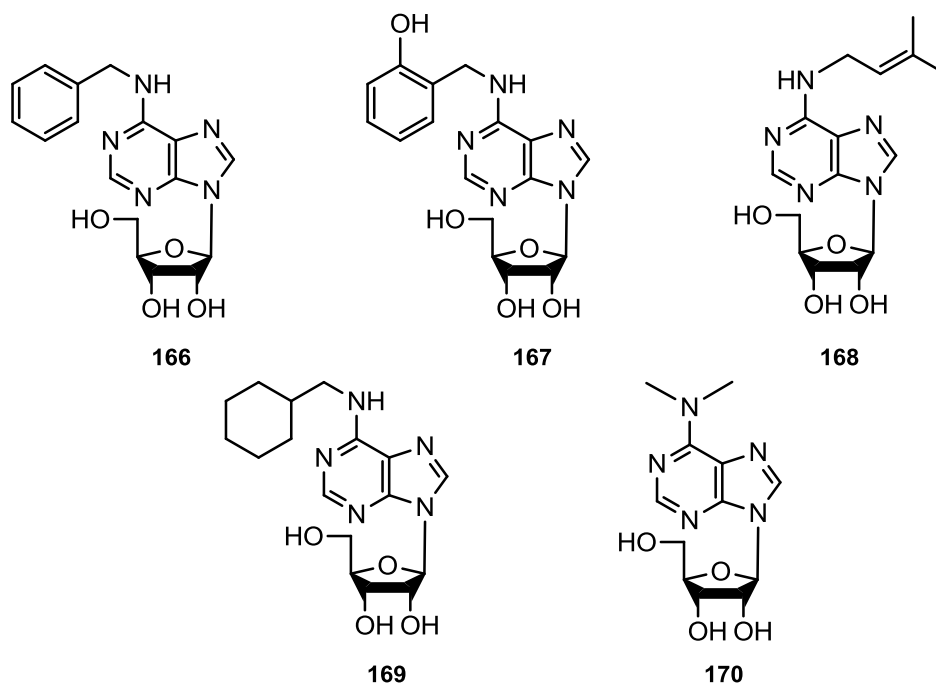
Rysunek 31. Struktury chemiczne koniugatów adenozyiny (**164a-m**)^[180]

Zespół badawczy Shang'a^[180] opublikował analogi adenozyiny, w tym analog NITD008 (**165**) (Rysunek 32) charakteryzujące się właściwościami przeciwwirusowymi. Związek działa szczególnie na flawowirusy np. hamuje rozwój wirusa EV71.



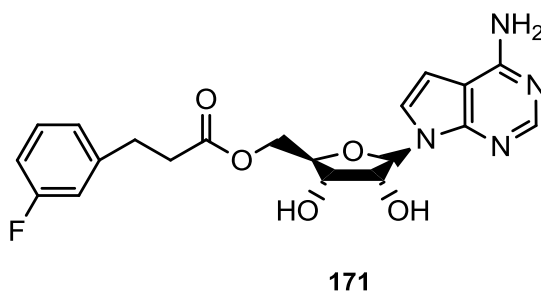
Rysunek 32. Struktura chemiczna analogu (**165**)^[180]

Liu i in.^[178] opublikowali *N*⁶-podstawione analogi adenozyiny (AAs): AA1 – *N*⁶-benzyloadenozyinę (**166**), AA2 – *N*⁶-(2-hydroksybenzylo)adenozyinę (**167**), AA3 – *N*⁶-izopentyloadenozyinę (**168**), AA4 – *N*⁶-cykloheksyloadenozyinę (**169**) oraz AA5 – *N*⁶-dimetyloadenozyinę (**170**), charakteryzujące się właściwościami inhibicyjnymi w stosunku do ludzkiej kinazy JAK2 oraz białka STAT3. Co więcej, otrzymane analogi (**166-170**) (Rysunek 33) w badaniach biologicznych wykazały właściwości przeciwnowotworowe na wybranych ludzkich liniach nowotworowych A549 oraz MDA-MB-468.



Rysunek 33. Struktury chemiczne analogów (**166-170**) ^[178]

Najnowsze badania, opublikowane we wrześniu 2015 roku, przedstawiają syntezę 39 analogów adenosyny, które testowano biologicznie na wybranych szczepach bakterii m.in. gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*), pałeczkach okrężnicy (*Escherichia coli*) czy pałeczkach ropy błękitnej (*Pseudomonas aeruginosa*). Najbardziej obiecujące wyniki uzyskano dla analogu (**171**) (Rysunek 34), charakteryzującego się większą aktywnością przeciwbakteryjną, dla szczepu pałeczek ropy błękitnej, w porównaniu do cyproflaksacyny, znanego chemioterapeutyku o działaniu bakteriobójczym ^[179].



Rysunek 34. Struktura chemiczna analogu (**171**) ^[179]

3. CEL I ZAKRES PRACY

Celem mojej pracy doktorskiej była synteza oraz badania aktywności biologicznej nowych analogów batracyliny z pochodnymi tuftsyny/retro-tuftsyny oraz adenozyzną jako potencjalnych związków przeciwnowotworowych.

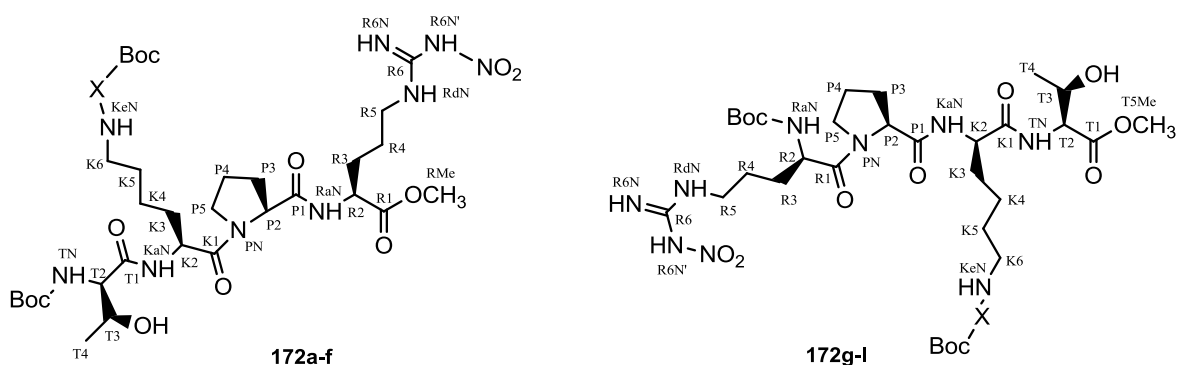
Praca syntetyczna obejmowała:

- syntezę batracyliny (**1**) przy użyciu zmodyfikowanej metody Czerniaka-Einhorna;
- syntezę pochodnych tuftsyny/retro-tuftsyny:
 - ✓ Boc-Thr-Lys(Boc)-Pro-Arg(NO₂)-OMe (**172a**),
 - ✓ Boc-Thr-Lys(BocGly)-Pro-Arg(NO₂)-OMe (**172b**),
 - ✓ Boc-Thr-Lys(BocAla)-Pro-Arg(NO₂)-OMe (**172c**),
 - ✓ Boc-Thr-Lys(BocVal)-Pro-Arg(NO₂)-OMe (**172d**),
 - ✓ Boc-Thr-Lys(BocLeu)-Pro-Arg(NO₂)-OMe (**172e**),
 - ✓ Boc-Thr-Lys(BocIle)-Pro-Arg(NO₂)-OMe (**172f**),
 - ✓ Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(Boc)-Thr-OMe (**172g**),
 - ✓ Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(BocGly)-Thr-OMe (**172h**),
 - ✓ Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(BocAla)-Thr-OMe (**172i**),
 - ✓ Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(BocVal)-Thr-OMe (**172j**),
 - ✓ Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(BocLeu)-Thr-OMe (**172k**),
 - ✓ Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(BocIle)-Thr-OMe (**172l**);
- syntezę analogów batracyliny z pochodnymi tuftsyny/retro-tuftsyny (**173a-l**);
- syntezę aminokwasowych pochodnych batracyliny (**174a-h**);
- syntezę aminokwasowych pochodnych BAT z rybozydem 6-chloropuryny (**175a-h**).

Praca biologiczna obejmowała:

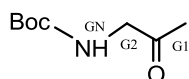
- badania żywotności komórek testem kolorymetrycznym MTT poddanych działaniu otrzymanych związków (**175-179**) wobec wybranych linii komórkowych;
- określenie wpływu wybranych związków (**178e-f**, **178k-l**) na aktywność katalityczną kompleksu rozszczepialnego topoisomeraza II-DNA oraz topoisomeraza I-DNA;

- określenie wpływu wybranych związków (**178a**, **178k**) na dystrybucję komórek w cyklu komórkowym oraz indukcję uszkodzeń DNA.

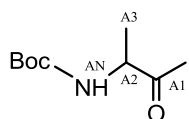


172a, 172g: X= H

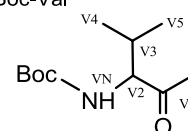
172b, 172h: Boc-X = Boc-Gly



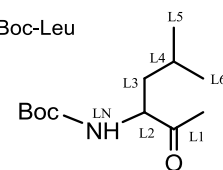
172c, 172i: Boc-X = Boc-Ala



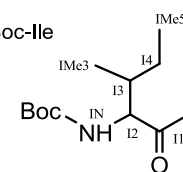
172d, 172j: Boc-X = Boc-Val



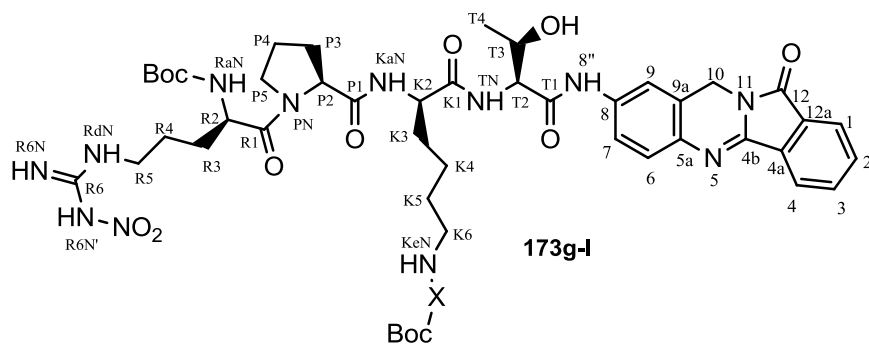
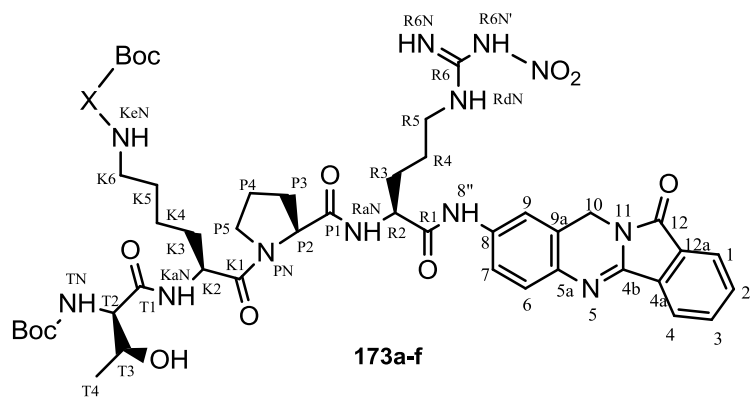
172e, 172k: Boc-X = Boc-Leu



172f, 172l: Boc-X = Boc-Ile



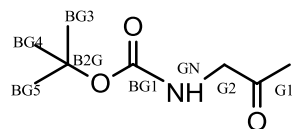
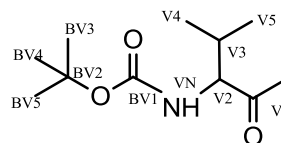
Rysunek 35. Struktury chemiczne pochodnych tuftsyny/retro-tuftsyny (**172a-l**)



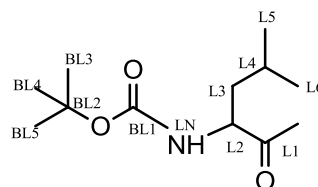
173a, 173g: X = H

173d, 173j: Boc-X = Boc-Val

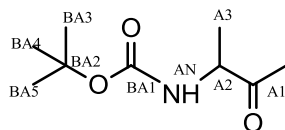
173b, 173h: Boc-X = Boc-Gly



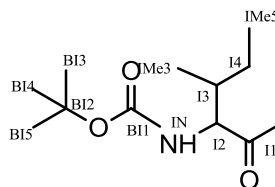
173e, 173k: Boc-X = Boc-Leu



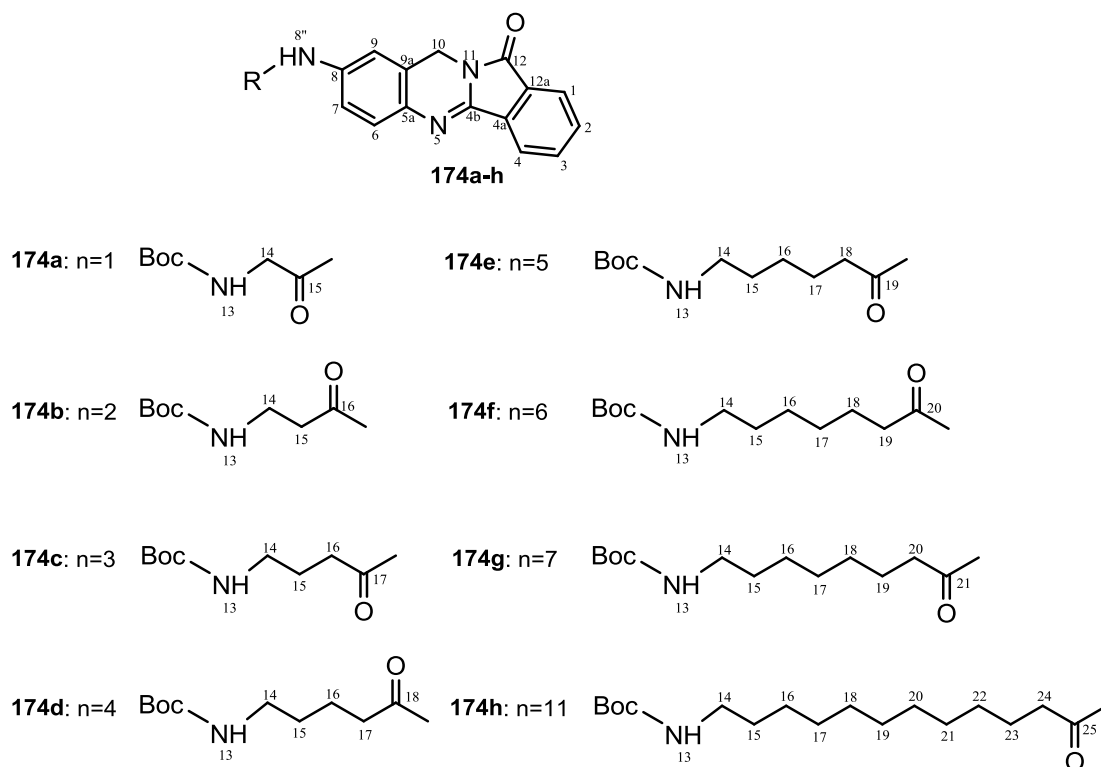
173c, 173i: Boc-X = Boc-Ala



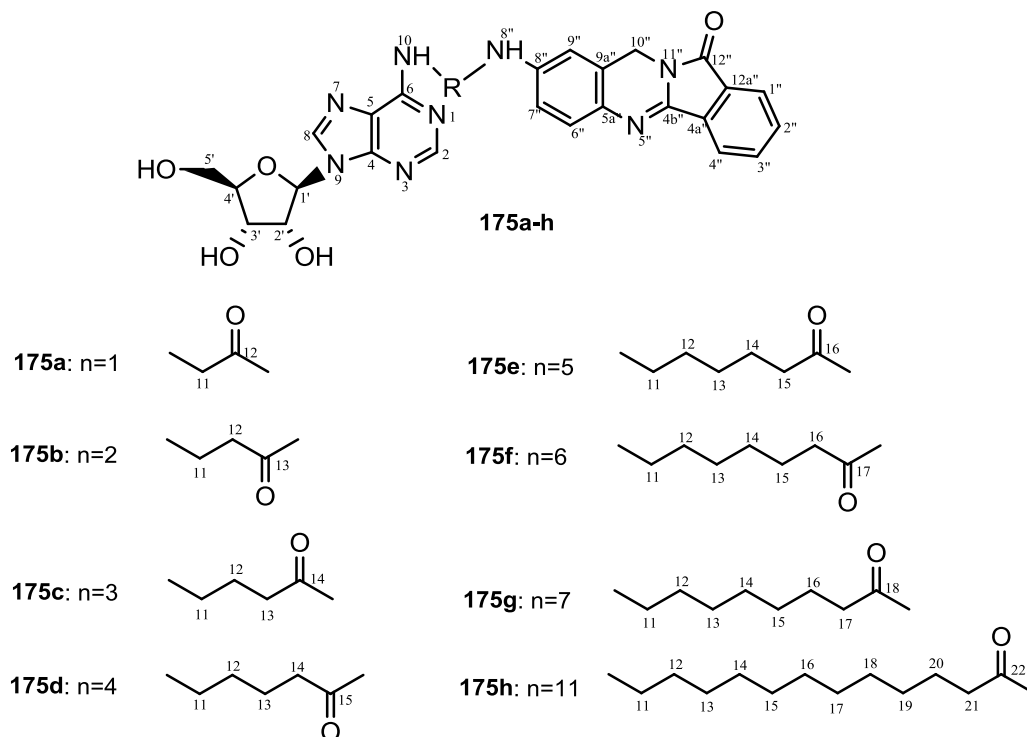
173f, 173l: Boc-X = Boc-Ile



Rysunek 36. Struktury chemiczne analogów batracyny z pochodnymi tuftsyny/retro-tuftsyny (**173a-l**)



Rysunek 37. Struktury chemiczne aminokwasowych pochodnych batracyliny (**174a-h**)



Rysunek 38. Struktury chemiczne analogów adenozyiny z aminokwasowymi pochodnymi batracyliny (**175a-h**)

Prace syntetyczne przeprowadziłam w Katedrze Chemii Organicznej Politechniki Gdańskiej pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Krystyny Dzierzbickiej. Badania aktywności biologicznej, w których uczestniczyłam, zostały wykonane w Katedrze Technologii Leków i Biochemii pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Andrzeja Składanowskiego przez mgr inż. Marcina Serockiego.

4. WYNIKI I WNIOSKI

4.1. Prace syntetyczne

Część syntetyczna pracy obejmowała otrzymanie: batracyliny (**1**), Boc-chronionych aminokwasów (**181a-g**), pochodnych tuftsyny/retro-tuftsyny (**172a-l**), analogów batracyliny z otrzymanymi peptydami (**173a-l**), aminokwasowych pochodnych batracyliny (**174a-h**) oraz ich połączeń z rybozydem 6-chloropuryny (**175a-h**).

4.1.1. Synteza batracyliny

Batracylinę (**1**) otrzymałam w oparciu o zmodyfikowaną metodę Czerniaka-Einhorna zaproponowaną przez Dzierzbicką i in ^[40]. Syntezę rozpoczęłam od przeprowadzenia symetrycznie chronionej *p*-fenylenodiaminy (**17**) w pochodną (**18**), którą następnie poddałam reakcji Czerniaka-Einhorna i w wyniku późniejszej hydrolizy grup acetylowych uzyskałam batracylinę (**1**) (Schemat 24).

4.1.1.1. *N,N'*-Diacetylo-1,4-fenylenodiamina (**18**)

N,N'-Diacetylo-1,4-fenylenodiaminę (**18**) otrzymałam wg procedury opisanej przez Biedermann'a ^[181]. *p*-Fenylenodiaminę (**17**) rozpuściłam w kwasie octowym i prowadziłam reakcję w temp. 118-120°C przez 3,5 godz. Po tym czasie odsączyłam wytrącony osad oraz przemyłam przesączem i kwasem octowym w celu pozbycia się nieprzereagowanej aminy. Otrzymany produkt (**18**) użyłam bez dalszego oczyszczania do kolejnej reakcji (Schemat 24).

4.1.1.2. *N*-[2-(Ftalimidometylo)-1,4-acetylo]fenylenodiamina (**20**)

Ftalimidometylowanie *N,N'*-diacetylo-1,4-fenylenodiaminy (**18**) przeprowadziłam modyfikując procedurę opublikowaną przez Wilshire'a i Rosevear'a ^[15]. *N,N'*-Diacetylo-1,4-fenylenodiaminę (**18**) rozpuściłam w kwasie siarkowym i ogrzałam do temp. 50°C, po czym porcjami dodawałam *N*-(hydroksymetylo)ftalimid. Roztwór mieszałam przez 3 godz. utrzymując stałą temperaturę. Następnie ochłodzoną mieszaninę

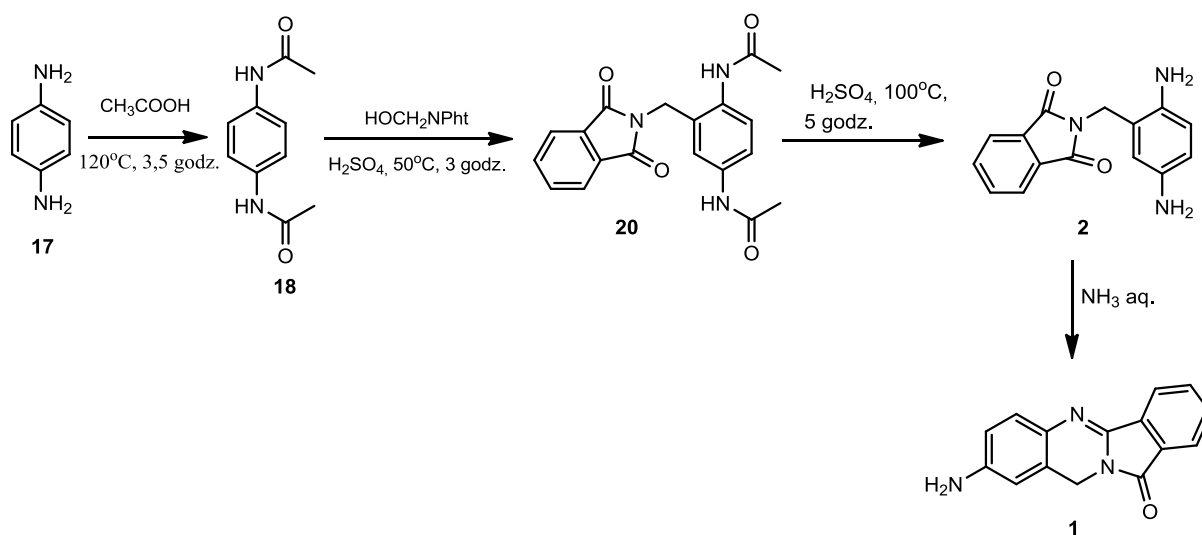
poreakcyjną wylałam na mieszaninę lód/etanol, a otrzymany osad (**20**) przesączyłam i bez oczyszczania użyłam do kolejnego etapu (Schemat 24).

W reakcji generowany jest stabilizowany mezomerycznie karbokation biorący udział w substytucji elektrofilowej *N,N'*-diacetylo-1,4-fenylendiaminy (**18**) (Schemat 25).

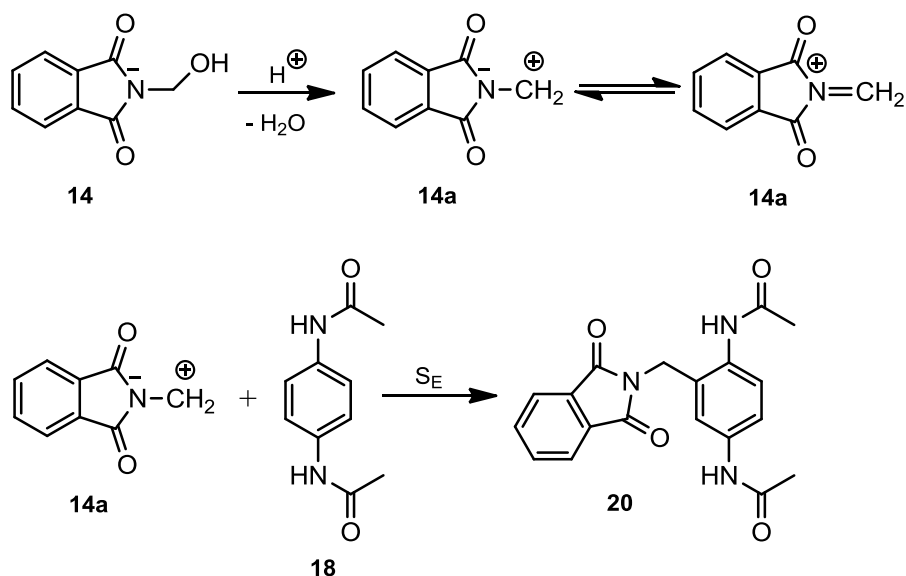
4.1.1.3. Hydroliza grup acetylowych i cyklizacja do batracyliny (**1**)

Reakcję przeprowadziłam w oparciu o metodę zaproponowaną przez Wilshire'a i Rosevear'a ^[11]. *N*-[2-(Ftalimidometylo)-1,4-acetylo]fenylendiaminę (**20**) rozpuściłam w kwasie siarkowym i mieszałam przez 5 godz. w temp. 100°C. Następnie otrzymany produkt (**2**) zalkalizowałam wodnym roztworem amoniaku, a powstałe kryształy przesączyłam. Zgodnie z przewidywaniami w przesączu pozostała pewna ilość 1,4-fenylendiaminy, o czym świadczyło jego ściemnienie pod wpływem światła i tlenu z powietrza. Można założyć, że deacetylacja grup aminowych umożliwia atak nukleofilowy wolnej grupy aminowej na aktywowany przez przyłączenie protonu acylowy atom węgla.

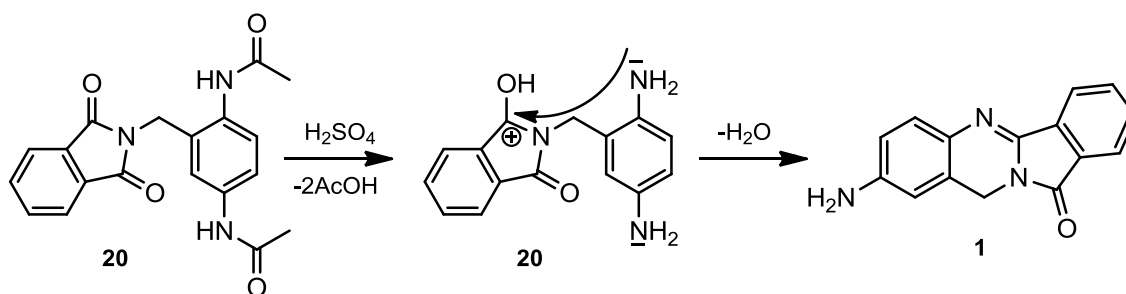
Otrzymany po przesączeniu pod zmniejszonym ciśnieniem osad poddałam krystalizacji z DMF otrzymując batracylinę (**1**) (Schemat 24 i 26), którą oczyściłam za pomocą chromatografii kolumnowej w układzie H, a następnie na TLC w układzie D.



Schemat 24. Synteza batracyliny (**1**)



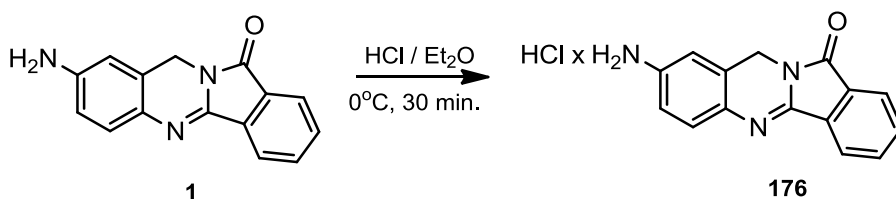
Schemat 25. Reakcja podstawienia elektrofilowego *N,N'*-diacetylo-1,4-fenylenodiaminy (**18**) z udziałem karbokationu generowanego z *N*-(hydroksymetylo)ftalimidu (**14a**)



Schemat 26. Atak nukleofilowy wolnej grupy aminowej na acylowy atom węgla prowadzący do powstania BAT (**1**)

Chlorowodorek batracyliny (HClxBAT) (**176**)

Syntezę HClxBAT (**176**) przeprowadziłam zgodnie z procedurą opublikowaną przez Dzierzbicką^[40]. Batracylinę (**1**) traktowałam bezw. eterem dietylowym nasyconym chlorowodorem przez ok. 30 min. w temp. 0°C. Następnie rozpuszczalnik oddestylowałam na wyparce obrotowej, a pozostałość przemyłam kilkakrotnie bezw. eterem dietylowym, otrzymując pochodną w postaci chlorowodoru (**176**) (Schemat 27). Przebieg reakcji kontrolowałam na TLC w układzie K.



Schemat 27. Otrzymywanie chlorowodoru batracyniny (**176**)

4.1.2. Pochodne aminokwasów

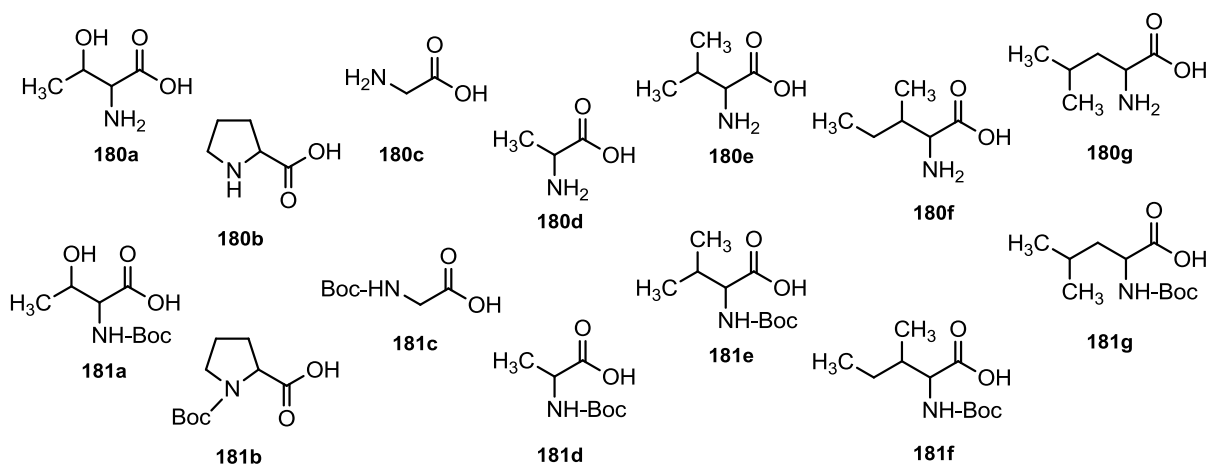
W celu otrzymania di-, tri-, tetra- i pentapetydów należało czasowo osłonić grupę α -aminową aminokwasu acylującego oraz grupę karboksylową aminokwasu acylowanego. Najczęściej stosowanymi grupami ochronnymi funkcji α -aminowej w syntezie w roztworze jest osłona Boc lub Z^[182-184]. Do osłony grupy karboksylowej wykorzystałam komercyjnie dostępne estry metylowe aminokwasów w postaci chlorowodorków: HClxArg(NO)₂-OMe (w przypadku pochodnych tuftsyny) oraz HClxThr-OMe (w przypadku pochodnych retro-tuftsyny).

4.1.2.1. Synteza Boc chronionych aminokwasów (**181a-g**)

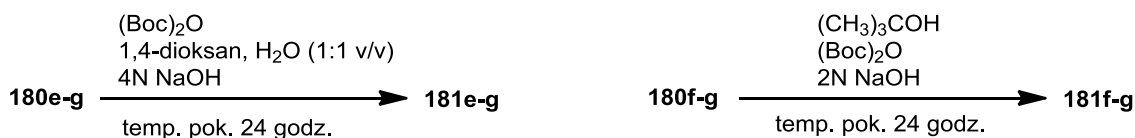
Boc chronione aminokwasy (Thr, Pro, Gly, Ala, Val) otrzymałam zgodnie z procedurą opisaną przez Moroder'a^[182]. Syntezę rozpoczęłam od rozpuszczenia odpowiedniego aminokwasu (**180a-e**) w mieszaninie woda:dioksan (1:1 v/v), którą następnie zalkalizowałam przy użyciu 4N NaOH do pH 10. Po ochłodzeniu mieszaniny reakcyjnej, dodawałam porcjami pirowęglan di-*tert*-butylu, po czym całość pozostawiłam na 24 godz. w temp. pok. Dioksan oddestylowałam pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość przemyłam heksanem, w celu wymycia nadmiaru pirowęglału di-*tert*-butylu. Oziębioną mieszaninę zakwasiłam kwasem cytrynowym do pH 2-3, po czym przeprowadziłam ekstrakcję octanem etylu (Schemat 28).

Syntezę pozostałych Boc chronionych aminokwasów (Leu, Ile) wykonałam również zgodnie z procedurą opisaną przez Moroder'a^[182]. Sporządziłam mieszaninę aminokwasu (**180f-g**), alkoholu *tert*-butylowego i 2N NaOH, do której dodałam porcjami pirowęglan di-*tert*-butylu. Całość mieszałam przez 24 godz. w temp. pok., po czym rozpuszczalnik oddestylowałam pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości ok. 80 ml i przeprowadziłam ekstrakcję heksanem. Oziębioną warstwę wodną zakwasiłam 10%

KHSO₄ do pH 1-2 i ponownie przeprowadziłam ekstrakcję octanem etylu. Po wysuszeniu nad bezw. MgSO₄, oddestylowaniu rozpuszczalnika na wyparce rotacyjnej i krystalizacji z mieszaniny etanol:woda (2:1 v/v) uzyskałam oczekiwane produkty (**155f-g**) (Schemat 28).



Rysunek 39. Struktury chemiczne aminokwasów z wolną (**180a-g**) oraz ochronioną grupą aminową (**181a-g**).



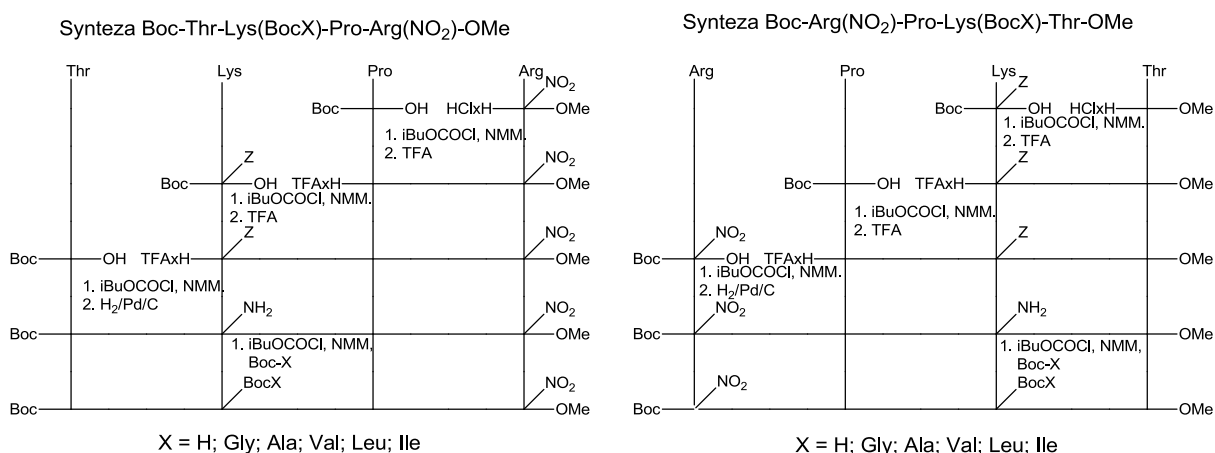
Schemat 28. Metoda zakładania osłony Boc (**181a-g**)

Pozostałe, wykorzystywane w syntezach, Boc-chronione aminokwasy (Boc-Arg(NO)₂-OH, Boc-Lys(Z)-OH, Z-Lys(Boc)-OH, Z-Pro-OH, Boc-β-Ala-OH, Boc-GABA-OH, Boc-5-Ava-OH, Boc-6-Ahx-OH, Boc-7-Ahp-OH, Boc-8-Aoc-OH oraz Boc-12-Ado-OH) zostały zakupione i nie było potrzeby ich otrzymywania.

4.1.3. Pochodne tuftsyny/retro-tuftsyny

Syntezę pochodnych tuftsyny/retro-tuftsyny przeprowadziłam w oparciu o procedurę mieszanych bezwodników opisaną przez Dzierzbicką [185]. Wybrana metoda pozwoliła otrzymać peptydy z dobrą wydajnością, przy jednoczesnym niewielkim stopniu tworzenia się produktów ubocznych oraz niskim stopniu racemizacji. W opisywanej metodzie do *N*-chronionego aminokwasu rozpuszczonego w bezw. DMF dodałam trzeciorzędową aminę: TEA lub NMM oraz *i*BuOCOC*l*. Po upływie około 5 min. utworzył się mieszany bezwodnik, który acylował dodawany aminokomponent, jakim był kolejny aminokwas lub w dalszych etapach syntezy peptyd. Reakcję prowadziłam w temp. -15°C przez 4 godz., a następnie 24 godz. w temp. pok. (Rysunek 40). Po tym czasie rozpuszczalnik oddestylowałam pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuściłam w octanie etylu i kolejno dwukrotnie przemyłam: wodą, 5% HCl, wodą, nasyc. NaHCO₃, wodą, solanką, wodą. Po wysuszeniu nad bezw. MgSO₄ i oddestylowaniu rozpuszczalnika pod zmniejszonym ciśnieniem, produkt oczyściłam na kolumnie chromatograficznej wypełnionej żelem krzemionkowym stosując układ F i E, a następnie na TLC w układzie D.

Strukturę otrzymanych związków potwierdziłam na podstawie analizy widm ¹H NMR i MS.



Rysunek 40. Procedura syntezy pochodnych tuftsyny/retro-tuftsyny (**172a-l**)

4.1.3.1. Synteza pochodnych tuftsyny (172a-f) oraz (182a-f)

4.1.3.1.1. Tetrapeptyd Boc-Thr-Lys(Boc)-Pro-Arg(NO₂)-OMe (172a) oraz Boc-Thr-Lys(Boc)-Pro-Arg(NO₂)-OH (182a)

Tetrapeptyd otrzymałam zgodnie z procedurę przedstawioną na Rysunku 40. Syntezę rozpoczęłam od utworzenia wiązania peptydowego pomiędzy HClxArg(NO₂)-OMe a Boc-Pro-OH (**181b**) uzyskując dipeptyd Boc-Pro-Arg(NO₂)-OMe, który potraktowałam kwasem TFA w celu usunięcia osłony Boc. Do otrzymanego trifluoroocetanu dipeptydu dodałam Z-Lys(Boc)-OH uzyskując tripeptyd Z-Lys(Boc)-Pro-Arg(NO₂)-OMe, który poddałam katalitycznej wodorolizie H₂, Pd/C celem usunięcia osłony Z. Otrzymany produkt połączyłam z Boc-Thr-OH (**181a**) uzyskując oczekiwany tetrapeptyd Boc-Thr-Lys(Boc)-Pro-Arg(NO₂)-OMe (**172a**). Postęp reakcji kontrolowałam na TLC w układzie C.

Po deprotekcji estru metylowego z tetrapeptydu (**172a**) wg procedury opisanej w pkt. 4.1.4.3. (Schemat 29) otrzymałam odpowiednio chronioną pochodną Boc-Thr-Lys(Boc)-Pro-Arg(NO₂)-OH (**182a**).

4.1.3.1.2. Pentapeptyd Boc-Thr-Lys(BocGly)-Pro-Arg(NO₂)-OMe (172b) oraz Boc-Thr-Lys(BocGly)-Pro-Arg(NO₂)-OH (182b)

Syntezę rozpoczęłam od utworzenia wiązania peptydowego pomiędzy HClxArg(NO₂)-OMe a Boc-Pro-OH (**181b**) otrzymując dipeptyd Boc-Pro-Arg(NO₂)-OMe, który potraktowałam TFA w celu usunięcia osłony Boc. Do otrzymanego trifluoroocetanu dipeptydu dodałam Boc-Lys(Z)-OH uzyskując tripeptyd Boc-Lys(Z)-Pro-Arg(NO₂)-OMe, który ponownie zalałam TFA. Otrzymany trifluoroocetan tripeptydu połączyłam z Boc-Thr-OH (**181a**) uzyskując tetrapeptyd Boc-Thr-Lys(Z)-Pro-Arg(NO₂)-OMe, z którego po usunięciu osłony Z za pomocą hydrogenolizy H₂, Pd/C otrzymywałam pentapeptydy w wyniku utworzenia wiązania izopeptydowego pomiędzy odpowiednimi Boc chronionymi aminokwasami a grupą ε-aminową lizyny. W opisywanej syntezie przyłączyłam Boc-Gly-OH (**181c**) otrzymując Boc-Thr-Lys(BocGly)-Pro-Arg(NO₂)-OMe (**172b**). Postęp reakcji kontrolowałam na TLC w układzie C.

Po usunięciu estru metylowego z pentapeptydu (**172b**) wg procedury opisanej w pkt. 4.1.4.3. (Schemat 29) otrzymałam peptyd z wolną grupą karboksylową Boc-Thr-Lys(BocGly)-Pro-Arg(NO₂)-OH (**182b**).

4.1.3.1.3. Pentapeptydy (172c-f) i (182c-f)

Syntezę oligopeptydów (**172c-f**) i (**182c-f**) przeprowadziłam zgodnie z procedurą opisaną dla pentapeptydu (**172b**) (patrz pkt. 4.1.3.1.2.).

4.1.3.2. Synteza pochodnych retro-tuftsyny (172g-l) oraz (182g-l)

4.1.3.2.1. Tetrapeptyd Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(Boc)-Thr-OMe (172g) oraz Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(Boc)-Thr-OH (182g)

Otrzymywanie tetrapeptydu wykonałam w roztworze stosując procedurę zgodnie z Rysunkiem 40. Syntezę rozpoczęłam od utworzenia wiązania peptydowego pomiędzy HClxH-Thr-OMe a Z-Lys(Boc)-OH uzyskując dipeptyd Z-Lys(Boc)-Thr-OMe, który poddałam katalitycznej hydrogenolizie H₂ na Pd/C w celu usunięcia osłony Z. Otrzymany peptyd połączyłam z Boc-Pro-OH (**181b**) uzyskując tripeptyd Boc-Pro-Lys(Boc)-Thr-OMe, do którego po deprotekcji osłony Boc wprowadziłam Boc-Arg(NO₂)-OH otrzymując oczekiwany tetrapeptyd Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(Boc)-Thr-OMe (**172g**). Postęp reakcji kontrolowałam na TLC w układzie C.

Po usunięciu estru metylowego z tetrapeptydu (**172g**) wg procedury opisanej w pkt. 4.1.4.3. (Schemat 29) otrzymałam peptyd z wolną grupą karboksylową Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(Boc)-Thr-OH (**182g**).

4.1.3.2.2. Pentapeptyd Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(BocGly)-Thr-OMe (172h) oraz Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(BocGly)-Thr-OH (182h)

Pentapeptyd otrzymałam zgodnie z procedurą przedstawioną na Rysunku 40. Syntezę rozpoczęłam od utworzenia wiązania peptydowego pomiędzy HClxThr-OMe a Boc-Lys(Z)-OH, uzyskując dipeptyd Boc-Lys(Z)-Thr-OMe, który potraktowałam TFA w celu usunięcia osłony Boc. Do otrzymanego trifluoroocyanu dipeptydu dodałam Boc-Pro-OH (**181b**) uzyskując tripeptyd Boc-Pro-Lys(Z)-Thr-OMe, który ponownie

potraktowałam TFA. Otrzymany trifluoroocetan tripeptydu połączyłam z Boc-Arg(NO₂)-OH uzyskując tetrapeptyd Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(Z)-Thr-OMe, z którego po usunięciu osłony Z za pomocą katalitycznej wodorolizy H₂, Pd/C otrzymywałam kolejne pentapeptydy w wyniku przyłączeniu odpowiednich Boc chronionych aminokwasów do łańcucha bocznego ε-lizyny. W opisywanym przypadku przyłączyłam Boc-Gly-OH (**181c**) otrzymując pentapeptyd Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(BocGly)-Thr-OMe (**156h**). Postęp reakcji kontrolowałam na TLC w układzie C.

Po deprotekcji estru metylowego z tetrapeptydu (**172h**) wg procedury opisanej w pkt. 4.1.4.3. (Schemat 29) otrzymałam peptyd z wolną grupą karboksylową Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(BocGly)-Thr-OH (**182h**).

4.1.3.2.3. Pentapeptydy (172h-l) oraz (182h-l)

Syntezę oligopeptydów (**172h-l**) oraz (**182h-l**) przeprowadziłam wg procedury opisanej dla pentapeptydu (**172g**) (patrz pkt. 4.1.3.2.2.).

4.1.4. Deprotekcja osłon grupy aminowej i karboksylowej chronionych peptydów

4.1.4.1. Deprotekcja osłony Boc

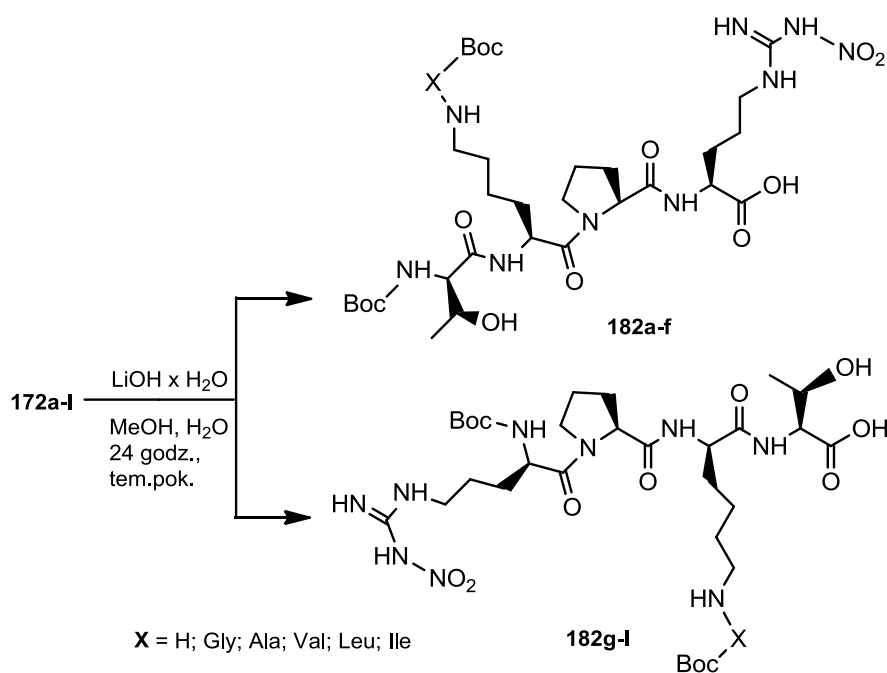
Usuwanie osłony Boc z grupy aminowej N-chronionych peptydów przeprowadziłam zgodnie z procedurą opublikowaną przez Lundt'a ^[186]. Boc chronione peptydy potraktowałam TFA przez ok. 1 godz. w temp. 0°C. Następnie kwas oddestylowałam na wyparce obrotowej, a pozostałość przemyłam kilkakrotnie bezw. eterem dietylowym. Przebieg reakcji kontrolowałam na TLC w układzie C (wizualizacja poprzez podgrzanie płytki).

4.1.4.2. Deprotekcja osłony Z

Usuwanie osłony Z łańcucha bocznego lizyny przeprowadziłam opierając się o metodę opisana przez Johnstone'a ^[190]. Odpowiedni tetrapeptyd z Z chronioną lizyną, rozpuściłam w bezw. metanolu i poddałam hydrogenolizie (H₂/ 10% Pd/C). Postęp reakcji monitorowałam na TLC w układzie C stosując wywoływacz ninhydrynowy. Po deprotekcji zawiesinę przesączyłam, a metanol oddestylowałam na wyparce rotacyjnej.

4.1.4.3. Deprotekcja estru metylowego

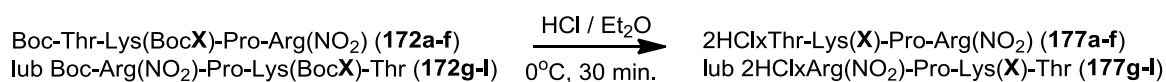
Usuwanie estru metylowego z pochodnych tuftsyny/retro-tuftsyny (**172a-l**) przeprowadziłam zgodnie z procedurą opisaną przez Khan'a ^[188]. Pochodne (**172a-l**) rozpuściłam w mieszaninie metanol:woda (1:1 v/v) dodając LiOH·xH₂O. Po około 24 godz. mieszania w temp. pok. metanol oddestylowałam pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostały roztwór wodny zakwasiłam 2N HCl, w celu pozbycia się powstałej w trakcie reakcji soli litowej peptydu i przeprowadziłam ekstrakcję octanem etylu (Schemat 29). Postęp reakcji kontrolowałam na TLC w układzie C.



Schemat 29. Deprotekcja estru metylowego i otrzymanie pochodnych tuftsyny/retro-tuftsyny z wolną grupą karboksylową (**182g-l**)

4.1.4.4. Deprotekcja osłony Boc (**177a-l**)

Syntezę chlorowodorków (**177a-l**) (Schemat 30) przeprowadziłam wg procedury opisanej w pkt. 4.1.1.3. Przebieg reakcji kontrolowałam za pomocą TLC w układzie C.



172a, 172g, 177a, 177g: X = H
172b, 172h, 177b, 177h: X = Gly
172c, 172i, 177c, 177i: X = Ala
172d, 172j, 177d, 177j: X = Val
172e, 172k, 177e, 177k: X = Leu
172f, 172l, 177f, 177l: X = ILe

Schemat 30. Synteza chlorowodorków pochodnych tuftsyny/retro-tuftsyny (**177a-l**)

4.1.5. Analogi batracyliny z pochodnymi tuftsyny /retro-tuftsyny

Początkowo planowałam otrzymanie analogów batracyliny z pochodnymi tuftsyny/retro-tuftsyny z zastosowaniem odczynników kondensujących takich jak: DPPA, EDCI, HBTU, PyBOP czy DCC. Niestety, wydajność tych reakcji nie przekroczyła 5%. W związku z tym zaproponowałam T3P jako odczynnik kondensujący, który umożliwił mi utworzenie wiązania amidowego pomiędzy grupą karboksylową pochodnej tuftsyny/retro-tuftsyny a funkcją aminową BAT z zadowalającą wydajnością.

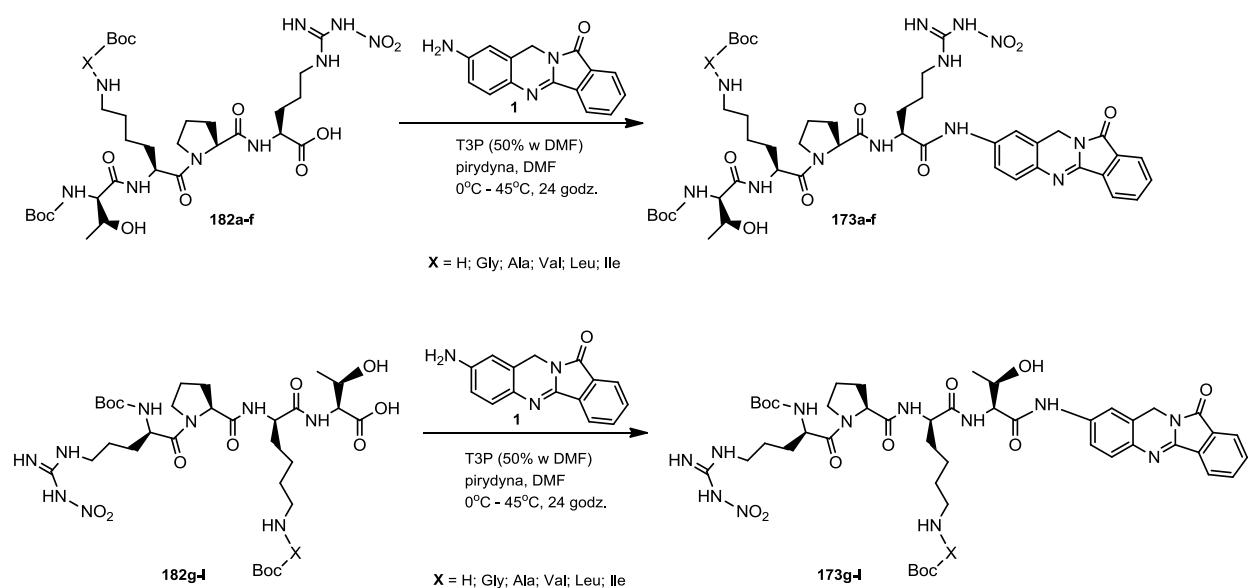
T3P jest dobrym odczynnikiem do tworzenia wiązania amidowego, ponieważ pozwala na otrzymanie produktów z dobrą wydajnością i niskim stopniem epimeryzacji. Reakcja przebiega w temp. $-20-0^\circ\text{C}$. Porównanie T3P z innymi odczynnikami kondensującymi, takimi jak: DCC/HOBt, EDC/HOBt, TBTU, HBTU czy PyBOP wskazuje na jego wyższość pod względem oczyszczania produktu końcowego, wydajności, epimeryzacji, toksyczności i całkowitych kosztów procesu ^[189, 190].

4.1.5.1. Synteza analogów (**173a-l**) oraz (**178a-l**)

Syntezę analogów batracyliny z pochodnymi tuftsyny/retro-tuftsyny przeprowadziłam w oparciu o procedurę opisaną przez Dunetz'a i Xiang'a ^[190]. Do chłodzonego do -20°C roztworu BAT (**1**) oraz odpowiedniej pochodnej tuftsyny/retro-tuftsyny (**182a-l**) w bezw. DMF oraz bezw. pirydynie wkraplałam przez około 60 min. odczynnik kondensujący T3P, po czym reakcję prowadziłam przez 4 godz. w temp. -15°C , a kolejne 24 godz. w temp. 45°C (Schemat 31). Następnie rozpuszczalnik oddestylowałam pod zmniejszonym ciśnieniem, a powstałą sól rozpuściłam w octanie etylu i kolejno przemywałam: 10% kwasem cytrynowym (x3), 5% nasyc NaHCO_3 (x3)

oraz wodą (x3). Otrzymane analogi (**173a-l**) oczyściłam na kolumnie chromatograficznej wypełnionej żelem krzemionkowym stosując układ F, G, H, a następnie na TLC w układzie I.

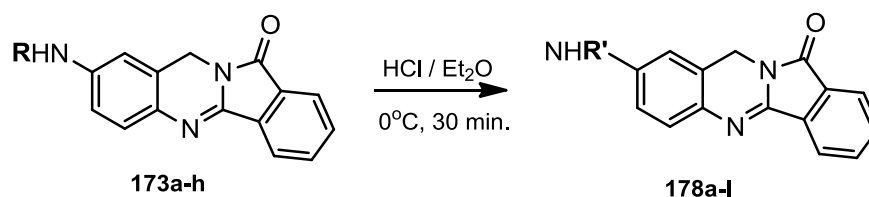
Strukturę zsyntezowanych związków potwierdziłam na podstawie analizy widm ^1H NMR i MS, a także ^{13}C NMR dla związków (**173a**), (**173c**) oraz (**173i**). Ponadto, dla analogów (**173f**) oraz (**173i**) zostały wykonane widma 2D ^1H NMR ROESY oraz TOCSY (Załącznik 1 i 2).



Schemat 31. Synteza analogów batracystyny (**173a-l**)

Otrzymywanie chlorowodorków (**178a-l**)

Chlorowodorki (**178a-l**) (Schemat 32) otrzymałam wg procedury opisanej w pkt. 4.1.1.3. Postęp reakcji kontrolowałam na TLC w układzie I.



R = Boc-Thr-Lys(BocX)-Pro-Arg(NO₂) (**173a-f**)
lub Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(BocX)-Thr (**178g-l**)

R' = 2HClxThr-Lys(X)-Pro-Arg(NO₂) (**173a-f**)
lub 2HClxArg(NO₂)-Pro-Lys(X)-Thr (**178g-l**)

173a, 173g, 178a, 178g: X = H
173b, 173h, 178b, 178h: X = Gly
173c, 173i, 178c, 178i: X = Ala
173d, 173j, 178d, 178j: X = Val
173e, 173k, 178e, 178k: X = Leu
173f, 173l, 178f, 178l: X = ILe

Schemat 32. Otrzymywanie chlorowodorków analogów (**178a-l**)

4.1.6. Aminokwasowe pochodne batracyliny

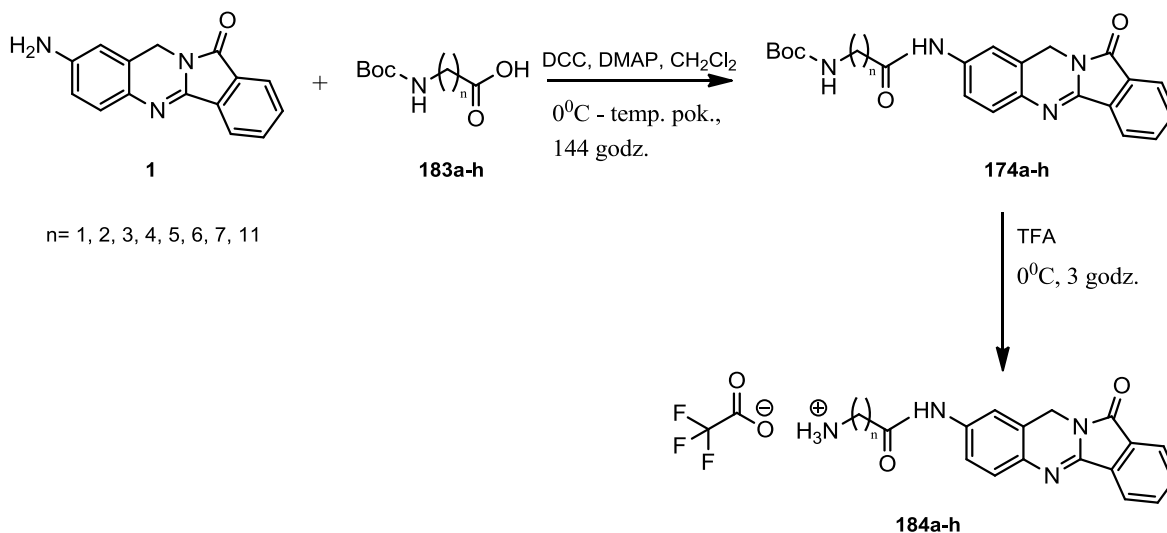
Aminokwasowe pochodne batracyliny (**174a-h**) zsyntezowałam wykorzystując odczynnik kondensujący DCC. Dane literaturowe podają, że skutecznie aktywuje on grupę karboksylową w trakcie tworzenia wiązania amidowego nawet z tak słabym nukleofilem, jakim jest BAT (**1**)^[40].

4.1.6.1. Synteza pochodnych (**174a-h**) oraz (**179a-h**)

Syntezę aminokwasowych pochodnych batracyliny przeprowadziłam w oparciu o metodę opisaną przez Dzierzbicką i in.^[40] (Schemat 33). Batracylinę (**1**), odpowiedni Boc chroniony aminokwas (**183a-h**) oraz DMAP rozpuściłam w bezw. DCM. Tak otrzymaną mieszaninę ochłodziłam do 0°C, po czym dodałam DCC. Reakcję prowadziłam przez 6 dni w temp. pok. Po odsączeniu powstałego dicykloheksylomocznika, rozpuszczalnik oddestylowałam pod zmniejszonym ciśnieniem, a otrzymane pochodne (**174a-h**) oczyściłam na kolumnie chromatograficznej wypełnionej żelami krzemionkowymi stosując układy F, G i H, a następnie na płytkach TLC w układzie I.

Strukturę otrzymanych związków potwierdziłam na podstawie analizy widm ¹H NMR i MS.

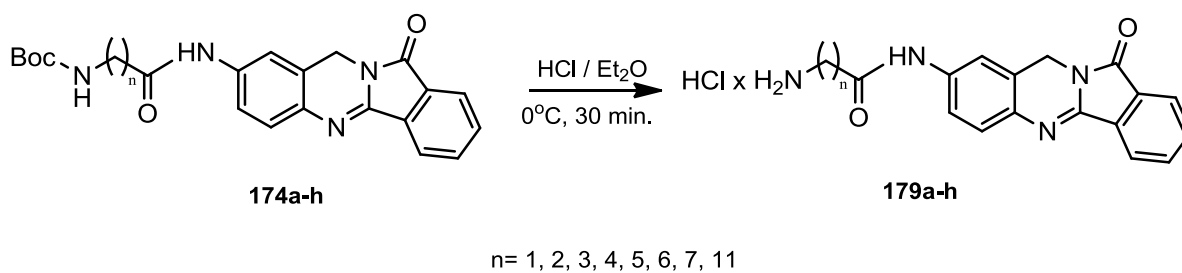
Po usunięciu osłony Boc z uzyskanych związków (**174a-h**) wg procedury opisanej w pkt. 4.1.4.1. otrzymałam pochodne (**184a-h**), które wykorzystałam do utworzenia zaprojektowanych analogów z rybozydem 6-chloropuryny (**175a-h**).



Schemat 33. Synteza aminokwasowych pochodnych batracyny (**174a-h**)

Otrzymywanie chlorowodorków (**179a-h**)

Chlorowodorki (**179a-h**) (Schemat 34) otrzymałam wg procedury opisanej w pkt. 4.1.1.3. Postęp reakcji kontrolowałam na TLC w układzie I.



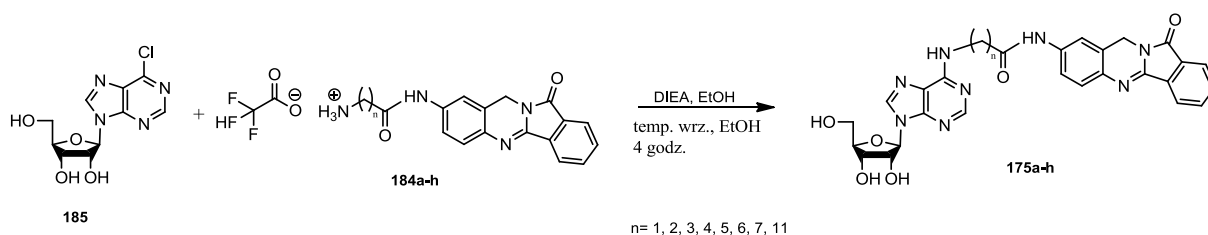
Schemat 34. Otrzymywanie chlorowodorków aminokwasowych pochodnych batracyny (**179a-h**)

4.1.7. Analogi batracyliny z adenozyną

4.1.7.1. Synteza analogów (175a-h)

Syntezę analogów batracyliny z adenozyną przeprowadziłam zgodnie z procedurą opisaną przez Samsel i in. [176]. Trifluorooctan odpowiedniej aminokwasowej pochodnej batracyliny (**184a-h**) rozpuściłam w bezw. EtOH, a następnie dodałam rybozyd 6-chloropuryny (**185**) i DIEA. Reakcję prowadziłam w temp. wrzenia rozpuszczalnika przez ok. 4 godz., kontrolując jej przebieg na TLC w układzie I (Schemat 35). Etanol oddestylowałam na wyparce obrotowej, a otrzymane analogi (**175a-h**) oczyściłam na kolumnie chromatograficznej wypełnionej żelazem krzemionkowym stosując układy F, E i D, a następnie na TLC w układzie C.

Strukturę otrzymanych związków potwierdziłam na podstawie analizy widm ^1H NMR, ^{13}C NMR oraz MS. Dla analogów (**175d**) oraz (**175h**) zostały wykonane widma 2D ^1H NMR ROESY oraz g-COESY (Załącznik 3 i 4).



Schemat 35. Synteza analogów batracyliny z adenozyną (**175a-h**)

4.2. Badania biologiczne

Pierwszym etapem badania związków o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych są testy *in vitro* służące określeniu ich wpływu na żywotność i proliferację komórek. Testy żywotności opierają się na wykrywaniu integralności błony komórkowej oraz mierzeniu aktywności metabolicznej komórek [191]. Integralność błony komórkowej jest możliwa do wykrycia m.in. dzięki błękitowi trypanu barwiącemu tylko martwe komórki lub dzięki barwnikom fluorescencyjnym, takim jak: EtBr i PI przechodzącymi przez uszkodzoną błonę i akumulującymi się w martwych komórkach poprzez specyficzne wiązanie z DNA. Utrata integralności błony prowadzi również do wycieku enzymu dehydrogenazy mleczanowej, czego efekty można zmierzyć

spektrofotometrycznie. W metodach kolorymetrycznych służących do pomiaru aktywności metabolicznej, najczęściej stosowanymi odczynnikami są MTT oraz XTT. Odczynniki te pod wpływem enzymów mitochondrialnych ulegają redukcji do barwnych formazanów [192,193]. Testy określające stopień proliferacji komórek opierają się na wbudowywaniu w trakcie S-fazy podziału komórkowego do puli DNA znakowanych izotopowo prekursorów, takich jak [³H]-tymidyny lub nie promieniotwórczej BrdU [194].

Badanie właściwości cytotoksycznych zsyntezowanych związków przeprowadzono na:

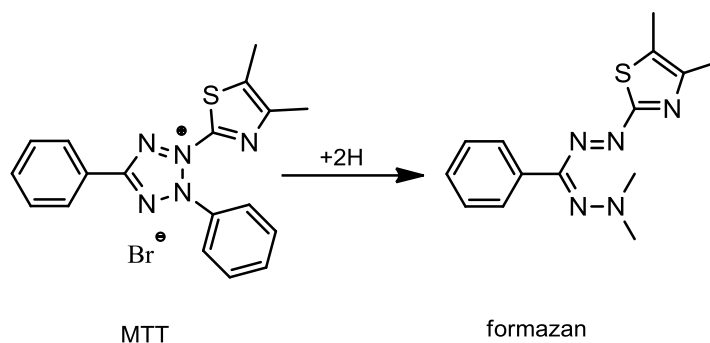
- ludzkich liniach komórkowych: niedrobnokomórkowego raka płuc (A549), raka jelita grubego (HCT-116 oraz HT-29), raka gruczołu krokowego (LNCaP), raka piersi (MCF-7), ostrej białaczki promielocytowej (HL-60),
- mysich liniach komórkowych białaczki (P288 oraz L1210),
- komórkach nowotworowych wyizolowanych z mysiego *fibrosarcoma* (włókniakomięsak) WEHI 1640,
- unieśmiertelnionych fibroblastach mysich NIH-3T3.

Ponadto, przeprowadzono badania określające wpływ badanych związków na aktywność katalityczną kompleksu rozszczepialnego topoizomeraza-DNA oraz dystrybucję komórek w cyklu komórkowym i indukcję uszkodzeń DNA. Do oceny wpływu związków na żywotność komórek wybrano test kolorymetryczny MTT.

Wszystkie testy przeprowadzono w trzykrotnych powtórzeniach. Badane związki rozpuszczono w DMSO i przygotowano seryjne rozcieńczenia roztworów. Sprawdzono wpływ na żywotność komórek wszystkich zsyntezowanych analogów batracyliny z pochodnymi tuftsyny/retro-tuftsyny (**178a-l**), aminokwasowych pochodnych batracyliny (**179a-h**) oraz analogów batracyliny z adenozyzną (**175a-h**). Przygotowano również rozcieńczenia batracyliny (**176**) oraz pochodnych tuftsyny/retro-tuftsyny (**177a-l**). Do testów przedstawiających wpływ związków na aktywność katalityczną kompleksu rozszczepialnego topoizomeraza II-DNA wybrano analogi (**178e-f**, **178k-l**). Natomiast do badań określających dystrybucję komórek w cyklu komórkowym oraz indukcję uszkodzeń DNA wybrano analogi (**178a**, **178k**).

4.2.1. Analiza przeżywalności komórkowej testem kolorymetrycznym MTT

W celu określenia cytotoksyczności otrzymanych związków przeprowadzono test z użyciem odczynnika MTT, opierający się na reakcji redukcji MTT do fioletowego formazanu (Schemat 36). MTT jest solą tetrazolową rozpuszczalną w wodzie, która dzięki dodatniemu ładunkowi z łatwością przenika do wnętrza komórki. W metabolicznie aktywnych komórkach, dzięki działaniu enzymów redukujących, powstaje nierozpuszczalny w wodzie formazan.



Schemat 36. Struktura chemiczna MTT i jego zredukowanej formy formazanu

Wadą wybranej metody jest konieczność rozpuszczenia wytrąconych kryształów formazanu za pomocą rozpuszczalnika organicznego ^[195,196]. Intensywność zabarwienia, mierzona za pomocą spektrofotometru, jest wprost proporcjonalna do aktywności metabolicznej komórki. Zaletą tej metody jest możliwość przeprowadzenia pomiaru dużej liczby próbek i niskie koszty badania.

4.2.1.1. Oznaczenie cytotoksyczności chlorowodoru batracyliny (HClxBAT)

Wstępna ewaluacja właściwości cytotoksycznych HClxBAT (**176**) na dziesięciu wybranych liniach komórkowych (A549, HCT 116, HT-29, LNCaP, MCF-7, HI-60, P388, L1210, WEHI 1640, NIH-3T3) wykazała jedynie umiarkowane właściwości cytotoksyczne tego związku. Wartość IC₅₀ mieściła się w przedziale od 35,49 μM dla komórek linii A549 do 90,20 μM dla komórek linii LNCaP. Warto zauważyć, że nie wykazano aktywności cytotoksycznej w stosunku do raka piersi (MCF-7) oraz białaczek mysich (P388, L1210) (Tabela 1).

Tabela 1. Właściwości cytotoksyczne chlorowodoru batracyliny dla wybranych linii komórkowych ludzkich oraz mysich nowotworów.

Linia komórkowa	HClxBAT IC ₅₀ ± SD [μM]
A549	46,3 ± 7,91
HCT 116	88,7 ± 23,46
HT-29	64,3 ± 12,42
LNCaP	90,2 ± 2,58
MCF-7	>100
HL-60	66,6 ± 4,26
P388	>100
L1210	>100
WEHI 1640	58,4 ± 4,17
NIH-3T3	69,9 ± 18,14

Do dalszych badań wybrano dwie linie komórkowe: A549 oraz HL-60, które w obrębie wymienionych grup nowotworów charakteryzowały się największą wrażliwością na działanie chlorowodoru batracyliny (**176**). Wartość IC₅₀ przedstawiała się odpowiednio: 46,3 μM dla A549 oraz 66,6 μM dla HL-60.

4.2.1.2. Oznaczenie cytotoksyczności pochodnych tuftsyny/retro-tuftsyny

Nie wykazano właściwości cytotoksycznych chlorowodorów pochodnych tuftsyny/retro-tuftsyny (**177a-l**) dla wybranych linii komórkowych (A549, HL-60) (Tabela 2).

Tabela 2. Właściwości cytotoksyczne pochodnych tuftsyny/retro-tuftsyny dla linii komórkowych A549 oraz HL-60.

Badany związek	IC ₅₀ ± SD [μM]	
	A549	HL-60
HClxBAT	46,3 ± 7,9	66,6 ± 4,4
2HClxThr-Lys-Pro-Arg(NO ₂)-OH	>100	>100
2HClxThr-Lys(Gly)-Pro-Arg(NO ₂)-OH	>100	>100
2HClxThr-Lys(Ala)-Pro-Arg(NO ₂)-OH	>100	>100
2HClxThr-Lys(Val)-Pro-Arg(NO ₂)-OH	>100	>100
2HClxThr-Lys(Leu)-Pro-Arg(NO ₂)-OH	>100	>100
2HClxThr-Lys(Ile)-Pro-Arg(NO ₂)-OH	>100	>100
2HClxArg(NO ₂)-Pro-Lys-Thr-OH	>100	>100
2HClxArg(NO ₂)-Pro-Lys(Gly)-Thr-OH	>100	>100
2HClxArg(NO ₂)-Pro-Lys(Ala)-Thr-OH	>100	>100
2HClxArg(NO ₂)-Pro-Lys(Val)-Thr-OH	>100	>100
2HClxArg(NO ₂)-Pro-Lys(Leu)-Thr-OH	>100	>100
2HClxArg(NO ₂)-Pro-Lys(Ile)-Thr-OH	>100	>100

4.2.1.3. Oznaczenie cytotoksyczności analogów batracyliny z pochodnymi tuftsyny/retro-tuftsyny

Analogi batracyliny z pochodnymi tuftsyny nie wykazały znaczących zmian w cytotoksyczności. Wyjątkiem okazał się analog (**178d**), który dla linii A549 okazał się około 8 razy bardziej aktywny niż chlorowodorek batracyliny (**176**) (5,9 μM). Analogi (**178c**, **178e**) okazały się nieaktywne dla obu linii, natomiast analog (**178f**) tylko dla A549.

Analogi batracyliny z pochodnymi retro-tuftsyny charakteryzowały się znacznie większą aktywnością niż chlorowodorek batracyliny (**176**). Średnio były one około 5 razy bardziej aktywne dla linii A549 oraz około 2 razy bardziej aktywne dla linii HL-60 niż chlorowodorek batracyliny (**176**) (Tabela 3). Nieaktywny okazał się tylko analog (**178i**) dla linii A549.

Najlepsze wyniki otrzymano dla analogów batracyliny z pochodnymi retro-tuftsyny z utworzonym wiązaniem izopeptydowym pomiędzy grupą ε-aminową lizyny a walina (**178j**), leucyną (**178k**) oraz izoleucyną (**178l**). Omawiane związki wykazały około 10-krotnie większą aktywność cytotoksyczną w porównaniu z chlorowodorkiem batracyliny (**176**) i pozostałymi analogami, np. dla analogu (**178l**) otrzymana aktywność była 12-krotnie większa w porównaniu do chlorowodorku batracyliny (**176**).

Warto zauważyć, że pochodne tuftsyny/retro-tuftsyny z glicyną oraz alaniną nie mają jednoznacznego wpływu na aktywność cytotoksyczną dla wybranych linii komórkowych i zależna jest ona od rodzaju nowotworu.

Tabela 3. Właściwości cytotoksyczne analogów batracyliny z pochodnymi tuftsyny/retro-tuftsyny dla linii komórkowych A549 oraz HL-60.

Badany związek	IC ₅₀ ± SD [μM]	
	A549	HL-60
HClxBAT	46,3 ± 7,9	66,6 ± 4,4
2HClxThr-Lys-Pro-Arg(NO ₂)-BAT	46,3 ± 7,9	66,6 ± 4,4
2HClxThr-Lys(Gly)-Pro-Arg(NO ₂)-BAT	52,8 ± 11,9	77,3 ± 12,6
2HClxThr-Lys(Ala)-Pro-Arg(NO ₂)-BAT	>100	>100
2HClxThr-Lys(Val)-Pro-Arg(NO ₂)-BAT	5,9 ± 0,9	19,6 ± 3,8
2HClxThr-Lys(Leu)-Pro-Arg(NO ₂)-BAT	>100	>100
2HClxThr-Lys(Ile)-Pro-Arg(NO ₂)-BAT	>100	83,7 ± 25,8
2HClxArg(NO ₂)-Pro-Lys-Thr-BAT	17,4 ± 2,0	15,4 ± 3,1
2HClxArg(NO ₂)-Pro-Lys(Gly)-Thr-BAT	8,7 ± 2,9	30,8 ± 6,1
2HClxArg(NO ₂)-Pro-Lys(Ala)-Thr-BAT	>100	28,7 ± 6,1
2HClxArg(NO ₂)-Pro-Lys(Val)-Thr-BAT	5,6 ± 0,9	11,1 ± 2,4
2HClxArg(NO ₂)-Pro-Lys(Leu)-Thr-BAT	13,1 ± 3,9	11,0 ± 1,5
2HClxArg(NO ₂)-Pro-Lys(Ile)-Thr-BAT	4,0 ± 0,5	5,3 ± 1,8

4.2.1.4. Oznaczenie cytotoksyczności aminokwasowych pochodnych batracyliny

W reakcji batracyliny z aminokwasami (Gly, β-Ala, GABA, 5-Ava, 6-Ahx, 7-Ahp, 8-Adoc oraz 12-Ado) otrzymano pochodne charakteryzujące się znaczną aktywnością cytotoksyczną na wybranych liniach komórkowych: dla A549 była ona około 3-krotnie większa, zaś dla HL-60 około 5-krotnie większa w porównaniu do chlorowodoru batracyliny (**176**) (Tabela 4). Najlepszy wynik uzyskano dla związku (**179h**) w stosunku do komórek HL-60 (2,4 μM), który okazał się ponad 30-krotnie bardziej aktywny niż (**176**). Warto podkreślić, że omawiana pochodna dla linii A549, wykazała podobną, ponad 30-krotną aktywność (1,8 μM). Natomiast związek (**179g**) okazał się mniej aktywny w porównaniu do (**176**): 69,7 μM dla linii A549 oraz 81,1 μM dla linii HL-60.

Z powyższych danych wynika, że aminokwasowe pochodne batracyliny wykazują podobną aktywność cytotoksyczną na wybranych liniach nowotworowych. Potwierdzeniem są również wyniki uzyskane dla związku (**179a**), wykazującego około

17-krotnie (A549) oraz 16-krotnie (HL-60) większą aktywnością w porównaniu do chlorowodoru batracyliny (**176**).

Tabela 4. Właściwości cytotoksyczne aminokwasowych pochodnych batracyliny dla linii komórkowych A549 oraz HL-60.

Badany związek	IC ₅₀ ± SD [μM]	
	A549	HL-60
HClxBAT	46,3 ± 7,9	66,6 ± 4,4
HClxGly-BAT	2,7 ± 0,4	4,2 ± 0,5
HClxβ-Ala-BAT	35,0 ± 5,9	18,6 ± 3,4
HClxGABA-BAT	17,3 ± 3,1	15,9 ± 2,7
HClx5-Ava-BAT	6,3 ± 1,2	6,0 ± 0,9
HClx6-Ahx-BAT	7,9 ± 0,5	15,9 ± 3,1
HClx7-Ahp-BAT	15,3 ± 1,3	26,2 ± 2,4
HClx8-Aoc-BAT	69,7 ± 6,9	81,1 ± 5,6
HClx12-Ado-BAT	1,8 ± 0,2	2,4 ± 0,4

4.2.1.5. Oznaczenie cytotoxyczności analogów batracyliny z adenozyzną

Ewaluacja właściwości cytotoksycznych rybozydu 6-chloropuryny (**185**) na wybranych liniach komórkowych (A549 oraz HL-60) wykazała jedynie umiarkowane właściwości cytotoksyczne tego związku. Wartość IC₅₀ wynosiła 29,3 μM dla komórek linii A549 oraz 48,5 μM dla komórek linii HL-60 (Tabela 5).

Analogi batracyliny z adenozyzną okazały się całkowicie nieaktywne w prowadzonych testach. Jedynie związek (**175e**) charakteryzował się umiarkowaną aktywnością cytotoksyczną w stosunku do linii A549, wynoszącą 40,6 μM, co jest porównywalne z wynikiem otrzymanym dla chlorowodoru batracyliny (**176**).

Dalsze badania biologiczne wykazały, że analogi (**175a-h**), po dodaniu do wody lub medium hodowlanego, tworzyły struktury supramolekularne, które nie były w stanie wnikać do wnętrza komórek. Wynikiem tego procesu był brak aktywności cytotoksycznej otrzymanych analogów, nawet przy największym badanym stężeniu (100 μM). Jedynie dla związku (**175e**) nie odnotowano tworzenia takiej supramolekularnej struktury, dzięki czemu wnikał on do wnętrza badanych komórek i w prowadzonych testach okazał się aktywny.

Mechanizm tworzenia wyżej wspomnianych struktur supramolekularnych w roztworach wodnych nie został do tej pory zbadany.

Tabela 5. Właściwości cytotoksyczne analogów batracyliny z adenozyzną dla linii komórkowych A549 oraz HL-60.

Badany związek	IC ₅₀ ± SD [μM]	
	A549	HL-60
HClxBAT	46,3 ± 7,9	66,6 ± 4,4
ADO-Gly-BAT	>100	>100
ADO-β-Ala-BAT	>100	>100
ADO-GABA-BAT	>100	>100
ADO-5-Ava-BAT	>100	>100
ADO-6-Ahx-BAT	40,6 ± 3,2	>100
ADO-7-Ahp-BAT	>100	>100
ADO-8-Aoc-BAT	>100	>100
ADO-12-Ado-BAT	>100	>100
Rybozyd 6-chloropuryny	29,3 ± 1,5	48,5 ± 2,5

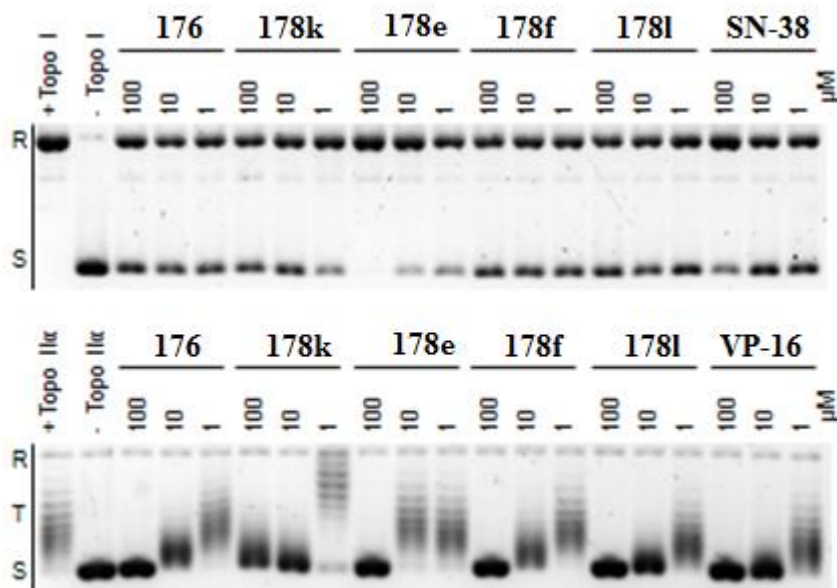
4.2.2. Określenie aktywności katalitycznej kompleksu topoizomeraza I-DNA oraz topoizomeraza II-DNA

Jak już wcześniej wspomniano, w testach na linii komórkowej HT-29, batracylina wykazuje działanie hamujące aktywność zarówno topoizomerazy typu I, jak i II ^[20]. Badania te były pomocne w określeniu wpływu otrzymanych analogów (**178e-f**, **178k-l**) na aktywność kompleksu rozszczepialnego topoizomeraza-DNA.

Wyniki zaprezentowane na Rysunku 41 (panel górny), pokazują, że analogi (**178e-f**, **178k-l**) nie hamują w znacznym stopniu relaksacji DNA przez topoizomerazę typu I. Natomiast, o wiele bardziej widoczny był wpływ omawianych analogów na relaksację DNA przez topoizomerazę IIα i zależał on od dawki podanego związku (Rysunek 41, panel dolny). Istotny jest fakt, że inhibicja aktywności kompleksu topoizomeraza II-DNA korelowała z aktywnością cytotoksyczną zbadaną dla linii A549 oraz HL-60. Analog (**178f**), wykazujący umiarkowaną aktywność cytotoksyczną w badaniach *in vitro* (83,7 μM dla komórek HL-60), charakteryzował się całkowitym zahamowaniem relaksacji DNA już przy stężeniu 10 μM. Dla porównania, związek (**178e**), nieaktywny biologicznie dla linii HL-60 (> 100 μM), przy stężeniu 100 μM wykazywał taki sam stopień zahamowania.

Analogi (**178k-l**) wykazujące największą aktywność cytotoksyczną w prowadzonych testach (Tabela 3), okazały się również silnymi inhibitorami topoizomerazy IIα, zdolnymi do zahamowania aktywności tego enzymu już przy stężeniu

10 μ M. Otrzymane wyniki były porównywalne z uzyskanymi dla pozytywnej próby kontrolnej (etopozyd - VP-16).

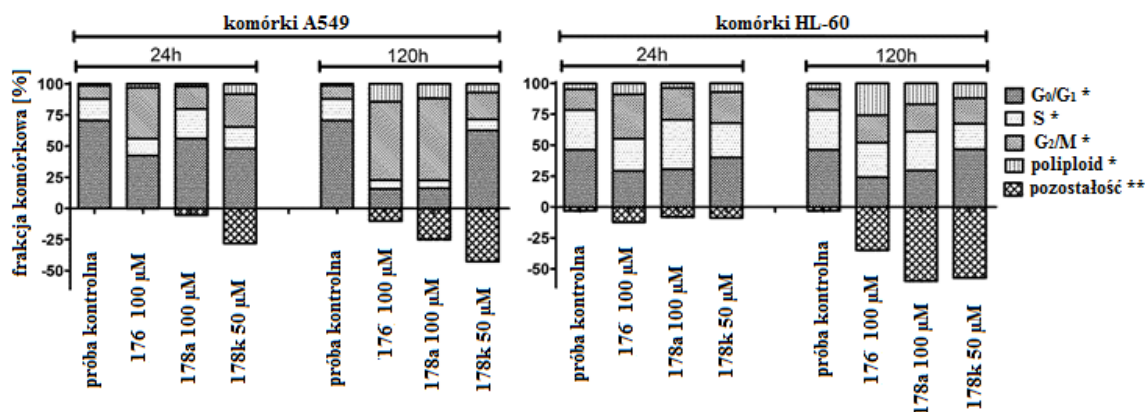


Rysunek 41. Wpływ chlorowodoru batracyliny (**176**) oraz wybranych analogów (**178e-f**, **178k-l**) na katalityczną aktywność kompleksu topoiizomeraza I-DNA (panel górny) i topoiizomeraza II-DNA (panel dolny).

4.2.3. Określenie dystrybucji komórek w cyklu komórkowym oraz indukcji uszkodzeń DNA

Wpływ otrzymanych analogów batracyliny z pochodnymi tuftsyny/retro-tuftsyny na dystrybucję komórek w cyklu komórkowym oraz indukcję uszkodzeń DNA zbadano dla analogów (**178a**) oraz (**178k**), a uzyskane wyniki porównano z tymi otrzymanymi dla chlorowodoru batracyliny (**176**).

Komórki nowotworowe (linia A549 oraz linia HL-60) traktowano stężeniem związków odpowiadającym wartości IC_{90} . Indukcja pęknięć DNA następowała już po krótkim czasie (3 godz.) inkubacji komórek z badanymi związkami. Fosforylacja histonu H2AX na Ser 139 jest indukowana w wyniku pęknięć DNA, tym samym określenie stopnia fosforylacji tego histonu stanowi dobry marker w określeniu uszkodzeń DNA. Przedstawione wyniki (Rysunek 42) pokazują silną fosforylację histonu H2AX w komórkach traktowanych badanymi analogami.



Rysunek 42. Wpływ HClxBAT (176) oraz badanych analogów (178a, 178k) na dystrybucję cyklu komórkowego komórek nowotworowych A549 oraz HL-60.

Badanie zostało wykonane za pomocą cytometrii przepływowej. * - pomiar frakcji żywych komórek przedstawiony jako % komórek pozostających w cyklu komórkowym, ** - pomiar frakcji sub-G1 przedstawiony jako % ze wszystkich zliczonych zdarzeń.

Analiza cyklu komórkowego (Rysunek 43) oraz morfologii jądra komórkowego (Rysunek 44), po traktowaniu komórek nowotworowych badanymi związkami (176, 178a, 178k) wykazała, że odpowiedź biologiczna zależy od typu komórek. W przypadku linii A549, dystrybucja komórek w cyklu ulegała znaczącym zaburzeniom już po 24 godz. inkubacji ze związkiem, powodując akumulację komórek w fazie G2/M cyklu komórkowego. Efekt ten ulegał wzmocnieniu w trakcie kolejnych czterech dni inkubacji.

Dla badanych analogów (178a, 178k) przyrost frakcji sub-G1 był znaczący w populacji komórek inkubowanych z omawianymi związkami. Zjawisko to jest związane z indukcją śmierci komórkowej oraz fragmentacją obumierających komórek (Rysunek 43). Związek (178a) powodował 2,5-krotny wzrost frakcji sub-G1 w porównaniu do chlorowodoru batracyliny (176). Brak mitoz w komórkach inkubowanych z badanymi związkami (barwienie z użyciem barwnika fluorescencyjnego Hoechst 33342) (Rysunek 43), w połączeniu z wynikami otrzymanymi dla cytometrii przepływowej, wskazał na wstrzymanie proliferacji w fazie G2 cyklu komórkowego w linii A549. Komórki A549, nie podatne na apoptozę, poddane działaniu badanych związków nabierały cech fenotypowych charakterystycznych dla komórek ulegających procesowi przedwczesnego starzenia indukowanego lekami. Jak pokazano (Rysunek 44 i 45) morfologia jąder komórkowych jest zmieniona w stosunku do komórek nietraktowanych

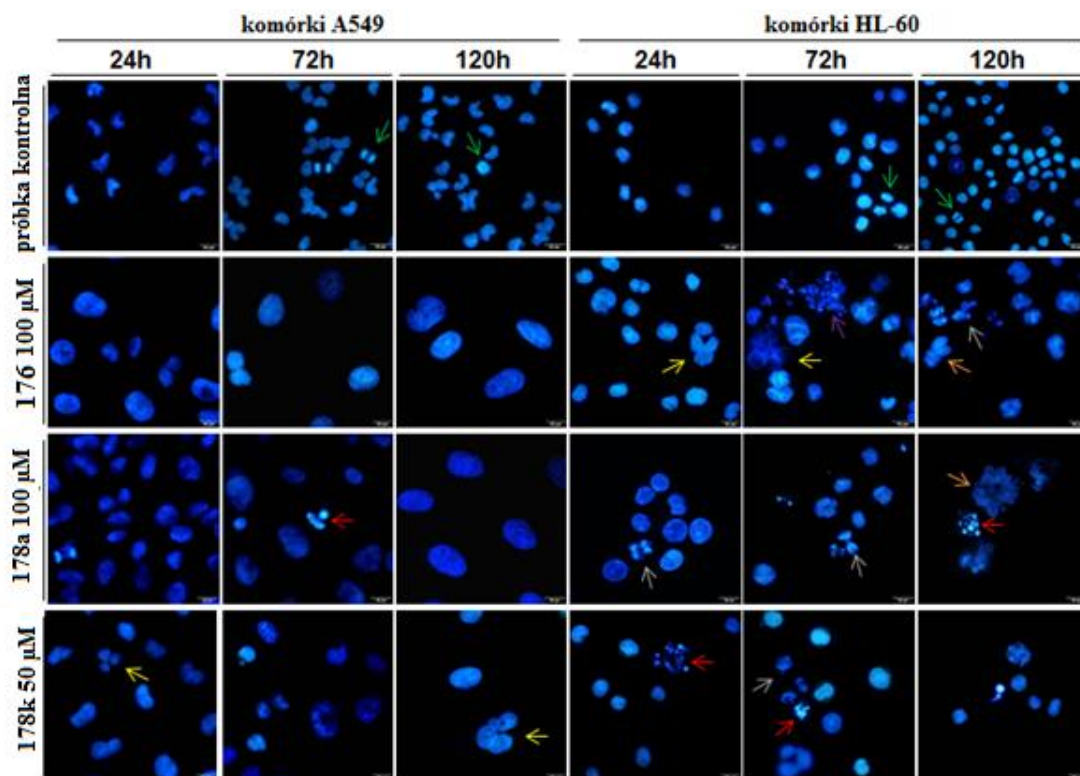
związkami – stopniowo jądra ulegały powiększeniu, a także same komórki stały się bardzo duże oraz rozpląszczone.

Indukcja przedwczesnego starzenia komórek A549 traktowanych chlorowodorkiem batracyliny (**176**) i analogiem (**178k**) została także potwierdzona poprzez wizualizację ekspresji związanej ze starzeniem β -galaktozydazy (Rysunek 46).

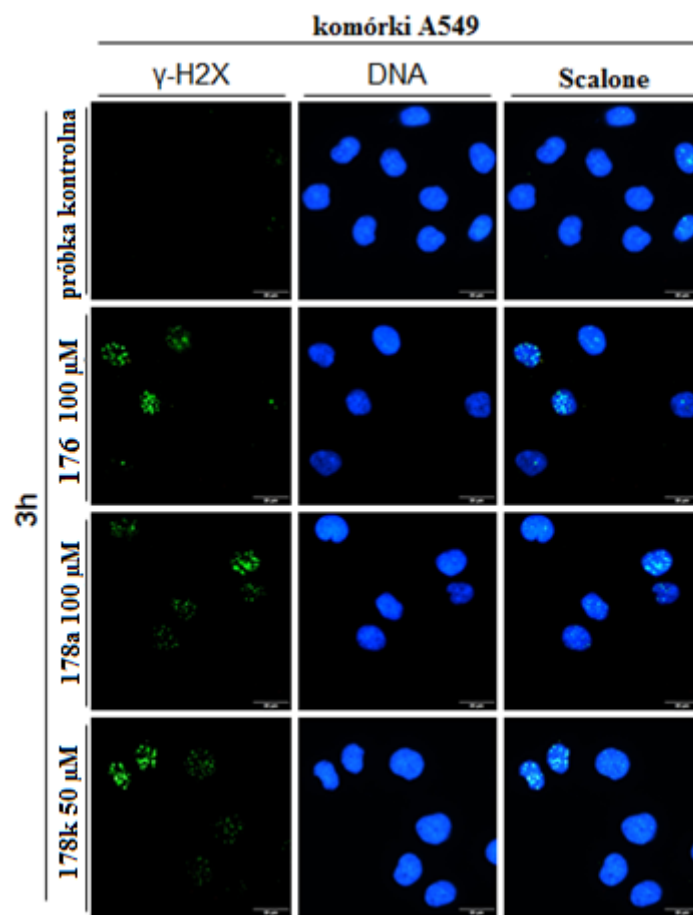
Komórki białaczki HL-60 poddane 24 godz. działaniu chlorowodoru batracyliny (**176**) oraz analogów nie zatrzymały swojego cyklu komórkowego w fazie G2, ale wchodziły do mitozy, jednakże sama mitozą nie przebiegła poprawnie. Nie zahamowanie proliferacji komórek w fazie G2/M dla linii HL-60 może być powiązane z brakiem kinaz białkowych p53 w tych komórkach, co prowadzi do nieprawidłowych mitoz oraz poliploidii. Jak pokazano na Rysunku 41 oraz Rysunku 45, w komórkach białaczki HL-60, inkubowanych z badanymi związkami, zauważalny jest znaczny udział nieprawidłowych mitoz, „lagging telophase” oraz zaburzeń segregacji chromosomów w trakcie mitozy czy mitozy wielobiegunowej, co prowadziło do katastrofy mitotycznej, a w konsekwencji do apoptozy komórek HL-60.

Aczkolwiek, niektóre z komórek HL-60 uległy poliploidyzacji lub mikronukleizacji, konsekwencją czego była praktycznie nienaruszona błona komórkowa oraz żywotność nawet po 120 godz. inkubacji z badanymi związkami (barwienie z użyciem barwnika fluorescencyjnego – octanu fluoresceiny dla cytoplazmy) (Rysunek 45).

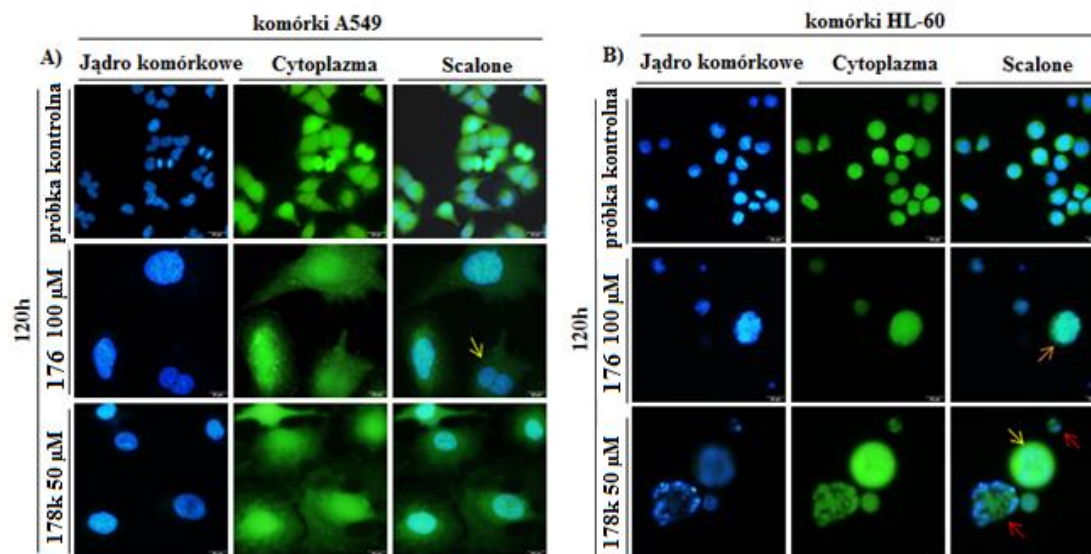
Przyrost frakcji komórek w fazie G2/M po 48 godz. z badanymi związkami wynosił odpowiednio, dla komórek HL-60: 2 razy więcej komórek w fazie G2/M niż w kontroli oraz dla komórek A549: od 3 do 5 razy więcej komórek w fazie G2/M niż w kontroli. Ponadto, dla linii A549, zauważalny jest znaczny spadek poliploidyzacji i mikronukleizacji w porównaniu z chlorowodorkiem batracyliny (**176**).



Rysunek 43. Morfologia komórek nowotworowych inkubowanych z chlorowodorkiem batracyliny (**176**) oraz analogami (**178a**, **178k**). Barwienie z użyciem barwnika fluorescencyjnego Hoechst 33342. Strzałka zielona – mitozą; strzałka żółta – poliploidia; strzałka pomarańczowa – wielokrotna mikronukleizacja; strzałka szara – „lagging telophase”; strzałka fioletowa – katastrofa mitotyczna; strzałka czerwona – ciała apoptotyczne; skala – 20μm.



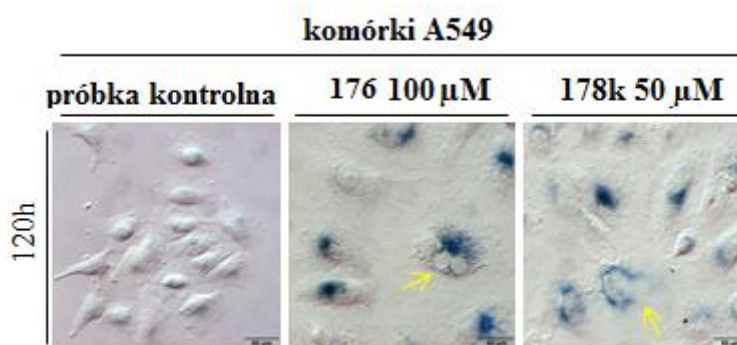
Rysunek 44. Dwuniciowe pęknięcia DNA (DSB) w linii komórkowej A549 inkubowanej z chlorowodorkiem batracyliny (**176**) oraz analogami (**178a**, **178k**). Komórki traktowano badanymi związkami przez 3 godz., barwiono przeciwciałami γ -H2AX skoniungowanymi z AlexaFluor 488 oraz zanalizowano za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej. Jądra komórkowe zostały wybarwione za pomocą DAPI; skala - 20 μ m.



Rysunek 45. Morfologia komórek. Komórki barwiono octanem fluoresceiny i Hoechst 33342. Zdjęcia powstały przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej.

- A) Morfologia komórek A549 traktowanych HClxBAT (**176**) oraz analogiem (**178k**). Komórki stały się większe i rozplaszczone. Poliploidie oznaczone żółtą strzałką; skala - 20 μm .
- B) Morfologia komórek HL-60 traktowanych HClxBAT (**176**) oraz analogiem (**178k**). Poliploid oraz komórki z wielokrotną mikronukleizacją (oznaczone odpowiednio żółtą i pomarańczową strzałką) obserwowane są jako komórki apoptotyczne na różnych etapach (oznaczone czerwoną strzałką).

Podobne efekty zaobserwowano dla komórek potraktowanych związkami (**178a**); skala - 20 μm .



Rysunek 46. Przedwczesne starzenie indukowane lekami. Ekspresja związanej ze starzeniem β -galaktozydazy była badana w komórkach po 120 godz. traktowania inkubowanymi lekami, za pomocą barwienia X-Gal (żółta strzałka – poliploid; skala – 50 μm).

5. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

Wszystkie reakcje prowadziłam w standardowych warunkach laboratoryjnych. Odczynniki dostępne handlowo używałam bez wcześniejszego oczyszczania. Wszystkie rozpuszczalniki organiczne stosowane w syntezach oczyszczałam zgodnie z procedurami opisanymi w literaturze [200]. Syntezy z udziałem związków i odczynników wrażliwych na wilgoć i utlenianie przeprowadziłam w atmosferze gazu obojętnego – azotu.

Temperatura topnienia

Temperaturę topnienia (temp. top.) otrzymanych związków mierzyłam przy użyciu aparatu Kofler'a i nie była ona korygowana.

MS

Widma masowe związków zostały zarejestrowane na aparacie MALDI-TOF MS, Biflex III Bruker w Pracowni Spektrometrii Mas MALDI-TOF Uniwersytetu Gdańskiego na Wydziale Chemii, z zastosowaniem CCA lub DHB jako matrycy oraz w Katedrze Chemii Analitycznej Politechniki Gdańskiej na aparacie 6540 UHD Accurate-Mass Q-TOF (spektrometr mas ESI).

NMR

Widma protonowe ^1H NMR oraz węglowe ^{13}C NMR związków zostały zarejestrowane na spektrometrze Varian Unity 500 Plus (500,13 MHz dla ^1H NMR, 125,76 MHz dla ^{13}C NMR) w DMSO-*d*6 (wzbudzenie 99,95%) przy użyciu 5 mm sondy szerokopasmowej detekcji odwrotnej. Główny pik DMSO-*d*6 (2,49 ppm dla ^1H NMR oraz 39,50 ppm dla ^{13}C NMR) posłużył jako punkt odniesienia.

Widma ^{13}C NMR zostały zarejestrowane przy szerokości spektralnej 28777 Hz.

Widma dwuwymiarowe 2D ^1H NMR (g-COESY, ROESY oraz TOCSY) związków zostały zarejestrowane w trybie fazoczułym przy szerokości spektralnej 8000 Hz.

Widmo g-COESY zarejestrowano na matrycy 4096 X 320 i przetworzono na matrycy 4K X 1K.

Widmo ROESY zarejestrowano na matrycy 2560 X 300 i przetworzono na matrycy 4K X 1K przy maksymalnym czasie 350 ms.

Widmo TOCSY zarejestrowano na matrycy 4096 x 320 i przetworzono na matrycy 4K x 1K .

Widmo HSQC zostało zarejestrowane w trybie fazoczułym. Okno spektralne dla ^1H NMR oraz ^{13}C NMR wynosiło odpowiednio 5,169 Hz oraz 18,853 Hz. Pomiarzy zostały zarejestrowane na matrycy 2048 x 187 i przetworzone na matrycy 2K x 1K.

Widmo HMBC: okno spektralne dla ^1H NMR oraz ^{13}C NMR wynosiło odpowiednio 5,169 Hz oraz 21,995 Hz. Pomiarzy zostały zarejestrowane na matrycy 2560 x 210 i przetworzone na matrycy 2K x 1K.

Wszystkie widma zostały wykonane w Gdańskim Międzyuczelnianym Laboratorium NMR.

HPLC

Analiza została wykonana przy użyciu chromatografu cieczowego 1290 Agilent (Agilent Technology, Waldbronn, Niemcy) zaopatrzonego w pompę binarną G4220A, automatyczny wstrzykiwacz G4226A, termostatowaną kolumnę G1316C oraz detektor diodowy G1315C. Chromatogramy dla wybranych związków przedstawiłam w Załącznikach 5-23.

Kolumna chromatograficzna: Supelcosil C-18, (4.6 x 150 mm), 3 μm , Supelco.

Badane próbki zostały rozpuszczone w mieszaninie DMSO:MeOH (1:1 v/v). Na kolumnę chromatograficzną została nastrzyknięta próbka w ilości 2 μL . Fazę ruchomą stanowiła mieszanina rozpuszczalników A (0,1% HCOOH w wodzie) i B (0,1% HCOOH w ACN:MeOH (1:1 v/v) stosowanych w określonym gradiencie stężeń. Przepływ wynosił 2,0 mL/min.

Gradient: od 70% B do 100% B w przeciągu 15 min (dot. analogów batracyliny z pochodnymi tuftsyny/retro-tuftsyny).

Gradient: w 5 min. 20% B, w 15 min. 100% B (dot. aminokwasowych pochodnych batracyliny oraz analogów adenozyiny z batracyliną).

Detektor UV-Vis pracował przy długościach fali 254, 210 oraz 580 nm.

Kolumna była termostatowana w 40°C.

Oczyszczanie związków

Do oczyszczania związków metodą chromatografii kolumnowej stosowałam żel krzemionkowy Silica Gel 60 60 (0,063-0,200 mm, Merck), natomiast do TLC gotowych płytek pokrytych żelem krzemionkowym (Merck F₂₅₄).

Zarówno do chromatografii kolumnowej, jak i TLC używałam następujących układów rozwijających:

A.	chloroform : metanol	(4:1 v/v)
B.	chloroform : metanol	(7:1 v/v)
C.	chloroform : metanol	(9:1 v/v)
D.	chloroform : metanol	(10:1 v/v)
E.	chloroform : metanol	(20:1 v/v)
F.	chlorek metylenu : metanol	(50:1 v/v)
G.	chlorek metylenu : metanol	(30:1 v/v)
H.	chlorek metylenu: metanol	(20:1 v/v)
I.	chlorek metylenu : metanol	(10:1 v/v)
J.	chlorek metylenu : metanol	(7:1 v/v)
K.	octan etylu	
L.	chloroform : metanol : kwas octowy	(90:8:2 v/v)

Jako odczynnik wywołujący (tzw. wywoływacz) stosowałam:

- wywoływacz ninhydrynowy o składzie:

200 mg ninhydryny

100 ml etanolu

2 ml kwasu octowego

5.1. Synteza batracyliny (Schemat 24)

5.1.1. *N,N'*-Diacetylo-1,4-fenylendiamina (**18**)

2 g (18 mmola) 1,4-fenylendiaminy (**17**) rozpuściłam w 20 ml CH₃COOH otrzymując 2,65 g (13,76 mmola) *N,N'*-diacetylo-1,4-fenylendiaminy (**18**) w postaci jasnofioletowego osadu (wyd. 75%), temp. top. 313–319°C.

Lit. ^[40]: wyd.: 84,7%, temp. top. 308-312°C.

5.1.2. *N*-[2-(Ftalimidometylo)-1,4-acetylo]fenylendiaminy (**20**)

Wychodząc z 1,34 g (6,97 mmola) *N,N'*-diacetylo-1,4-fenylendiaminy (**18**), 8 ml H₂SO₄ oraz 1,58 g (8,92 mmola) *N*-(hydroksymetylo)ftalimidu otrzymałam 1,73 g (4,92 mmola) związku (**20**) w postaci kremowego osadu (wyd. 71%), temp. top. 253-259°C.

Lit. ^[40]: wyd.: 64.2%, temp. top. 258-262°C.

5.1.3. 8-Aminoizoindolo[1,2-*b*]chinazolino-12(10*H*)-on (**1**) oraz (**176**)

1,74 g (4,92 mmola) *N*-[2-(ftalimidometylo)-1,4-acetylo]fenylendiaminy (**20**) rozpuściłam w 2 ml H₂SO₄ otrzymując 1,33 g (4,97 mmola) związku (**2**). Po krystalizacji z DMF uzyskałam 0,96 g (3,85 mmola) batracyliny (**1**). Związek oczyściłam za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie H, a następnie na TLC w układzie D, wyd. 77%, temp. top. 265-268°C, osad barwy żółtej, R_f = 0,62 (w ukł. K).

Lit. ^[40]: wyd. 70%, temp. top. 268-270°C.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 4,79 (s, 2H, 10), 5,55 (s, 2H, 8''-NH₂), 6,45 (s, 1H, 9), 6,48 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, 7), 7,12 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, 6), 7,33 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H, 3), 7,75 (t, *J* = 7,33 Hz, 1H, 2), 7,32 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H, 4), 7,82 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H, 1); MALDI-TOF-MS [M+H]⁺ *m/z* obliczona: 249,27; znaleziona: 250,5.

Chlorowodorek 8-aminoizoindolo[1,2-*b*]chinazolino-12(10*H*)-onu (176)

0,040 g (0,160 mmola) BAT (**1**) rozpuściłam w 5 ml bezw. eteru dietylowego nasyconego chlorowodorek otrzymując 0,031 g (0,119 mmola) produktu (**176**) w postaci żółtego osadu (wyd. 74%), temp. top. 280–284°C. Postęp reakcji kontrolowałam na TLC w układzie K ($R_f = 0,02$).

5.2. Pochodne aminokwasów (Schemat 28)

5.2.1. Synteza Boc chronionych aminokwasów (181a-g)

5.2.1.1. Boc-Thr-OH (181a), Boc-Pro-OH (181b), Boc-Gly-OH (181c), Boc-Ala-OH (181d), Boc-Val-OH (181e), Boc-Leu-OH (181f), Boc-Ile-OH (181g)

Metodę wprowadzania osłony Boc na grupę aminową przedstawiłam na przykładzie treoniny oraz leucyny. Dane otrzymane dla poszczególnych aminokwasów zestawiałam w Tabeli 6.

Boc-Thr-OH (181a)

Wychodząc z 6 g (50,3 mmola) H-Thr-OH (**180a**), 65,51 ml H₂O, 131 ml 1,4-dioksanu, 68,4 ml 4N NaOH oraz 16,05 g (26,8 mmola) pirowęgłanu di-*tert*-butylu otrzymałam 8,24 g (37,58 mmola) Boc-Thr-OH (**155a**) w postaci białego osadu (wyd. 88%), temp. top. 75-77°C, $R_f = 0,46$ (w ukł. C).

Boc-Leu-OH (181f)

Wychodząc z 5 g (38,12 mmola) H-Leu-OH (**180f**), 76 ml alkoholu *tert*-butylowego, 44 ml 2N NaOH oraz 8,9 g (14,86 mmola) pirowęgłanu di-*tert*-butylu otrzymałam 5,13 g (22,17 mmola) Boc-Leu-OH (**155f**) w postaci białego osadu (wyd. 74%), temp. top. 80-82°C, $R_f = 0,56$ (w ukł. C).

Tabela 6. Charakterystyka Boc chronionych aminokwasów (**181a-f**)

Boc-AA-OH	Wyd. [%]	Temp. top. [°C]	R_f/Ukl. X	Wyd. lit. [%] [182,197, 198]	Temp. top. [°C] [182,197, 198]
Boc-Thr-OH	88	77-81	0,46/C	80	80-82
Boc-Pro-OH	79	135-137	0,68/D	80	133-135
Boc-Gly-OH	89	87-90	0,65/D	85	80-88
Boc-Ala-OH	77	80-85	0,54/C	80	78-85
Boc-Val-OH	88	75-77	0,66/L	82	75-82
Boc-Leu-OH	77	87-90	0,56/C	79	85-90
Boc-Ile-OH	79	olej	0,58/C	82	66-69

5.3. Pochodne tuftsyny/retro-tuftsyny (Rysunek 40)

Procedura otrzymywania tri-, tetra- i pentapeptydów jest analogiczna jak w przypadku syntezy dipeptydów. Postęp reakcji każdego z etapów kontrolowałam na TLC w układzie D.

5.3.1. Synteza pochodnych tuftsyny (**172a-f**) oraz (**182a-f**)

5.3.1.1. Tetrapeptyd Boc-Thr-Lys(Boc)-Pro-Arg(NO₂)-OMe (**172a**)

5.3.1.1.1. Dipeptyd Boc-Pro-Arg(NO₂)-OMe

2,38 g (11,1 mmola) Boc-Pro-OH (**181b**) rozpuściłam w 5 ml bezw. DMF i ochłodziłam do -15°C. Następnie dodałam 1,24 ml (11,1 mmola) NMM oraz 1,43 ml (11,1 mmola) iBuOCOCl. Po 5 min. mieszania w stałej temperaturze dodałam ochłodzony roztwór 3 g (11,1 mmola) HClxArg(NO₂)-OMe w 5 ml bezw. MeOH i 1,35 ml (11,1 mmola) NMM. Całość mieszałam przez 4 godz. utrzymując ujemną temperaturę, po czym pozostawiłam do ogrzania do temp. pok. na 24 godz. Po oddestylowaniu DMF pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymany produkt rozpuściłam w mieszaninie octanu etylu i wody (1:1 v/v) oraz przemyłam: 5% HCl (x2), H₂O (x2), nasyc. NaHCO₃ (x2), H₂O (x2), nasyc. NaCl (x2), H₂O (x2) i osuszyłam przy pomocy MgSO₄. Otrzymałam 4,23 g (9,82 mmola) produktu w postaci szklistej piany (wyd. 89%), temp. top. 73-77°C.

5.3.1.1.2. Tripeptyd Z-Lys(Boc)-Pro-Arg(NO₂)-OMe

Wychodząc z 1,19 g (3,15 mmola) Z-Lys(Boc)-OH, 2 x 5 ml bezw. DMF, 0,35 ml (3,15 mmola) NMM, 0,41 ml (3,15 mmola) iBuOCOCl, 1,49 g (3,35 mmola) TFAxPro-Arg(NO₂)-OMe oraz 0,42 ml (3,15 mmola) otrzymałam 1,87 g (2,70 mmola) tripeptydu Z-Lys(Boc)-Pro-Arg(NO₂)-OMe w postaci szklistej piany (wyd. 86%), temp. top. 56-61°C.

5.3.1.1.3. Tetrapeptyd Boc-Thr-Lys(Boc)-Pro-Arg(NO₂)-OMe (172a)

Wychodząc z 0,497 g (2,27 mmola) Boc-Thr-OH (**181a**), 2 x 5 ml bezw. DMF, 0,25 ml (2,27 mmola) NMM, 0,30 ml (2,27 mmola) iBuOCOCl oraz 1,27 g (2,27 mmola) H-Lys(Boc)-Pro-Arg(NO₂)-OMe otrzymałam 1,05 g (1,38 mmola) tetrapeptydu Boc-Thr-Lys(Boc)-Pro-Arg(NO₂)-OMe (**172a**) w postaci szklistej piany (wyd. 61%), temp. top. 107-112°C, $[\alpha]_D^{20} = -8$ (c 0,5 CHCl₃), R_f = 0,58 (ukł. D).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm: 1,04 (d, *J* = 5,3 Hz, 3H, γ-T4), 1,29 (m, 2H, γ-K4), 1,31 (m, 2H, δ-K5), 1,37 (s, 18H, Boc), 1,43 (m, 1H, β-K3a), 1,56 (m, 1H, γ-R4a), 1,56 (m, 1H, β-K3b), 1,74 (m, 1H, γ-R4b), 1,74 (m, 1H, β-R3), 1,91 (m, 2H, γ-P4), 2,03 (m, 2H, β-P3), 2,29 (m, 1H, ε-K6a), 3,07 (m, 2H, ε-K6b), 3,20 (m, 2H, δ-R5), 3,54 (s, 3H, OCH₃), 3,64 (m, 1H, δ-P5), 3,79 (m, 1H, β-T3), 3,86 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, α-T2), 4,24 (m, 1H, α-R2), 4,29 (d, *J* = 6,3 Hz, 1H, α-P2), 4,39 (dd, *J* = 4,5 Hz, *J* = 8,3 Hz, 1H, α-K2), 6,96 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H, α-TN), 7,47 (m, 1H, δ-KeN), 7,80 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H, α-KaN), 8,36 (bs, 1H, δ-RdN), 8,37 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, α-RaN); MALDI-TOF-MS [M+H]⁺ *m/z* obliczona: 759,85; znaleziona: 760,40.

5.3.1.2. Pentapeptydy (172b-f)

Metoda syntezy pentapeptydów (**172b-f**) została przedstawiona na przykładzie Boc-Thr-Lys(BocGly)-Pro-Arg(NO₂)-OMe (**172b**). Procedura otrzymywania dipeptydu Boc-Pro-Arg(NO₂)-OMe jest analogiczna jak dla tetrapeptydu (**172a**) (pkt. 5.3.1.1.1.).

5.3.1.2.1. Tripeptyd Boc-Lys(Z)-Pro-Arg(NO₂)-OMe

Wychodząc z 1,28 g (3,36 mmola) Boc-Lys(Z)-OH, 2 x 5 ml bezw. DMF, 0,37 ml (3,36 mmola) NMM, 0,44 ml (3,36 mmola) iBuOCOCl, 1,49 g (3,36 mmola) TFAxPro-Arg(NO₂)-OMe, 0,45 ml (3,36 mmola) TEA otrzymałam 1,96 g (2,83 mmola) tripeptydu Boc-Lys(Z)-Pro-Arg(NO₂)-OMe w postaci szklistej piany (wyd. 84%), temp. top. 59-66°C.

5.3.1.2.2. Tetrapeptyd Boc-Thr-Lys(Z)-Pro-Arg(NO₂)-OMe

Wychodząc z 0,615 g (2,80 mmola) Boc-Thr-OH (**181a**), 2 x 5 ml bezw. DMF, 0,31 ml (2,80 mmola) NMM, 0,364 ml (2,80 mmola) iBuOCOCl, 1,96 g (2,61 mmola) TFAxLys(Z)-Pro-Arg(NO₂)-OMe oraz 0,37 ml (2,80 mmola) TEA otrzymałam 1,72 g (2,17 mmola) tetrapeptydu Boc-Thr-Lys(Z)-Pro-Arg(NO₂)-OMe w postaci szklistej piany (wyd. 77%), temp. top. 92-95°C, R_f = 0,56 (ukł. D).

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 1,06 (d, *J* = 5,4 Hz, 3H, γ-T4), 1,29 (m, 2H, γ-K4), 1,33 (m, 2H, δ-K5), 1,37 (s, 9H, Boc), 1,46 (m, 1H, β-K3a), 1,56 (m, 1H, β-K3b), 1,58 (m, 1H, γ-R4a), 1,62 (m, 1H, γ-R4b), 1,70 (m, 1H, β-R3), 1,84 (m, 2H, γ-P4), 1,95 (m, 2H, β-P3), 2,30 (m, 1H, ε-K6a), 3,06 (m, 2H, ε-K6b), 3,16 (m, 2H, δ-R5), 3,64 (m, 1H, δ-P5), 3,61 (s, 3H, -OCH₃), 3,76 (m, 1H, β-T3), 3,86 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, α-T2), 4,22 (m, 1H, α-R2), 4,47 (d, *J* = 6,3 Hz, 1H, α-P2), 4,69 (dd, *J* = 4,5 Hz, *J* = 8,3 Hz, 1H, α-K2), 5,03 (m, 2H, Z-CH₂), 6,96 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H, α-TN), 7,28–7,34 (m, 5H, Ph), 7,47 (m, 1H, δ-KeN), 7,80 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H, α-KaN), 8,31 (bs, 1H, δ-RdN), 8,47 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, α-RaN); MALDI-TOF-MS [M+H]⁺ *m/z* obliczona: 793,86; znaleziona: 793,5.

5.3.1.2.3. Pentapeptyd Boc-Thr-Lys(BocGly)-Pro-Arg(NO₂)-OMe (**172b**)

Wychodząc z 0,105 g (0,6 mmola) Boc-Gly-OH (**181c**), 2 x 5 ml bezw. DMF, 0,07 ml (0,06 mmola) NMM, 0,078 ml (0,6 mmola) iBuOCOCl oraz 0,4 g (0,6 mmola) Boc-Thr-Lys-Pro-Arg(NO₂)-OMe otrzymałam 0,225 g (0,276 mmola) pentapeptydu Boc-Thr-Lys(BocGly)-Pro-Arg(NO₂)-OMe (**172b**) w postaci szklistej piany (wyd. 46%), temp. top. 106-111°C, [α]_D²⁰ = -28 (c 0,5 CHCl₃), R_f = 0,52 (ukł. D).

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 1,04 (d, $J = 8,4$ Hz, 3H, γ -T4), 1,29 (m, 2H, γ -K4), 1,31 (m, 2H, δ -K5), 1,37 (s, 18H, Boc), 1,43 (m, 1H, β -K3a), 1,56 (m, 1H, γ -R4a), 1,56 (m, 1H, β -K3b), 1,74 (m, 1H, γ -R4b), 1,74 (m, 2H, β -R3), 1,91 (m, 2H, γ -P4), 2,03 (m, 2H, β -P3), 2,29 (m, 1H, ϵ -K6a), 3,07 (m, 1H, ϵ -K6b), 3,20 (m, 2H, δ -R5), 3,54 (s, 1H, -OCH₃), 3,60 (m, 2H, α -G2), 3,63 (m, 2H, δ -P5), 3,78 (m, 1H, β -T3), 3,86 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, α -T2), 4,24 (m, 1H, α -R2), 4,29 (d, $J = 6,3$ Hz, 1H, α -P2), 4,39 (m, 1H, α -K2), 6,96 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H, α -TN), 7,40 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H, α -GN), 7,47 (m, 1H, δ -KeN), 7,80 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H, α -KaN), 8,37 (bs, 1H, δ -RdN), 8,36 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, α -RaN); MALDI-TOF-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z obliczona: 816,43; znaleziona: 816,80.

5.3.1.2.4. Pentapeptydy (172c-f)

Otrzymane pentapeptydy (172c-f) zestawiam w Tabeli 7.

Tabela 7. Charakterystyka otrzymanych pentapeptydów (172c-f)

Boc-Thr-Lys(BocX)-Pro-Arg(NO₂)-OMe	Wyd. [%]	Temp. top. [°C]	$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ (c 0,5 CHCl₃)	R_f w ukł. D
Boc-Thr-Lys(BocAla)-Pro-Arg(NO ₂)-OMe	45	106-110	-30	0,53
Boc-Thr-Lys(BocVal)-Pro-Arg(NO ₂)-OMe	37	108-113	-34	0,57
Boc-Thr-Lys(BocLeu)-Pro-Arg(NO ₂)-OMe	39	109-114	-26	0,51
Boc-Thr-Lys(BocIle)-Pro-Arg(NO ₂)-OMe	43	108-112	-38	0,56

Charakterystyka MS oraz ^1H NMR otrzymanych pentapeptydów (172c-f)

Boc-Thr-Lys(BocAla)-Pro-Arg(NO₂)-OMe (172c): ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 1,09 (d, $J = 8,3$ Hz, 3H, γ -T4), 1,13 (m, 3H, β -A3), 1,30 (m, 2H, γ -K4), 1,36 (m, 2H, δ -K5), 1,38 (s, 18H, Boc), 1,44 (m, 1H, β -K3a), 1,56 (m, 1H, γ -R4a), 1,58 (m, 2H, β -R3), 1,66 (m, 1H, β -K3b), 1,78 (m, 1H, γ -R4b), 1,89 (m, 2H, γ -P4), 2,03 (m, 2H, β -P3), 2,60 (m, 1H, ϵ -K6a), 3,09 (m, 1H, ϵ -K6b), 3,11 (m, 2H, δ -R5), 3,59 (s, 3H, -OCH₃), 3,69 (m, 2H, δ -P5), 3,84 (m, 1H, α -A2), 3,87 (m, 1H, β -T3), 3,89 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, α -T2), 4,20 (m, 1H, α -R2), 4,30 (d, $J = 6,3$ Hz, 1H, α -P2), 4,50 (m, 1H, α -K2), 6,39 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, α -TN), 6,77 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H, α -AN), 7,64 (m, 1H, δ -KeN), 7,88 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H, α -KaN), 8,28 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, α -RaN), 8,58 (bs, 1H, δ -RdN); MALDI-TOF-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z obliczona: 830,93; znaleziona: 831,65.

Boc-Thr-Lys(BocVal)-Pro-Arg(NO₂)-OMe (172d): ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 0,99 (d, *J* = 4,6 Hz, 6H, δ1-V4, δ2-V5), 1,06 (d, *J* = 4,4 Hz, 1H, β-V3), 1,10 (d, *J* = 8,3 Hz, 3H, γ-T4), 1,29 (m, 2H, γ-K4), 1,32 (d, *J* = 3,8 Hz, 2H, β-L3), 1,37 (m, 2H, δ-K5), 1,38 (s, 18H, Boc), 1,43 (m, 1H, β-K3a), 1,57 (m, 1H, γ-R4a), 1,59 (m, 2H, β-R3), 1,64 (m, 1H, β-K3b), 1,76 (m, 1H, γ-R4b), 1,97 (m, 2H, γ-P4), 2,01 (m, 2H, β-P3), 2,64 (m, 1H, ε-K6a), 3,04 (m, 1H, ε-K6b), 3,10 (m, 2H, δ-R5), 3,60 (s, 3H, -OCH₃), 3,65 (m, 2H, δ-P5), 3,82 (m, 1H, β-T3), 3,89 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, α-T2), 4,10 (m, 1H, α-L2), 4,18 (m, 1H, α-R2), 4,33 (d, *J* = 6,3 Hz, 1H, α-P2), 4,51 (m, 1H, α-K2), 4,99 (m, 1H, α-V2), 6,40 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H, α-TN), 7,09 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H, α-VN), 7,52 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H, α-LN), 7,65 (m, 1H, δ-KeN), 7,81 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H, α-KaN), 8,29 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, α-RaN), 8,57 (bs, 1H, δ-RdN); MALDI-TOF-MS [M+H]⁺ *m/z* obliczona: 858,48; znaleziona: 858,70.

Boc-Thr-Lys(BocLeu)-Pro-Arg(NO₂)-OMe (172e): ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 0,81 (d, *J* = 3,7 Hz, 3H, δ1-L5), 0,84 (d, *J* = 4,2 Hz, 3H, δ2-L6), 1,00 (d, *J* = 8,0 Hz, 3H, γ-T4), 1,28 (m, 2H, γ-K4), 1,32 (d, *J* = 3,9 Hz, 2H, β-L3), 1,35 (m, 2H, δ-K5), 1,36 (s, 18H, Boc), 1,46 (m, 1H, β-K3a), 1,54 (m, 1H, γ-R4a), 1,57 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H, γ-L4), 1,60 (m, 1H, β-K3b), 1,72 (m, 1H, γ-R4b), 1,72 (m, 2H, β-R3), 1,83 (m, 2H, γ-P4), 2,03 (m, 2H, β-P3), 2,69 (m, 1H, ε-K6a), 2,99 (m, 1H, ε-K6b), 3,13 (m, 2H, δ-R5), 3,59 (s, 3H, -OCH₃), 3,63 (m, 2H, δ-P5), 3,85 (m, 1H, β-T3), 3,85 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H, α-T2), 4,09 (m, 1H, α-L2), 4,21 (m, 1H, α-R2), 4,31 (d, *J* = 6,3 Hz, 1H, α-P2), 4,47 (m, 1H, α-K2), 6,38 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H, α-TN), 7,58 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, α-LN), 7,67 (m, 1H, δ-KeN), 7,84 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H, α-KaN), 8,26 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H, α-RaN), 8,58 (bs, 1H, δ-RdN); MALDI-TOF-MS [M+H]⁺ *m/z* obliczona: 872,50; znaleziona: 873,80.

Boc-Thr-Lys(BocIle)-Pro-Arg(NO₂)-OMe (172f): ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 0,88 (brs, 6H, γ1-IMe3, δ-IMe5), 1,14 (d, *J* = 4,0 Hz, 2H, γ2-I4), 1,07 (d, *J* = 8,2 Hz, 3H, γ-T4), 1,27 (m, 2H, γ-K4), 1,33 (m, 2H, δ-K5), 1,36 (s, 18H, Boc), 1,48 (m, 1H, β-K3a), 1,54 (m, 1H, γ-R4a), 1,54 (m, 1H, β-K3b), 1,70 (m, 1H, γ-R4b), 1,70 (m, 2H, β-R3), 1,95 (m, 2H, γ-P4), 2,10 (m, 2H, β-P3), 2,31 (m, 1H, ε-K6a), 3,04 (m, 1H, ε-K6b), 3,18 (m, 2H, δ-R5), 3,57 (s, 3H, -OCH₃), 3,60 (m, 2H, δ-P5), 3,80 (m, 1H, β-T3), 3,83 (m, 1H, β-I3), 3,84 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H, α-T2), 3,90 (m, 1H, α-I2), 4,26 (m, 1H, α-R2), 4,29 (d, *J* = 6,0 Hz, 1H, α-P2), 4,40 (m, 1H, α-K2), 6,20

(d, $J = 9,0$ Hz, 1H, α -IN), 6,97 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H, α -TN), 7,52 (m, 1H, δ -KeN), 7,84 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H, α -KaN), 8,41 (bs, 1H, δ -RdN), 8,44 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, α -RaN); MALDI-TOF-MS $[M+H]^+$ m/z obliczona: 872,50; znaleziona: 873,81.

5.3.2. Synteza pochodnych retro-tuftsyny (172g-l)

5.3.2.1. Tetrapeptyd Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(Boc)-Thr-OMe (172g)

5.3.2.1.1. Dipeptyd Z-Lys(Boc)-Thr-OMe

Wychodząc z 4 g (10,5 mmola) Z-Lys(Boc)-OH, 2 x 5 ml bezw. DMF, 1,17 ml (10,5 mmola) NMM, 1,35 ml (10,5 mmola) iBuOCOCl, 1,76 g (10,5 mmola) HClxThr-OMe oraz 1,17 ml (10,5 mmola) NMM otrzymałam 4,64 g (9,36 mmola) produktu Z-Lys(Boc)-Thr-OMe w postaci oleju (wyd. 89%).

5.3.2.1.2. Tripeptyd Z-Pro-Lys(Boc)-Thr-OMe

Wychodząc z 2,10 g (8,44 mmola) Z-Pro-OH, 2 x 5 ml bezw. DMF, 0,94 ml (10,5 mmola) NMM, 1,08 ml (8,44 mmola) iBuOCOCl, 3,05 g (8,44 mmola) H-Lys(Boc)-Thr-OMe otrzymałam 3,88 g (6,55 mmola) dipeptydu Z-Pro-Lys(Boc)-Thr-OMe w postaci szklistej piany (wyd. 78%), temp. top. 110-114°C.

5.3.2.1.3. Tetrapeptyd Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(Boc)-Thr-OMe (172g)

Wychodząc z 1,54 g (5,05 mmola) Boc-Arg(NO₂)-OH, 2 x 5 ml bezw. DMF, 0,45 ml (5,05 mmola) NMM, 0,64 ml (5,05 mmola) iBuOCOCl, 2,32 g (5,05 mmola) H-Pro-Lys(Boc)-Thr-OMe otrzymałam 1,94 g (2,55 mmola) produktu **172g** w postaci szklistej piany (wyd. 51%), temp. top. 117-121°C, $[\alpha]_D^{20} = -28$ (c 0,5, CHCl₃), $R_f = 0,56$ (ukł. D).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ ppm: 1,02 (d, $J = 5,5$ Hz, 3H, γ -T4), 1,25 (m, 2H, γ -K4), 1,33 (m, 2H, δ -K5), 1,35 (s, 18H, Boc), 1,49 (m, 1H, β -K3a), 1,54 (m, 1H, γ -R4a), 1,61 (m, 1H, β -R3), 1,62 (m, 1H, β -K3b), 1,71 (m, 1H, γ -R4b), 1,81 (m, 2H, γ -P4), 2,01 (m, 2H, β -P3), 2,86 (m, 1H, ϵ -K6a), 2,89 (m, 2H, ϵ -K6b), 3,10 (m, 2H, δ -R5), 3,49

(m, 1H, δ -P5), 3,54 (s, 3H, -OCH₃) 4,11 (m, 1H, β -T3), 4,14 (m, 1H, α -R2), 4,24 (dd, $J = 4,5$ Hz, $J = 8,3$ Hz, 1H, α -K2), 4,26 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, α -T2), 4,35 (d, $J = 6,3$ Hz, 1H, α -P2), 6,73 (m, 1H, δ -KeN), 7,78 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H, α -TN), 7,98 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H, α -KaN), 8,47 (bs, 1H, δ -RdN), 8,90 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, α -RaN); MALDI-TOF-MS [M+H]⁺ m/z obliczona: 759,85; znaleziona: 760,56.

5.3.2.2. Pentapeptydy (172h-l)

Otrzymywanie pentapeptydów (172h-l) przedstawiłam na przykładzie Boc-Arg(NO₂)-Lys(BocGly)-Pro-Thr-OMe (172h).

5.3.2.2.1. Dipeptyd Boc-Lys(Z)-Thr-OMe

Wychodząc z 2,33 g (6,11 mmola) Boc-Lys(Z)-OH, 2 x 5 ml bezw. DMF, 0,68 ml (6,11 mmola) NMM, 0,80 ml (6,11 mmola) iBuOCOCl, 1,02 g (6,11 mmola) HClxThr-OMe, 0,81 ml (6,11 mmola) TEA otrzymałam 1,87 g (3,77 mmola) dipeptydu Boc-Lys(Z)-Thr-OMe w postaci oleju (wyd. 84%).

5.3.2.2.2. Tripeptyd Boc-Pro-Lys(Z)-Thr-OMe

Wychodząc z 0,74 g (3,45 mmola) Boc-Pro-OH (181b), 2 x 5 ml bezw. DMF, 0,38 ml (3,45 mmola) NMM, 0,45 ml (3,45 mmola) iBuOCOCl, 1,76 g (3,45 mmola) TFAxLys(Z)-Thr-OMe, 0,38 ml (3,45 mmola) NMM otrzymałam 1,52 g (2,56 mmola) tripeptydu Boc-Pro-Lys(Z)-Thr-OMe w postaci oleju (wyd. 74%).

5.3.2.2.3. Tetrapeptyd Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(Z)-Thr-OMe

Wychodząc z 0,65 g (2,14 mmola) Boc-Arg(NO₂)-OH, 2 x 5 ml bezw. DMF, 0,24 ml (2,14 mmola) NMM, 0,27 ml (2,14 mmola) iBuOCOCl, 1,30 g (2,14 mmola) TFAxPro-Lys(Z)-Thr-OMe, 0,24 ml (2,14 mmola) NMM otrzymałam 1,13 g (1,42 mmola) tripeptydu Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(Z)-Thr-OMe w postaci oleju (wyd. 66%).

5.3.2.2.4. Pentapeptyd Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(BocGly)-Thr-OMe (172h)

Wychodząc z 0,133 g (0,76 mmola) Boc-Gly-OH (**181c**), 2 x 5 ml bezw. DMF, 0,08 ml (0,76 mmola) NMM, 0,098 ml (0,76 mmola) iBuOCOCl, 0,5 g (0,76 mmola) Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys-Thr-OMe otrzymałam 0,261 g (0,32 mmola) pentapeptydu Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(BocGly)-Thr-OMe (**156h**) w postaci szklistej piany (wyd. 49%), temp. top. 117-121°C, $[\alpha]_D^{20} = -28$ (c 0,5 CHCl₃), R_f = 0,50 (ukł. D).

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δppm: 1,05 (d, *J* = 8,4 Hz, 3H, γ-T4), 1,36 (m, 2H, γ-K4), 1,37 (s, 9H, Boc), 1,40 (m, 2H, δ-K5), 1,49 (m, 2H, β-R3), 1,53 (m, 2H, β-K3), 1,59 (m, 2H, γ-R4), 1,84 (m, 2H, β-P3), 1,91 (m, 1H, γ-P4), 2,97 (m, 1H, ε-K6), 3,13 (m, 2H, δ-R5), 3,43 (d, *J* = 6,4 Hz, 1H, α-P2), 3,55 (m, 2H, δ-P5), 3,60 (m, 2H, α-G2), 3,63 (s, 3H, T-COOCH₃), 4,12 (m, 1H, β-T3), 4,16 (m, 1H, α-R2), 4,28 (m, 1H, α-K2), 4,29 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H, α-T2), 5,00 (s, 1H, T3-OH), 6,92 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H, α-RaN), 7,38 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H, α-GN), 7,80 (d, *J* = 6,2 Hz, 1H, α-TN), 7,83 (m, 1H, δ-KeN), 8,01 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H, α-KaN), 8,49 (bs, 1H, δ-RdN). MALDI-TOF-MS [M+H]⁺ *m/z* obliczona: 816,43; znaleziona: 817,10.

5.3.2.2.5. Pentapeptydy (172i-l)

Dane otrzymane dla pentapeptydów (**172i-l**) zestawiałam w Tabeli 8.

Tabela 8. Charakterystyka otrzymanych chronionych pentapeptydów (**172i-l**)

Boc-Arg(NO ₂)-Pro-Lys(BocX)-Thr-OMe	Wyd. [%]	Temp. top. [°C]	$[\alpha]_D^{20}$ (c 0,5, CHCl ₃)	R _f w ukł. D
Boc-Arg(NO ₂)-Pro-Lys(BocAla)-Thr-OMe	41	61-65	-19	0,56
Boc-Arg(NO ₂)-Pro-Lys(BocVal)-Thr-OMe	32	136-138	-21	0,54
Boc-Arg(NO ₂)-Pro-Lys(BocLeu)-Thr-OMe	39	106-110	-24	0,52
Boc-Arg(NO ₂)-Pro-Lys(BocIle)-Thr-OMe	37	101-104	-42	0,56

Charakterystyka MS i ¹H NMR otrzymanych chronionych pentapeptydów (172i-l)

Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(BocAla)-Thr-OMe (172i): ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 1,03 (d, *J* = 8,0 Hz, 3H, γ-T4), 1,16 (m, 3H, β-A3), 1,25 (m, 2H, γ-K4), 1,31 (m, 2H, δ-K5), 1,35 (s, 18H, Boc), 1,51 (m, 1H, β-K3a), 1,54 (m, 1H, γ-R4a), 1,60 (m, 2H, β-R3), 1,65 (m, 1H, β-K3b), 1,79 (m, 1H, γ-R4b), 1,87 (m, 2H, γ-P4), 2,02 (m, 2H, β-P3), 3,01 (m, 1H, ε-K6a), 3,09 (m, 1H, ε-K6b), 3,13 (m, 2H, δ-R5), 3,61 (s, 3H, -OCH₃), 3,58 (m, 2H, δ-P5), 3,89 (m, 1H, α-A2), 4,09 (m, 1H, β-T3), 4,13 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, α-T2), 4,27 (m, 1H, α-R2), 4,25 (d, *J* = 6,4 Hz, 1H, α-P2), 4,36 (m, 1H, α-K2), 7,35 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, α-TN), 7,78 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H, α-AN), 7,79 (m, 1H, δ-KeN), 7,98 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H, α-KaN), 8,18 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, α-RaN), 8,46 (bs, 1H, δ-RdN); MALDI-TOF-MS [M+H]⁺ *m/z* obliczona: 830,93; znaleziona: 831,65.

Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(BocVal)-Thr-OMe (172j): ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 0,97 (d, *J* = 4,9 Hz, 6H, δ1-V4, δ2-V5), 0,97 (d, *J* = 4,6 Hz, 1H, β-V3), 1,05 (d, *J* = 7,6 Hz, 3H, γ-T4), 1,31 (m, 2H, γ-K4), 1,38 (s, 9H, Boc), 1,40 (m, 2H, δ-K5), 1,51 (m, 2H, β-K3), 1,55 (m, 2H, γ-R4), 1,62 (m, 2H, β-R3), 1,84 (m, 2H, β-P3), 1,91 (m, 1H, γ-P4), 2,97 (m, 1H, ε-K6), 3,14 (m, 2H, δ-R5), 3,57 (m, 2H, δ-P5), 3,63 (s, 3H, T-COOCH₃), 4,13 (m, 1H, β-T3), 4,16 (m, 1H, α-R2), 4,29 (m, 1H, α-K2), 4,26 (d, *J* = 6,3 Hz, 1H, α-T2), 4,32 (d, *J* = 5,9 Hz, 1H, α-P2), 4,99 (s, 1H, T3-OH), 5,04 (m, 2H, α-V2), 7,01 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H, α-RaN), 7,02 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H, α-VN), 7,81 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H, α-TN), 7,84 (m, 1H, δ-KeN), 8,22 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H, α-KaN), 8,49 (bs, 1H, δ-RdN); MALDI-TOF-MS [M+H]⁺ *m/z* obliczona: 858,48; znaleziona: 856,60.

Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(BocLeu)-Thr-OMe (172k): ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 0,82 (d, *J* = 6,4 Hz, 3H, δ1-L5), 0,83 (d, *J* = 6,4 Hz, 3H, δ2-L6), 1,03 (d, *J* = 6,1 Hz, 3H, γ-T4), 1,34 (m, 2H, γ-K4), 1,37 (m, 2H, δ-K5), 1,41 (s, 9H, Boc), 1,46 (m, 2H, β-L3), 1,48 (m, 2H, δ-K5), 1,51 (m, 1H, β-R3), 1,52 (m, 1H, β-K3), 1,55 (m, 2H, γ-R4), 1,6 (m, 2H, γ-L4), 1,70 (m, 1H, β-R3), 1,72 (m, 1H, β-K3), 1,82 (m, 1H, β-P3), 1,93 (m, 2H, γ-P4), 2,06 (m, 1H, β-P3), 3,05 (m, 2H, ε-K6), 3,13 (m, 2H, δ-R5), 3,45 (m, 1H, δ-P5), 3,55 (m, 1H, δ-P5), 3,55 (s, 3H, T-COOCH₃), 4,0 (dt, *J* = 5,2 Hz, *J* = 9,0 Hz, 1H, α-L2), 4,13 (m, 1H, β-T3), 4,18 (m, 1H, α-R2), 4,33 (dd, *J* = 3,4 Hz, *J* = 8,5 Hz, α-T2), 4,29 (m, 1H, α-K2), 4,4 (dd, *J* = 4,0 Hz, *J* = 8,3 Hz, 1H, α-P2), 5,00 (s, 1H, T3-OH), 7,37 (m, 1H, δ-KeN), 7,55 (bs, 1H, α-LN), 7,74 (d, *J* = 7,6 Hz,

1H, α -TN), 7,78 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, α -TN), 7,92 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H, α -KaN), 7,98 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H, α -RaN), 8,18 (bs, 1H, δ -RdN), 8,03 (t, $J = 5,5$ Hz, ϵ -K6), 8,1 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, α -KN), 8,44 (bs, 1H, δ -R5); MALDI-TOF-MS $[M+H]^+$ m/z obliczona: 872,50; znaleziona: 873,60.

Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(BocIle)-Thr-OMe (1721): ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 0,82 (brs, 6H, γ 1-IMe3, δ -IMe5), 1,04 (d, $J = 7,9$ Hz, 3H, γ -T4), 1,21 (m, 2H, γ -K4), 1,38 (m, 2H, δ -K5), 1,36 (s, 9H, Boc), 1,48 (m, 2H, δ -K5), 1,52 (m, 1H, β -K3), 1,55 (d, $J = 3,5$, 2H, γ 2-I4), 1,55 (m, 1H, β -R3), 1,59 (m, 2H, γ -R4), 1,59 (m, 1H, β -R3), 1,68 (m, 1H, β -K3), 1,82 (m, 1H, β -P3), 2,02 (m, 2H, γ -P4), 2,06 (m, 1H, β -P3), 3,03 (m, 2H, ϵ -K6), 3,08 (m, 2H, δ -R5), 3,50 (m, 1H, δ -P5), 3,61 (m, 1H, δ -P5), 3,85 (s, 3H, T-COOCH₃), 3,99 (m, 1H, α -I2), 4,24 (m, 1H, α -K2), 4,29 (m, 1H, β -T3), 4,34 (m, 1H, α -R2), 4,86 (d, $J = 3,0$ Hz, $J = 8,3$ Hz, α -T2), 4,87 (dd, $J = 4,5$ Hz, $J = 8,9$ Hz, 1H, α -P2), 5,02 (s, 1H, T3-OH), 6,44 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, α -RaN), 7,39 (m, 1H, δ -KeN), 7,65 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, α -IN), 7,74 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, α -TN), 7,78 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H, α -TN), 7,98 (d, $J = 6,9$ Hz, 1H, α -KaN), 8,10 (bs, 1H, δ -RdN), 8,10 (t, $J = 5,0$ Hz, ϵ -K6), 8,11 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, α -KN), 8,44 (bs, 1H, δ -R5); MALDI-TOF-MS $[M+H]^+$ m/z obliczona: 872,50; znaleziona: 873,40.

5.3.3. Deprotekcja osłon grupy aminowej i karboksylowej chronionych peptydów

5.3.3.1. Deprotekcja osłony Boc

Metodę usuwania osłony Boc przedstawiłam na przykładzie dipeptydu TFAxPro-Arg(NO₂)-OMe. Wszystkie produkty otrzymałam w postaci oleju, a wydajności mieściły się w zakresie 93-99%. Dane otrzymane dla uzyskanych związków zestawiałam w Tabeli 9.

1,46 g (3,39 mmola) dipeptydu Boc-Pro-Arg(NO₂)-OMe rozpuściłam w 10 ml TFA otrzymując 1,49 g (3,35 mmola) produktu w postaci oleju (wyd. 99%).

Tabela 9. Charakterystyka peptydów po deprotekcji osłony Boc

Produkt	Wyd. [%]	Temp. top. [°C]	R _f w ukl. D
TFAxPro-Arg(NO ₂)-OMe	99	olej	0,16
TFAxLys(Z)-Pro-Arg(NO ₂)-OMe	96	olej	0,18
TFAxLys(Z)-Thr-OMe	98	olej	0,17
TFAxPro-Lys(Z)-Thr-OMe	95	olej	0,19

5.3.3.2. Deprotekcja osłony Z

Metodę usuwania osłony Z przedstawiłam na przykładzie tripeptydu H-Lys(Boc)-Pro-Arg(NO₂)-OMe. Wszystkie produkty otrzymałam w postaci oleju a wydajności reakcji mieściły się w zakresie 76-84%. Dane otrzymane dla uzyskanych związków zestawiałam w Tabeli 10.

1,87 g (2,70 mmola) tripeptydu Z-Lys(Boc)-Pro-Arg(NO₂)-OMe rozpuściłam w 15 ml bezw. MeOH i poddałam wodorolizie stosując jako katalizator 10% Pd/C. Otrzymałam 1,27 g (2,27 mmola) produktu w postaci oleju (wyd. 84%).

Tabela 10. Charakterystyka związków po deprotekcji osłony Z

Produkt	Wyd. [%]	Temp. top. [°C]	R _f w ukl. D
H-Lys(Boc)-Pro-Arg(NO ₂)-OMe	83	olej	0,26
Boc-Thr-Lys-Pro-Arg(NO ₂)-OMe	74	olej	0,27
H-Lys(Boc)-Thr-OMe	88	olej	0,26
H-Pro-Lys(Boc)-Thr-OMe	81	olej	0,28
Boc-Arg(NO ₂)-Pro-Lys-Thr-OMe	78	olej	0,28

5.3.3.3. Deprotekcja estru metylowego (182a-1) (Schemat 29)

Metodę usuwania estru metylowego przedstawiłam na przykładzie tetrapeptydu Boc-Thr-Lys(Boc)-Pro-Arg(NO₂)-OH (**182a**). Dane otrzymane dla pentapeptydów zestawiałam w Tabeli 11.

1,05 g (1,38 mmola) tetrapeptydu Boc-Thr-Lys(Boc)-Pro-Arg(NO₂)-OMe (**172a**) rozpuściłam w 5 ml mieszaniny metanol:woda (1:1 v/v) i dodałam 0,174 g (4,14 mmola)

LiOHxH₂O otrzymując 0,852 g (1,14 mmola) tetrapeptydu z wolną grupą karboksylową (**182a**) w postaci białego osadu (wyd. 83%), temp. top. 132-137°C, R_f = 0,26 (ukł. D).

Tabela 11. Charakterystyka związków (**182a-l**)

Boc-Thr-Lys(BocX)-Pro-Arg(NO₂)-OH	Wyd. [%]	Temp. top. [°C]	R_f w ukł. D
Boc-Thr-Lys(Boc)-Pro-Arg(NO ₂)-OH	83	132-137	0,26
Boc-Thr-Lys(BocGly)-Pro-Arg(NO ₂)-OH	91	208-213	0,24
Boc-Thr-Lys(BocAla)-Pro-Arg(NO ₂)-OH	89	128-133	0,25
Boc-Thr-Lys(BocVal)-Pro-Arg(NO ₂)-OH	93	146-152	0,23
Boc-Thr-Lys(BocLeu)-Pro-Arg(NO ₂)-OH	88	124-128	0,28
Boc-Thr-Lys(BocIle)-Pro-Arg(NO ₂)-OH	84	146-150	0,26
Boc-Arg(NO ₂)-Pro-Lys(Boc)-Thr-OH	90	145-149	0,27
Boc-Arg(NO ₂)-Pro-Lys(BocGly)-Thr-OH	87	135-139	0,26
Boc-Arg(NO ₂)-Pro-Lys(BocAla)-Thr-OH	89	157-163	0,24
Boc-Arg(NO ₂)-Pro-Lys(BocVal)-Thr-OH	76	163-168	0,26
Boc-Arg(NO ₂)-Pro-Lys(BocLeu)-Thr-OH	85	156-160	0,24
Boc-Arg(NO ₂)-Pro-Lys(BocIle)-Thr-OH	80	169-171	0,24

5.3.3.4. Deprotekcja osłony Boc (**177a-l**) (Schemat 30)

Usuwanie osłony Boc przedstawiłam na przykładzie 2HClxThr-Lys-Pro-Arg(NO₂)-OH (**177a**). Postęp reakcji kontrolowałam na TLC w układzie C. Wszystkie produkty otrzymałam w postaci żółtego osadu, a wydajności reakcji mieściły się w zakresie 73-87%. Dane uzyskane dla otrzymanych związków zestawiałam w Tabeli 12.

0,087 g (0,116 mmola) związku (**172a**) rozpuściłam w 5 ml bezw. eteru dietylowego nasyconego chlorowodorem otrzymując 0,061 g (0,098 mmola) produktu (**177a**) w postaci żółtego osadu (wyd. 84%), temp. top. 117–119°C.

Tabela 12. Charakterystyka otrzymanych związków (177a-l)

Peptydy	Wyd. [%]	Temp. top. [°C]	R _f w ukł. C	MS [M+H] ⁺	
				Obl.	Znal.
2HClxThr-Lys-Pro-Arg(NO ₂)-OH	84	117-119	0,05	618,05	618,61
2HClxThr-Lys(Gly)-Pro-Arg(NO ₂)-OH	80	116-120	0,06	702,69	703,15
2HClxThr-Lys(Ala)-Pro-Arg(NO ₂)-OH	81	118-122	0,06	689,13	689,97
2HClxThr-Lys(Val)-Pro-Arg(NO ₂)-OH	87	128-130	0,05	716,68	717,45
2HClxThr-Lys(Leu)-Pro-Arg(NO ₂)-OH	78	119-124	0,07	730,70	731,63
2HClxThr-Lys(Ile)-Pro-Arg(NO ₂)-OH	85	120-124	0,06	730,70	731,54
2HClxArg(NO ₂)-Pro-Lys-Thr-OH	84	207-210	0,05	618,05	619,02
2HClxArg(NO ₂)-Pro-Lys(Gly)-Thr-OH	81	210-215	0,04	702,69	703,23
2HClxArg(NO ₂)-Pro-Lys(Ala)-Thr-OH	78	220-223	0,07	689,13	690,43
2HClxArg(NO ₂)-Pro-Lys(Val)-Thr-OH	85	208-212	0,05	716,68	717,56
2HClxArg(NO ₂)-Pro-Lys(Leu)-Thr-OH	76	222-227	0,07	730,70	731,52
2HClxArg(NO ₂)-Pro-Lys(Ile)-Thr-OH	73	213-219	0,07	730,70	731,37

5.4. Analogi batracyliny z pochodnymi tuftsyny/retro-tuftsyny

5.4.1. Synteza analogów (173a-l) (Schemat 31)

Metodę syntezy nowych analogów (173a-l) przedstawiłam na przykładzie związku (173a). Postęp reakcji kontrolowałam na TLC w układzie I. Dane uzyskane dla otrzymanych analogów zestawiałam w Tabeli 13.

Mieszaninę 0,167 g (0,67 mmola) BAT (1), 0,5 g (0,67 mmola) pochodnej tuftsyny (182a) i 159 µl (2,01 mmola) bezw. Py w 500 µl bezw. DMF schłodziłam do temp. -15°C. Dodawałam kroplami 999 µl (1,68 mmola) roztworu T3P (50% w/w) przez ok. 60 min., utrzymując temp. reakcji. Następnie reakcję prowadziłam przez 3 godz. w temp. 0°C, po czym mieszaninę podgrzałam do temp. 45°C i zostawiłam na 24 godz. Reakcję prowadziłam w warunkach gazu obojętnego (azot). Po upływie 24 godz. i oddestylowaniu rozpuszczalnika próżniowo, pozostałość rozpuściłam w octanie etylu i przemyłam trzykrotnie: 10% kwasem cytrynowym, 5% nasyc NaHCO₃ oraz wodą. Związek oczyściłam za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie F, G, H, a następnie na TLC w układzie I. Otrzymałam 0,268 g (0,275 mmola) związku (173a) w postaci żółtego osadu (wyd. 41%), temp. top. 192-195°C, R_f = 0,45 (ukł. I).

Tabela 13. Charakterystyka analogów BAT z pochodnymi tuftsyny/retro-tuftsyny (173a-l)

Analogi BAT-TUF	Wyd. [%]	Temp. top. [°C]	R _f w ukl. I
Boc-Thr-Lys(Boc)-Pro-Arg(NO ₂)-BAT	41	192-195	0,45
Boc-Thr-Lys(BocGly)-Pro-Arg(NO ₂)-BAT	38	187-190	0,43
Boc-Thr-Lys(BocAla)-Pro-Arg(NO ₂)-BAT	29	195-198	0,43
Boc-Thr-Lys(BocVal)-Pro-Arg(NO ₂)-BAT	25	183-187	0,45
Boc-Thr-Lys(BocLeu)-Pro-Arg(NO ₂)-BAT	39	185-188	0,44
Boc-Thr-Lys(BocIle)-Pro-Arg(NO ₂)-BAT	32	191-195	0,47
Boc-Arg(NO ₂)-Pro-Lys(Boc)-Thr-BAT	41	198-204	0,45
Boc-Arg(NO ₂)-Pro-Lys(BocGly)-Thr-BAT	30	202-206	0,45
Boc-Arg(NO ₂)-Pro-Lys(BocAla)-Thr-BAT	28	213-217	0,46
Boc-Arg(NO ₂)-Pro-Lys(BocVal)-Thr-BAT	25	203-206	0,46
Boc-Arg(NO ₂)-Pro-Lys(BocLeu)-Thr-BAT	30	210-214	0,41
Boc-Arg(NO ₂)-Pro-Lys(BocIle)-Thr-BAT	24	207-209	0,44

Charakterystyka MS, ¹H NMR oraz ¹³C NMR otrzymanych analogów BAT-TUF (173a-l)

Boc-Thr-Lys(Boc)-Pro-Arg(NO₂)-BAT (173a): ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 1,22 (d, *J* = 8,6 Hz, 3H, γ-T4), 1,32 (s, 9H, Boc), 1,49 (m, 2H, γ-K4), 1,49 (m, 2H, δ-K5), 1,81 (m, 1H, γ-R4a), 1,79 (m, 1H, β-K3a), 1,89 (m, 1H, β-K3b), 1,90 (m, 1H, γ-R4b), 2,06 (m, 2H, γ-P4), 2,8 (m, 2H, β-P3), 2,34 (m, 2H, β-R3), 3,17 (m, 1H, ε-K6a), 3,23 (m, 1H, ε-K6b), 3,42 (m, 2H, δ-R5), 3,86 (d, *J* = 6,3 Hz, 1H, α-P2), 4,34 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, α-T2), 4,36 (m, 1H, β-T3), 4,51 (m, 1H, α-K2), 4,55 (m, 2H, δ-P5), 4,78 (m, 1H, α-R2), 4,91 (s, 2H, 10), 4,99 (s, 1H, T3-OH), 6,39 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, α-TN), 7,35 (bdb, *J* = 8,0 Hz, 1H, 6), 7,37 (m, 1H, δ-KeN), 7,54 (bd, *J* = 8,0 Hz, 1H, 7), 7,58 (bs, 1H, 9), 7,73 (t, *J* = 7,0 Hz, 1H, 3), 7,78 (t, *J* = 7,0 Hz, 1H, 2), 7,80 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H, α-RaN), 7,87 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H, 4), 7,92 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H, α-KaN), 7,98 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H, 1), 8,18 (bs, 1H, δ-RdN), 10,12 (s, 1H, 8''-CONH); ¹³C NMR (DMSO, 125 MHz, 30,0°C): 177,55 (C-P1), 172,73 (C-T1), 172,03 (C-R1), 171,55 (C-K1), 167,04 (C-12), 160,70 (C-R6), 156,86 (C-B1), 156,68 (C-BK1), 148,65 (C-4b), 139,37 (C-5a), 135,33 (C-4a), 135,37 (C-8), 133,65 (C-2), 132,73 (C-3), 131,20 (C-12a), 128,88 (C-6), 123,46 (C-4), 123,19 (C-9a), 122,53 (C-1), 120,05 (C-7), 118,67 (C-9), 79,47 (C-B2), 79,45 (C-BK2), 68,32 (C-T2), 61,71 (C-P2), 60,52 (C-T3), 60,34 (C-R2), 57,69 (C-K2), 48,32 (C-P5), 47,75 (C-R5), 41,25 (C-10), 40,73 (C-K6), 32,56 (C-K3), 31,51 (C-P3), 30,41

(C-R3), 30,02 (C-B5), 29,95 (C-BK5), 29,80 (C-B4), 29,64 (C-R4), 29,49 (C-K5), 29,33 (C-BK4), 28,63 (C-B3), 28,48 (C-BK3), 25,93 (C-P4), 23,38 (C-K4), 22,98 (C-T4); MS MALDI-TOF-MS [M+H]⁺ *m/z* obliczona: 977,07; znaleziona: 978,50.

Boc-Thr-Lys(BocGly)-Pro-Arg(NO₂)-BAT (173b): ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 1,28 (d, *J* = 9,0 Hz, 3H, γ-T4), 1,37 (s, 9H, Boc), 1,42 (m, 2H, γ-K4), 1,42 (m, 2H, δ-K5), 1,88 (m, 1H, γ-R4a), 1,92 (m, 1H, β-K3a), 1,93 (m, 1H, β-K3b), 1,97 (m, 1H, γ-R4b), 2,14 (m, 2H, γ-P4), 2,29 (m, 2H, β-P3), 2,32 (m, 2H, β-R3), 3,20 (m, 1H, ε-K6a), 3,37 (m, 1H, ε-K6b), 3,45 (m, 2H, δ-R5), 3,62 (m, 2H, α-G2), 3,89 (d, *J* = 6,5 Hz, 1H, α-P2), 4,28 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, α-T2), 4,29 (m, 1H, β-T3), 4,52 (m, 1H, α-K2), 4,53 (m, 2H, δ-P5), 4,90 (m, 1H, α-R2), 4,93 (s, 2H, 10), 5,00 (s, 1H, T3-OH), 7,35 (bdb, *J* = 8,0 Hz, 1H, 6), 7,37 (m, 1H, δ-KeN), 7,39 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, α-GN), 7,67 (bd, *J* = 8,0 Hz, 1H, 7), 7,68 (bs, 1H, 9), 7,74 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, α-TN), 7,76 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H, 3), 7,79 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H, 2), 7,80 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H, α-RaN), 7,86 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H, 4), 7,91 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H, α-KaN), 7,99 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, 1), 8,15 (bs, 1H, δ-RdN), 9,54 (s, 1H, 8''-CONH); MALDI-TOF-MS [M+H]⁺ *m/z* obliczona: 1034,12; znaleziona: 1035,70.

Boc-Thr-Lys(BocAla)-Pro-Arg(NO₂)-BAT (173c): ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 1,22 (d, *J* = 8,4 Hz, 3H, γ-T4), 1,31 (m, 3H, β-A3), 1,39 (s, 9H, Boc), 1,48 (m, 2H, γ-K4), 1,48 (m, 2H, δ-K5), 1,83 (m, 1H, γ-R4a), 1,82 (m, 1H, β-K3a), 1,89 (m, 1H, β-K3b), 1,89 (m, 1H, γ-R4b), 2,10 (m, 2H, γ-P4), 2,34 (m, 2H, β-R3), 2,46 (m, 2H, β-P3), 3,18 (m, 1H, ε-K6a), 3,44 (m, 1H, ε-K6b), 3,49 (m, 2H, δ-R5), 3,86 (d, *J* = 6,3, 1H, α-P2), 4,25 (m, 1H, α-A2), 4,34 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, α-T2), 4,36 (m, 1H, β-T3), 4,52 (m, 1H, α-K2), 4,55 (m, 2H, δ-P5), 4,71 (m, 1H, α-R2), 4,92 (s, 2H, 10), 4,99 (s, 1H, T3-OH), 6,49 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H, α-AN), 7,36 (bdb, *J* = 8,0 Hz, 1H, 6), 7,37 (m, 1H, δ-KeN), 7,57 (bd, *J* = 8,0 Hz, 1H, 7), 7,59 (bs, 1H, 9), 7,69 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H, α-TN), 7,74 (t, *J* = 7,0 Hz, 1H, 3), 7,79 (t, *J* = 7,0 Hz, 1H, 2), 7,80 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H, α-RaN), 7,87 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H, 4), 7,92 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H, α-KaN), 7,98 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H, 1), 8,17 (bs, 1H, δ-RdN), 10,15 (s, 1H, 8''-CONH); ¹³C NMR (DMSO, 125 MHz, 30,0 °C: 178,48 (C-A1), 177,33 (C-P1), 177,29 (C-T1), 175,67 (C-R1), 172,29 (C-K1), 166,87 (C-12), 160,56 (C-R6), 156,89 (C-B1), 155,99 (C-BA1), 148,10 (C-4b), 139,37 (C-5a), 134,18 (C-4a), 135,96 (C-8), 133,14 (C-2), 132,20 (C-3), 130,82 (C-12a), 128,43 (C-6), 123,78 (C-4), 122,94 (C-9a), 122,25 (C-1), 119,41 (C-7), 118,17

(C-9), 80,86 (C-B2), 78,68 (C-BA2), 70,37 (C-T2), 67,78 (C-P2), 61,34 (C-T3), 59,64 (C-R2), 59,64 (C-K2), 50,40 (C-A2), 47,72 (C-P5), 40,73 (C-R5), 40,74 (C-10), 40,72 (C-K6), 32,64 (C-K3), 38,30 (C-P3), 29,74 (C-R3), 29,64 (C-B5), 29,49 (C-BA5), 29,33 (C-B4), 28,87 (C-B3), 28,72 (C-BA3), 27,93 (C-P4), 25,35 (C-K4), 22,22 (C-T4), 18,39 (C-A3); MALDI-TOF-MS $[M+H]^+$ m/z obliczona: 1048,15; znaleziona: 1048,90.

Boc-Thr-Lys(BocVal)-Pro-Arg(NO₂)-BAT (173d): ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 0,97 (d, $J = 4,8$ Hz, 6H, δ 1-V4, δ 2-V5), 1,02 (d, $J = 4,5$ Hz, 1H, β -V3), 1,17 (d, $J = 8,0$ Hz, 3H, γ -T4), 1,37 (s, 9H, Boc), 1,47 (m, 2H, γ -K4), 1,47 (m, 2H, δ -K5), 1,80 (m, 1H, γ -R4a), 1,82 (m, 1H, β -K3a), 1,89 (m, 1H, β -K3b), 1,96 (m, 1H, γ -R4b), 2,16 (m, 2H, γ -P4), 2,32 (m, 2H, β -P3), 2,34 (m, 2H, β -R3), 3,17 (m, 1H, ϵ -K6a), 3,45 (m, 1H, ϵ -K6b), 3,41 (m, 2H, δ -R5), 3,86 (d, $J = 6,3$ Hz, 1H, α -P2), 4,35 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H, α -T2), 4,36 (m, 1H, β -T3), 4,37 (m, 1H, α -K2), 4,61 (m, 2H, δ -P5), 4,90 (m, 1H, α -R2), 4,92 (s, 2H, 10), 4,94 (m, 1H, α -V2), 4,99 (s, 1H, T3-OH), 7,04 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H, α -VN), 7,36 (bdb, $J = 8,0$ Hz, 1H, 6), 7,37 (m, 1H, δ -KeN), 7,57 (bd, $J = 9,0$ Hz, 1H, 7), 7,59 (bs, 1H, 9), 7,74 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, α -TN), 7,75 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H, 3), 7,78 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H, 2), 7,80 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H, α -RaN), 7,88 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H, 4), 7,91 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H, α -KaN), 7,98 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H, 1), 8,16 (bs, 1H, δ -RdN), 10,07 (s, 1H, 8''-CONH); MALDI-TOF-MS $[M+H]^+$ m/z obliczona: 1076,20; znaleziona: 1077,60.

Boc-Thr-Lys(BocLeu)-Pro-Arg(NO₂)-BAT (173e): ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 0,82 (d, $J = 2,9$ Hz, 3H, δ 1-L5), 0,83 (d, $J = 3,9$ Hz, 3H, δ 2-L6), 1,28 (d, $J = 7,6$ Hz, 3H, γ -T4), 1,33 (d, $J = 4,5$ Hz, 2H, β -L3), 1,37 (s, 9H, Boc), 1,47 (m, 2H, γ -K4), 1,47 (m, 2H, δ -K5), 1,55 (d, $J = 4,6$ Hz, 1H, γ -L4), 1,79 (m, 1H, γ -R4a), 1,81 (m, 1H, β -K3a), 1,86 (m, 1H, β -K3b), 1,97 (m, 1H, γ -R4b), 2,05 (m, 2H, γ -P4), 2,28 (m, 2H, β -P3), 2,35 (m, 2H, β -R3), 3,14 (m, 1H, ϵ -K6a), 3,42 (m, 1H, ϵ -K6b), 3,44 (m, 2H, δ -R5), 3,90 (d, $J = 6,5$ Hz, 1H, α -P2), 4,08 (m, 1H, α -L2), 4,35 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H, α -T2), 4,36 (m, 1H, β -T3), 4,39 (m, 1H, α -K2), 4,49 (m, 2H, δ -P5), 4,92 (m, 1H, α -R2), 4,92 (s, 2H, 10), 4,99 (s, 1H, T3-OH), 7,36 (bdb, $J = 8,3$ Hz, 1H, 6), 7,37 (m, 1H, δ -KeN), 7,57 (bd, $J = 8,5$ Hz, 1H, 7), 7,58 (bs, 1H, 9), 7,60 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H, α -LN), 7,68 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H, α -TN), 7,74 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H, 3), 7,79 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H, 2), 7,80 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H, α -RaN), 7,88 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, 4), 7,89 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H, α -KaN), 7,99 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H, 1), 8,17 (bs, 1H, δ -RdN), 10,05

(s, 1H, 8''-CONH); MALDI-TOF-MS [M+H]⁺ *m/z* obliczona: 1090,23; znaleziona: 1091,10.

Boc-Thr-Lys(BocIle)-Pro-Arg(NO₂)-BAT (173f): ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 0,90 (brs, 6H, γ1-IMe3, δ-IMe5), 1,16 (d, *J* = 3,9 Hz, 2H, γ2-I4), 1,20 (d, *J* = 7,8 Hz, 3H, γ-T4), 1,37 (s, 9H, Boc), 1,48 (m, 2H, γ-K4), 1,50 (m, 2H, δ-K5), 1,77 (m, 1H, γ-R4a), 1,79 (m, 1H, β-K3a), 1,91 (m, 1H, β-K3b), 1,91 (m, 1H, γ-R4b), 2,03 (m, 2H, γ-P4), 2,25 (m, 2H, β-P3), 2,25 (m, 2H, β-R3), 3,12 (m, 1H, ε-K6a), 3,25 (m, 1H, ε-K6b), 3,38 (m, 2H, δ-R5), 3,83(m, 1H, β-I3), 3,89 (m, 1H, α-I2), 4,29 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, α-P2), 4,35 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, α-T2), 4,53 (m, 1H, β-T3), 4,55 (m, 1H, α-K2), 4,64 (m, 2H, δ-P5), 4,66 (m, 1H, α-R2), 4,94 (s, 2H, 10), 5,01 (s, 1H, T3-OH), 6,06 (d, *J* = 7,5Hz, 1H, α-TN), 6,18 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H, α-IN), 7,35 (bdb, *J* = 8,0 Hz, 1H, 6), 7,45 (m, 1H, δ-KeN), 7,57 (bd, *J* = 8,6 Hz, 1H, 7), 7,59 (bs, 1H, 9), 7,74 (t, *J* = 7,0 Hz, 1H, 3), 7,79 (t, *J* = 7,0 Hz, 1H, 2), 7,80 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H, α-RaN), 7,86 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H, 4), 7,92 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, α-KaN), 7,97 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H, 1), 8,02 (bs, 1H, δ-RdN), 9,50 (s, 1H, 8''-CONH); MS [M+H]⁺ *m/z* obliczona: 1090,23; znaleziona: 1091,80.

Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(Boc)-Thr-BAT (173g): ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 1,22 (d, *J* = 7,8 Hz, 3H, γ-T4), 1,33 (s, 9H, Boc), 1,45 (m, 2H, γ-K4), 1,89 (m, 2H, γ-R4), 1,97 (m, 1H, γ-P4a), 2,06 (m, 1H, γ-P4b), 2,07 (m, 2H, β-R3), 2,35 (m, 2H, β-P3), 2,98 (m, 2H, β-K3a, β-K3b), 3,01 (m, 2H, δ-K5), 3,14 (m, 1H, ε-K6a), 3,15 (m, 1H, ε-K6b), 3,41 (m, 2H, δ-R5), 3,56 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H, α-P2), 4,12 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H, α-T2), 4,15 (m, 1H, β-T3), 4,45 (m, 1H, α-K2), 4,64 (m, 2H, δ-P5), 4,67 (m, 1H, α-R2), 4,92 (s, 2H, 10), 5,00 (s, 1H, T3-OH), 7,11 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H, α-RaN), 7,37 (bdb, *J* = 7,9 Hz, 1H, 6), 7,38 (m, 1H, δ-KeN), 7,52 (bd, *J* = 8,0 Hz, 1H, 7), 7,54 (bs, 1H, 9), 7,74 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H, 3), 7,76 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, α-TN), 7,80 (t, *J* = 7,0 Hz, 1H, 2), 7,88 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H, 4), 7,89 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H, α-KaN), 7,99 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H, 1), 8,28 (bs, 1H, δ-RdN), 9,92 (s, 1H, 8''-CONH); MALDI-TOF-MS [M+H]⁺ *m/z* obliczona: 977,07; znaleziona: 978,40.

Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(BocGly)-Thr-BAT (173h): ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 1,17 (d, *J* = 8,0 Hz, 3H, γ-T4), 1,37 (s, 9H, Boc), 1,44 (m, 2H, γ-K4), 1,85 (m, 2H, γ-R4), 2,02 (m, 1H, γ-P4a), 2,04 (m, 1H, γ-P4b), 2,05 (m, 2H, β-R3), 2,34

(m, 2H, β -P3), 2,62 (m, 2H, β -K3a, β -K3b), 2,68 (m, 2H, δ -K5), 3,17 (m, 1H, ϵ -K6a), 3,23 (m, 1H, ϵ -K6b), 3,39 (m, 2H, δ -R5), 3,64 (m, 2H, α -G2), 3,97 (d, $J = 6,0$ Hz, 1H, α -P2), 4,34 (d, $J = 6,5$ Hz, 1H, α -T2), 4,35 (m, 2H, δ -P5), 4,35 (m, 1H, α -R2), 4,39 (m, 1H, β -T3), 4,45 (m, 1H, α -K2), 4,91 (s, 2H, 10), 5,05 (s, 1H, T3-OH), 6,48 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H, α -RaN), 7,35 (bdb, $J = 8,2$ Hz, 1H, 6), 7,37 (m, 1H, δ -KeN), 7,43 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H, α -GN), 7,57 (bd, $J = 8,0$ Hz, 1H, 7), 7,59 (bs, 1H, 9), 7,69 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H, α -TN), 7,74 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H, 3), 7,81 (t, $J = 6,9$ Hz, 1H, 2), 7,87 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H, 4), 7,89 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H, α -KaN), 7,98 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H, 1), 8,18 (bs, 1H, δ -RdN), 10,10 (s, 1H, 8''-CONH); MALDI-TOF-MS $[M+H]^+$ m/z obliczona: 1034,12; znaleziona: 1035,50.

Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(BocAla)-Thr-BAT (173i): ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 1,20 (d, $J = 8,4$ Hz, 3H, γ -T4), 1,34 (m, 3H, β -A3), 1,37 (s, 9H, Boc), 1,48 (m, 2H, γ -K4), 1,80 (m, 2H, γ -R4), 2,01 (m, 1H, γ -P4a), 2,04 (m, 1H, γ -P4b), 2,11 (m, 2H, β -R3), 2,30 (m, 2H, β -P3), 2,85 (m, 2H, β -K3a, β -K3b), 2,87 (m, 2H, δ -K5), 3,18 (m, 1H, ϵ -K6a), 3,25 (m, 1H, ϵ -K6b), 3,38 (m, 2H, δ -R5), 3,92 (d, $J = 6,0$, 1H, α -P2), 4,28 (m, 2H, α -A2), 4,30 (m, 1H, α -K2), 4,38 (d, $J = 6,5$ Hz, 1H, α -T2), 4,55 (m, 2H, δ -P5), 4,55 (m, 1H, α -R2), 4,42 (m, 1H, β -T3), 4,92 (s, 2H, 10), 5,00 (s, 1H, T3-OH), 6,33 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, α -RaN), 6,79 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, α -AN), 7,36 (bdb, $J = 8,0$ Hz, 1H, 6), 7,50 (m, 1H, δ -KeN), 7,56 (bd, $J = 7,9$ Hz, 1H, 7), 7,58 (bs, 1H, 9), 7,68 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, α -TN), 7,74 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H, 3), 7,79 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H, 2), 7,88 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, 4), 7,93 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H, α -KaN), 7,99 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, 1), 8,18 (bs, 1H, δ -RdN), 9,92 (s, 1H, 8''-CONH); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO, 30,0 °C: 173,52 (C-A1), 172,16 (C-P1), 169,50 (C-T1), 163,52 (C-R1), 169,30 (C-K1), 166,57 (C-12), 160,51 (C-R6), 155,99 (C-B1), 155,97 (C-BA1), 148,06 (C-4b), 138,70 (C-5a), 136,58 (C-4a), 135,04 (C-8), 133,16 (C-2), 132,21 (C-3), 130,84 (C-12a), 128,35 (C-6), 122,97 (C-4), 122,63 (C-9a), 122,64 (C-1), 119,48 (C-7), 118,09 (C-9), 78,72 (C-B2), 78,55 (C-BA2), 67,33 (C-T2), 67,32 (C-P2), 61,34 (C-T3), 59,97 (C-R2), 59,20 (C-K2), 50,55 (C-P5), 47,79 (C-R5), 40,78 (C-10), 38,51 (C-K6), 30,69 (C-K3), 30,61 (C-P3), 29,74 (C-R3), 29,43 (C-B5), 29,34 (C-BA5), 29,18 (C-B4), 28,88 (C-B3), 28,72 (C-BA3), 27,91 (C-P4), 23,03 (C-K4), 20,06 (C-T4); MALDI-TOF-MS $[M+H]^+$ m/z obliczona: 1076,20; znaleziona: 1077,50.

Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(BocVal)-Thr-BAT (173j): ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 0,85 (d, *J* = 3,9 Hz, 6H, δ1-V4, δ2-V5), 1,01 (m, 3H, β-V3), 1,22 (d, *J* = 8,4 Hz, 3H, γ-T4), 1,35 (s, 9H, Boc), 1,49 (m, 2H, γ-K4), 1,85 (m, 2H, γ-R4), 2,02 (m, 1H, γ-P4a), 2,04 (m, 1H, γ-P4b), 2,07 (m, 2H, β-R3), 2,34 (m, 2H, β-P3), 2,85 (m, 2H, β-K3a, β-K3b), 2,85 (m, 2H, δ-K5), 3,06 (m, 1H, ε-K6a), 3,10 (m, 1H, ε-K6b), 3,39 (m, 2H, δ-R5), 4,06 (d, *J* = 6,0 Hz, 1H, α-P2), 4,30 (m, 1H, α-K2), 4,35 (d, *J* = 6,5 Hz, 1H, α-T2), 4,37 (m, 2H, δ-P5), 4,38 (m, 1H, α-R2), 4,40 (m, 1H, β-T3), 4,92 (s, 2H, 10), 4,98 (s, 1H, T3-OH), 5,02 (m, 1H, α-V2), 6,55 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, α-RaN), 6,96 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, α-VN), 7,35 (bdb, *J* = 7,9 Hz, 1H, 6), 7,37 (m, 1H, δ-KeN), 7,56 (bd, *J* = 7,9 Hz, 1H, 7), 7,58 (bs, 1H, 9), 7,68 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, α-TN), 7,74 (t, *J* = 7,0 Hz, 1H, 3), 7,80 (t, *J* = 7,1 Hz, 1H, 2), 7,88 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H, 4), 7,89 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H, α-KaN), 7,98 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H, 1), 8,16 (bs, 1H, δ-RdN), 9,90 (s, 1H, 8''-CONH); MALDI-TOF-MS [M+H]⁺ *m/z* obliczona: 1076,20; znaleziona: 1077,50.

Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(BocLeu)-Thr-BAT (173k): ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 0,83 (d, *J* = 2,9 Hz, 3H, δ1-L5), 0,84 (d, *J* = 3,8 Hz, 3H, δ2-L6), 1,15 (d, *J* = 8,4 Hz, 3H, γ-T4), 1,34 (m, *J* = 6,4 Hz, 3H, β-L3), 1,35 (s, 9H, Boc), 1,48 (m, 2H, γ-K4), 1,85 (m, 2H, γ-R4), 2,01 (m, 1H, γ-P4a), 2,06 (m, 1H, γ-P4b), 2,10 (m, 2H, β-R3), 2,34 (m, 2H, β-P3), 2,87 (m, 2H, β-K3a, β-K3b), 2,85 (m, 2H, δ-K5), 3,00 (m, 1H, ε-K6a), 3,11 (m, 1H, ε-K6b), 3,38 (m, 2H, δ-R5), 4,06 (m, 1H, α-L2), 4,08 (d, *J* = 6,0 Hz, 1H, α-P2), 4,30 (m, 1H, α-K2), 4,38 (d, *J* = 6,5 Hz, 1H, α-T2), 4,55 (m, 2H, δ-P5), 4,55 (m, 1H, α-R2), 4,44 (m, 1H, β-T3), 4,91 (s, 2H, 10), 4,98 (s, 1H, T3-OH), 6,46 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, α-RaN), 7,35 (bdb, *J* = 7,9 Hz, 1H, 6), 7,44 (m, 1H, δ-KeN), 7,56 (bd, *J* = 7,9 Hz, 1H, 7), 7,58 (bs, 1H, 9), 7,59 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, α-LN), 7,68 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, α-TN), 7,74 (t, *J* = 7,0 Hz, 1H, 3), 7,80 (t, *J* = 7,1 Hz, 1H, 2), 7,87 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H, 4), 7,92 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H, α-KaN), 7,98 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H, 1), 8,17 (bs, 1H, δ-RdN), 10,03 (s, 1H, 8''-CONH); MALDI-TOF-MS [M+H]⁺ *m/z* obliczona: 1090,23; znaleziona: 1090,70.

Boc-Arg(NO₂)-Pro-Lys(BocIle)-Thr-BAT (173l): ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 0,85 (brs, 6H, γ1-IMe3, δ-IMe5), 1,11 (d, *J* = 3,9 Hz, 2H, γ2-I4), 1,22 (d, *J* = 8,4 Hz, 3H, γ-T4), 1,35 (s, 9H, Boc), 1,49 (m, 2H, γ-K4), 1,84 (m, 2H, γ-R4), 1,95 (m, 1H, γ-P4a), 1,97 (m, 1H, γ-P4b), 2,07 (m, 2H, β-R3), 2,35 (m, 2H, β-P3), 2,92

(m, 2H, β -K3a, β -K3b), 2,94 (m, 2H, δ -K5), 3,13 (m, 1H, ϵ -K6a), 3,15 (m, 1H, ϵ -K6b), 3,37 (m, 2H, δ -R5), 3,77 (m, $J = 6,4$ Hz, 3H, β -I3), 3,86 (m, 1H, α -I2), 3,86 (d, $J = 6,0$ Hz, 1H, α -P2), 4,28 (m, 1H, α -K2), 4,34 (d, $J = 6,5$ Hz, 1H, α -T2), 4,49 (m, 2H, δ -P5), 4,49 (m, 1H, α -R2), 4,41 (m, 1H, β -T3), 4,92 (s, 2H, 10), 4,99 (s, 1H, T3-OH), 6,38 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, α -IN), 6,39 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, α -RaN), 7,36 (bdb, $J = 7,9$ Hz, 1H, 6), 7,38 (m, 1H, δ -KeN), 7,57 (bd, $J = 7,9$ Hz, 1H, 7), 7,59 (bs, 1H, 9), 7,76 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, α -TN), 7,74 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H, 3), 7,80 (t, $J = 7,1$ Hz, 1H, 2), 7,88 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H, 4), 7,94 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H, α -KaN), 7,98 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H, 1), 8,17 (bs, 1H, δ -RdN), 10,08 (s, 1H, 8''-CONH); MALDI-TOF-MS $[M+H]^+$ m/z obliczona: 1090,23; znaleziona: 1091,50.

5.4.2. Deprotekcja osłony Boc (178a-l) (Schemat 32)

Metodę usuwania osłony Boc przedstawiłam na przykładzie związku (178a). Postęp reakcji kontrolowałam na TLC w układzie I. Wszystkie produkty otrzymałam w postaci żółtego osadu, a wydajności mieściły się w zakresie 61-87%. Dane uzyskane dla otrzymanych związków zestawiałam w Tabeli 14.

0,268 g (0,275 mmola) związku (173a) rozpuściłam w 5 ml bezw. eteru dietylowego nasyconego chlorowodem otrzymując 0,202 g (0,238 mmola) produktu (178a) w postaci żółtego osadu (wyd. 87%), temp. top. 207–210°C.

Tabela 14. Charakterystyka związków (178a-l)

Produkty	Wyd. [%]	Temp. top. [°C]	R _f w ukł. I	MS [M+H] ⁺	
				Obl.	Znal.
2HClxThr-Lys-Pro-Arg(NO ₂)-BAT	87	207-210	0,06	848,33	849,70
2HClxThr-Lys(Gly)-Pro-Arg(NO ₂)-BAT	82	199-204	0,08	906,35	907,30
2HClxThr-Lys(Ala)-Pro-Arg(NO ₂)-BAT	85	201-205	0,04	920,40	920,40
2HClxThr-Lys(Ala)-Pro-Arg(NO ₂)-BAT	70	195-199	0,04	948,36	948,80
2HClxThr-Lys(Leu)-Pro-Arg(NO ₂)-BAT	73	194-198	0,02	962,38	962,70
2HClxThr-Lys(Ile)-Pro-Arg(NO ₂)-BAT	69	203-205	0,05	962,38	962,90
2HClxArg(NO ₂)-Pro-Lys-Thr-BAT	84	207-210	0,03	848,33	848,70
2HClxArg(NO ₂)-Pro-Lys(Gly)-Thr-BAT	78	210-215	0,08	906,35	907,40
2HClxArg(NO ₂)-Pro-Lys(Ala)-Thr-BAT	76	220-223	0,05	920,40	921,20
2HClxArg(NO ₂)-Pro-Lys(Val)-Thr-BAT	65	208-212	0,04	948,36	949,00
2HClxArg(NO ₂)-Pro-Lys(Leu)-Thr-BAT	61	222-227	0,03	962,38	962,50
2HClxArg(NO ₂)-Pro-Lys(Ile)-Thr-BAT	68	213-219	0,07	962,38	962,70

5.5. Aminokwasowe pochodne batracyliny

5.5.1. Synteza pochodnych (174a-h) (Schemat 33)

Metodę otrzymywania pochodnych przedstawiłam na przykładzie związku (174b). Postęp reakcji kontrolowałam na TLC w układzie I. Dane uzyskane dla otrzymanych analogów zestawiałam w Tabeli 15.

Mieszaninę 0,1 g (0,4 mmola) BAT (1), 0,151 g (0,8 mmola) Boc-β-Ala-OH (183b) oraz 0,008 g (0,065 mmola) DMAP w 50 ml bezw. CH₂Cl₂ ochłodziłam do 0°C i dodałam 0,165 g (0,8 mmola) DCC. Mieszaninę pozostawiłam na 4 godz. w temp. 0°C, a następnie na 6 dni w temp. pok. Reakcję prowadziłam w obecności gazu obojętnego (azot). Po zakończeniu reakcji odsączyłam powstały dicykloheksylomocznik, a rozpuszczalnik oddestylowałam pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyściłam za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie F, G, a następnie na TLC w układzie H. Otrzymałam 0,098 g (0,233 mmola) związku (174b) w postaci żółtego osadu (wyd. 58%), temp. top. 208-212°C, R_f = 0,78 (ukł. I).

Tabela 15. Charakterystyka aminokwasowych pochodnych batracyny (174a-h)

Pochodne	Wyd. reakcji [%]	Temp. top. [°C]	R _f w ukl. I
Boc-Gly-BAT	49	204-210	0,78
Boc-β-Ala-BAT	58	208-212	0,79
Boc-GABA-BAT	61	206-209	0,79
Boc-5-Ava-BAT	64	226-229	0,80
Boc-6-Ahx-BAT	56	213-218	0,82
Boc-7-Ahp-BAT	48	217-220	0,84
Boc-8-Aoc-BAT	58	214-218	0,88
Boc-12-Ado-BAT	57	205-210	0,93

Charakterystyka MS oraz ¹H NMR otrzymanych pochodnych (174a-h)

2-(tert-Butoksykarbonyloamino)-N-(12-okso-10,12-dihydroksyizoindolo[1,2-b]

chinazolin-8-ylo)etanamid (174a): ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 1,38 (s, 9H, Boc), 2,48 (s, 2H, 14), 4,91 (s, 2H, 10), 7,0 (brs, 1H, 13), 7,35 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, 6), 7,52 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, 7), 7,54 (s, 1H, 9), 7,75 (t, *J* = 7,33 Hz, 1H, 3), 7,87 (t, *J* = 7,32 Hz, 1H, 2), 7,88 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H, 4), 7,98 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H, 1), 10,16 (s, 1H, 8''-CONH); MALDI-TOF-MS [M+H]⁺ *m/z* obliczona: 406,43; znaleziona: 407,18.

3-(tert-Butoksykarbonyloamino)-N-(12-okso-10,12-dihydroizoindolo[1,2-b]chinazolin-

8-ylo)propanamid (174b): ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 1,37 (s, 9H, Boc), 2,48 (s, 2H, 15), 3,2 (q, *J* = 9,5 Hz, 2H, 14), 4,90 (s, 2H, 10), 6,9 (t, 1H, 13), 7,33 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, 6), 7,5 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, 7), 7,57 (s, 1H, 9), 7,75 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H, 3), 7,8 (t, *J* = 7,1 Hz, 1H, 2), 7,85 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H, 4), 8,0 (d, *J* = 6,7 Hz, 1H, 1), 10,1 (s, 1H, 8''-CONH); MALDI-TOF-MS [M+H]⁺ *m/z* obliczona: 420,45; znaleziona: 420,98.

4-(tert-Butoksykarbonyloamino)-N-(12-okso-10,12-dihydroizoindolo[1,2-b]chinazolin-

8-ylo)butanamid (174c): ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 1,36 (s, 9H, Boc), 1,51 (m, 4H, 15), 2,33 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H, 16), 2,91 (q, *J* = 6,8 Hz, 2H, 14), 4,89 (s, 2H, 10), 6,89 (t, 1H, 13), 7,31 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H, 6), 7,48 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H, 7), 7,59 (s, 1H, 9), 7,72 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H, 3), 7,89 (t, *J* = 7,1 Hz, 1H, 2), 7,85 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H, 4), 8,0 (d, *J* = 6,7 Hz, 1H, 1), 10,11 (s, 1H, 8''-CONH); MALDI-TOF-MS [M+H]⁺ *m/z* obliczona: 434,47; znaleziona: 435,34.

5-(tert-Butoksykarbonyloamino)-N-(12-okso-10,12-dihydroizoindolo[1,2-*b*]chinazolin-8-ylo)pentanamid (174d): ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 1,36 (s, 9H, Boc), 1,50 (m, 4H, 15/16), 2,30 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H, 17), 2,90 (q, $J = 6,6$ Hz, 2H, 14), 4,90 (s, 2H, 10), 6,8 (brs, 1H, 13), 7,35 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, 6), 7,50 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H, 7), 7,55 (s, 1H, 9), 7,75 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H, 3), 7,87 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H, 2), 7,88 (d, $J = 6,7$ Hz, 1H, 4), 8,0 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H, 1), 10,0 (s, 1H, 8''-CONH); MALDI-TOF-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z obliczona: 448,51; znaleziona: 449,22.

6-(tert-Butoksykarbonyloamino)-N-(12-okso-10,12-dihydroizoindolo[1,2-*b*]chinazolin-8-ylo)heksanamid (174e): ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 1,20 (m, 2H, 16), 1,37 (s, 9H, Boc), 1,62 (m, 4H, 15/17), 2,30 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H, 18), 2,91 (q, $J = 6,8$ Hz, 2H, 14), 4,92 (s, 2H, 10), 6,88 (brs, 1H, 13), 7,34 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, 6), 7,53 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H, 7), 7,57 (s, 1H, 9), 7,72 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H, 3), 7,81 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H, 2), 7,85 (d, $J = 6,9$ Hz, 1H, 4), 8,1 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H, 1), 10,08 (s, 1H, 8''-CONH); MALDI-TOF-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z obliczona: 462,53; znaleziona: 463,22.

7-(tert-Butoksykarbonyloamino)-N-(12-okso-10,12-dihydroizoindolo[1,2-*b*]chinazolin-8-ylo)heptanamid (174f): ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 1,26 (m, 4H, 15/18), 1,35 (s, 9H, Boc), 1,57 (m, 2H, 19), 2,30 (t, $J = 7,4$ Hz, 4H, 16-17), 2,88 (q, $J = 6,3$ Hz, 2H, 14), 4,90 (s, 2H, 10), 6,77 (brs, 1H, 13), 7,34 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, 6), 7,50 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, 7), 7,56 (s, 1H, 9), 7,75 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H, 3), 7,80 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H, 2), 7,88 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H, 4), 7,99 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, 1), 10,0 (s, 1H, 8''-CONH); MALDI-TOF-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z obliczona: 476,57; znaleziona: 477,25.

8-(tert-Butoksykarbonyloamino)-N-(12-okso-10,12-dihydroizoindolo[1,2-*b*]chinazolin-8-ylo)oktanamid (174g): ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 1,22 (m, 4H, 16-18), 1,28 (s, 9H, Boc), 1,58 (m, 4H, 15/19), 2,31 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H, 20), 2,88 (q, $J = 6,83$ Hz, 2H, 14), 4,90 (s, 2H, 10), 7,16 (brs, 1H, 13), 7,33 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H, 6), 7,52 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, 7), 7,54 (s, 1H, 9), 7,75 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H, 3), 7,79 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H, 2), 7,87 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H, 4), 7,98 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H, 1), 10,11 (s, 1H, 8''-CONH); MALDI-TOF-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z obliczona: 490,59; znaleziona: 491,42.

12-(*tert*-Butoksykarbonyloamino)-*N*-(12-okso-10,12-dihydroizoindolo[1,2-*b*]

chinazolin-8-ylo)dodekanamid (**174h**): ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 1,20 (m, 14H, 16-22), 1,35 (s, 9H, Boc), 1,57 (m, 4H, 15/23), 2,30 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H, 24), 2,85 (q, *J* = 6,8 Hz, 2H, 14), 4,90 (s, 2H, 10), 6,75 (brs, 1H, 13), 7,34 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, 6), 7,50 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, 7), 7,56 (s, 1H, 9), 7,75 (t, *J* = 6,8 Hz, 1H, 3), 7,80 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H, 2), 7,88 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H, 4), 7,99 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, 1), 10,0 (s, 1H, 8''-CONH); MALDI-TOF-MS [M+H]⁺ *m/z* obliczona: 546,70; znaleziona: 547,33.

5.5.2. Deprotekcja osłony Boc (**184a-h**) (Schemat 33) i (**179a-h**) (Schemat 34)

Trifluorooctany (**184a-h**) (Schemat 33)

Metodę usuwania osłony Boc przedstawiłam na przykładzie związku (**184b**). Postęp reakcji kontrolowałam na TLC w układzie I. Wszystkie produkty otrzymałam w postaci oleju, a wydajności reakcji mieściły się w zakresie 84-95%. Dane uzyskane dla otrzymanych związków zestawiałam w Tabeli 16.

0,098 g (0,233 mmola) związku (**174b**) rozpuściłam w 5 ml TFA otrzymując 0,087 g (0,2 mmola) produktu (**184a**) w postaci oleju (wyd. 86%).

Tabela 16. Charakterystyka związków po deprotekcji osłony Boc (**184a-h**)

Produkty	Wyd. reakcji [%]	Temp. top. [°C]	R _f w ukl. I
184a	86	olej	0,78
184b	84	olej	0,79
184c	90	olej	0,79
184d	92	olej	0,80
184e	88	olej	0,82
184f	95	olej	0,84
184g	91	olej	0,88
184h	90	olej	0,93

Chlorowodorki (**179a-h**) (Schemat 34)

Metodę usuwania osłony Boc przedstawiłam na przykładzie związku (**179a**). Postęp reakcji kontrolowałam na TLC w układzie I. Wszystkie produkty otrzymałam

w postaci żółtego osadu, a wydajności reakcji mieściły się w zakresie 69-87%. Dane uzyskane dla otrzymanych związków zestawiałam w Tabeli 17.

0,075 g (0,184 mmola) związku (**174a**) rozpuściłam w 5 ml bezw. eteru dietylowego nasyconego chlorowodorem otrzymując 0,055 g (0,160 mmola) produktu w postaci żółtego osadu (wyd. 87%), temp. top. 218–223°C.

Tabela 17. Charakterystyka związków (**179a-h**)

Produkty	Wyd. [%]	Temp. top. [°C]	R _f w ukł. I	MS [M+H] ⁺	
				Obl.	Znal.
HClxGly-BAT	87	218-223	0,05	342,78	343,54
HClxβ-Ala-BAT	82	220-224	0,06	356,80	357,27
HClxGABA-BAT	85	220-226	0,05	370,83	371,61
HClx5-Ava-BAT	70	236-238	0,03	384,86	385,34
HClx6-Ahx-BAT	73	228-231	0,05	398,89	399,70
HClx7-Ahp-BAT	69	230-235	0,04	412,92	413,66
HClx8-Aoc-BAT	84	227-230	0,06	426,95	427,43
HClx12-Ado-BAT	85	226-231	0,05	440,98	441,37

5.6. Analogi batracyliny z adenozyzną

5.6.1. Synteza analogów (**175a-h**) (Schemat 35)

Metodę syntezy nowych analogów przedstawiłam na przykładzie związku (**175a**). Postęp reakcji kontrolowałam na TLC w układzie J. Dane uzyskane dla otrzymanych analogów zestawiałam w Tabeli 18.

Mieszaninę 0,053 g (0,186 mmola) rybozydu 6-chloropuryny (**185**), 0,078 g (0,186 mmola) trifluorooctanu związku (**184a**) oraz 0,24 g (1,86 mmola) DIPEA w 6 ml bezw. EtOH ogrzałam do temp. wrzenia rozpuszczalnika i pozostawiłam mieszaninę na 4 godz. Reakcję prowadziłam w warunkach gazu obojętnego (azot). Po zakończeniu reakcji rozpuszczalnik oddestylowałam pod zmniejszonym ciśnieniem, a powstały produkt oczyściłam za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie G, H, a następnie na TLC w układzie I. Otrzymałam 0,057 g (0,102 mmola) produktu (**175a**) w postaci pomarańczowego osadu (wyd. 55%), temp. top. 225-227°C, R_f = 0,62 (ukł. J).

Tabela 18. Charakterystyka analogów batracyny z adenozyną (**175a-h**)

Analogi ADO-BAT	Wyd. reakcji [%]	Temp. top. [°C]	R _f w ukl. J
ADO-Gly-BAT	55	225-227	0,62
ADO-β-Ala-BAT	71	224-228	0,62
ADO-GABA-BAT	58	215-219	0,62
ADO-5-Ava-BAT	51	220-224	0,63
ADO-6-Ahx-BAT	60	218-221	0,67
ADO-7-Ahp-BAT	61	223-226	0,71
ADO-8-Aoc-BAT	65	225-229	0,78
ADO-12-Ado-BAT	57	225-228	0,87

Charakterystyka MS, ¹H NMR oraz ¹³C NMR otrzymanych analogów BAT-ADO (175a-h)

N⁶-[N-(12-okso-10,12-dihydroizoindolo[1,2-*b*]chinazolin-8-ylo)etanamid]adenozyina (175a**):** ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 3,49 (bs, 2H, 11), 3,53 (dd, *J* = 12,0 Hz, 3,2 Hz, 1H, 5'*b*), 3,64 (dd, *J* = 12,0 Hz, 3,2 Hz, 1H, 5'*a*), 3,95 (dd, *J* = 4,4 Hz, 3,2 Hz, 1H, 4'), 4,12 (t, *J* = 3,0 Hz, 1H, 3'), 4,60 (t, *J* = 6,0 Hz, 1H, 2'), 4,90 (s, 2H, 10''), 5,21 (bs, 1H, 3'OH), 5,40 (bs, 1H, 5'OH), 5,46 (bs, 1H, 2'OH), 5,87 (d, *J* = 6,0 Hz, 1H, 1'), 7,36 (bd, *J* = 8,0 Hz, 1H, 6''), 7,53 (bd, *J* = 8,0 Hz, 1H, 7''), 7,57 (bs, 1H, 9''), 7,75 (t, *J* = 6,0 Hz, 1H, 3''), 7,78 (t, *J* = 6,0 Hz, 1H, 2''), 7,87 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H, 4''), 7,93 (bs, 1H, 10-NH), 7,98 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H, 1''), 8,24 (bs, 1H, 2), 8,35 (bs, 1H, 8), 10,18 (s, 1H, 8''-CONH); ¹³C NMR (DMSO, 125 MHz, 30,0°C: 168,91 (C-12), 166,88 (C-12''), 155,38 (C-6), 152,87 (C-2), 148,21 (C-4), 148,07 (C-4*b*''), 140,35 (C-8), 139,24 (C-5*a*''), 136,12 (C-8''), 134,78 (C-4*a*''), 133,93 (C-2''), 132,96 (C-3''), 130,75 (C-12*a*''), 128,65 (C-6''), 123,56 (C-4''), 123,23 (C-9*a*''), 122,52 (C-1''), 120,68 (C-5), 119,49 (C-7''), 118,15 (C-9''), 88,63 (C-1'), 86,55 (C-4'), 74,20 (C-2'), 71,30 (C-3'), 62,29 (C-5'), 41,10 (C-10''), 39,67 (C-11); MALDI-TOF-MS [M+H]⁺ *m/z* obliczona: 556,53; znaleziona: 557,20.

N⁶-[N-(12-okso-10,12-dihydroizoindolo[1,2-*b*]chinazolin-8-ylo)propanamid]adenozyina (175b**):** ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 1,21 (m, 2H, 12), 3,49 (bs, 2H, 11), 3,54 (dd, *J* = 12,0 Hz, 3,5 Hz, 1H, 5'*b*), 3,65 (dd, *J* = 12,0 Hz, 3,5 Hz, 1H, 5'*a*), 3,95 (t, *J* = 5,0 Hz, 1H, 4'), 4,14 (t, *J* = 5,0 Hz, 1H, 3'), 4,60 (t, *J* = 5,0 Hz, 1H, 2'), 4,90 (s, 2H, 10''), 5,23 (bs, 1H, 3'OH), 5,38 (bs, 1H, 5'OH), 5,51 (bs, 1H, 2'OH), 5,89 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H, 1'), 7,36 (bd, *J* = 8,0 Hz, 1H, 6''), 7,55 (bd, *J* = 8,0 Hz, 1H, 7''), 7,57

(bs, 1H, 9''), 7,75 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H, 3''), 7,79 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H, 2''), 7,87 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H, 4''), 7,93 (bs, 1H, 10-NH), 7,98 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H, 1''), 8,21 (bs, 1H, 2), 8,40 (bs, 1H, 8), 10,36 (s, 1H, 8''-CONH); ^{13}C NMR (DMSO, 125 MHz, 30,0°C: 170,47 (C-13), 166,87 (C-12''), 155,49 (C-6), 153,04 (C-2), 148,15 (C-4), 148,12 (C-4b''), 140,51 (C-8), 139,20 (C-5a''), 136,10 (C-8''), 134,81 (C-4a''), 133,90 (C-2''), 132,93 (C-3''), 130,76 (C-12a''), 128,59 (C-6''), 123,55 (C-4''), 123,12 (C-9a''), 122,50 (C-1''), 120,58 (C-5), 119,54 (C-7''), 118,22 (C-9''), 88,61 (C-1'), 86,57 (C-4'), 74,22 (C-2'), 71,30 (C-3'), 62,34 (C-5'), 41,12 (C-10''), 39,74 (C-11), 37,91 (C-12); MALDI-TOF-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z obliczona: 570,56; znaleziona: 571,20.

N^6 -[N -(12-okso-10,12-dihydroizoindolo[1,2-*b*]chinazolin-8-ylo)butanamid]adenozyna (175c): ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,24 (m, 2H, 12), 2,38 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H, 13), 3,52 (bs, 2H, 11), 3,55 (dd, $J = 12,0$ Hz, 3,5 Hz, 1H, 5'b), 3,64 (dd, $J = 12,0$ Hz, 3,5 Hz, 1H, 5'a), 3,95 (dd, $J = 5,0$ Hz, 3,5 Hz, 1H, 4'), 4,13 (t, $J = 5,0$ Hz, 1H, 3'), 4,59 (t, $J = 5,0$ Hz, 1H, 2'), 4,90 (s, 2H, 10''), 5,26 (bs, 1H, 3'OH), 5,44 (bs, 1H, 5'OH), 5,58 (bs, 1H, 2'OH), 5,86 (d, $J = 5,0$ Hz, 1H, 1'), 7,33 (bd, $J = 8,0$ Hz, 1H, 6''), 7,52 (bd, $J = 8,0$ Hz, 1H, 7''), 7,56 (bs, 1H, 9''), 7,75 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H, 3''), 7,78 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H, 2''), 7,87 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H, 4''), 7,89 (bs, 1H, 10-NH), 7,98 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H, 1''), 8,19 (bs, 1H, 2), 8,34 (bs, 1H, 8), 10,09 (s, 1H, 8''-CONH); ^{13}C NMR (DMSO, 125 MHz, 30,0°C: 172,00 (C-14), 167,00 (C-12''), 155,31 (C-6), 153,05 (C-2), 148,83 (C-4), 148,27 (C-4b''), 140,41 (C-8), 139,19 (C-5a''), 135,86 (C-8''), 134,60 (C-4a''), 133,04 (C-2''), 132,91 (C-3''), 130,61 (C-12a''), 128,48 (C-6''), 123,15 (C-4''), 123,05 (C-9a''), 122,55 (C-1''), 120,37 (C-5), 119,53 (C-7''), 118,18 (C-9''), 88,61 (C-1'), 86,60 (C-4'), 74,17 (C-2'), 71,30 (C-3'), 62,30 (C-5'), 41,02 (C-10''), 39,71 (C-11), 34,51 (C-13), 25,77 (C-12); MALDI-TOF-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z obliczona: 584,58; znaleziona: 585,22.

N^6 -[N -(12-okso-10,12-dihydroizoindolo[1,2-*b*]chinazolin-8-ylo)pentanamid]adenozyna (175d): ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 1,62 (m, 4H, 12/13), 2,37 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H, 14), 3,49 (bs, 2H, 11), 3,55 (dd, $J = 12,0$ Hz, 3,5 Hz, 1H, 5'b), 3,65 (dd, $J = 12,0$ Hz, 3,5 Hz, 1H, 5'a), 3,95 (dd, $J = 5,0$ Hz, 3,5 Hz, 1H, 4'), 4,14 (t, $J = 5,0$ Hz, 1H, 3'), 4,59 (t, $J = 5,0$ Hz, 1H, 2'), 4,89 (s, 2H, 10''), 5,26 (bs, 1H, 3'OH), 5,43 (bs, 1H, 5'OH), 5,51 (bs, 1H, 2'OH), 5,86 (d, $J = 5,0$ Hz, 1H, 1'), 7,33 (bd, $J = 8,0$ Hz, 1H, 6''), 7,53 (bd, $J = 8,0$ Hz, 1H, 7''), 7,57 (bs, 1H, 9''), 7,74 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H, 3''), 7,79 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H, 2''), 7,87 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H, 4''), 7,93

(bs, 1H, 10-NH), 7,98 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H, 1''), 8,19 (bs, 1H, 2), 8,34 (bs, 1H, 8), 10,15 (s, 1H, 8''-CONH); ^{13}C NMR (DMSO, 125 MHz, 30,0°C: 172,07 (C-15), 166,87 (C-12''), 155,34 (C-6), 153,07 (C-2), 148,93 (C-4), 148,10 (C-4b''), 140,34 (C-8), 139,37 (C-5a''), 135,96 (C-8''), 134,79 (C-4a''), 133,90 (C-2''), 132,92 (C-3''), 130,73 (C-12a''), 128,59 (C-6''), 123,54 (C-4''), 123,10 (C-9a''), 122,49 (C-1''), 120,43 (C-5), 119,41 (C-7''), 118,80 (C-9''), 88,64 (C-1'), 86,60 (C-4'), 74,18 (C-2'), 71,35 (C-3'), 62,36 (C-5'), 41,10 (C-10''), 39,70 (C-11), 36,89 (C-14), 29,40 (C-12), 23,30 (C-13); MALDI-TOF-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z obliczona: 598,61; znaleziona: 599,20.

N^6 -[N -(12-okso-10,12-dihydroizoindolo[1,2- b]chinazolin-8-ylo)heksanamid]adenozyna (175e): ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 1,15 (m, 2H, 13), 1,61 (m, 4H, 12/14), 2,38 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H, 15), 3,53 (bs, 2H, 11), 3,54 (dd, $J = 12,0$ Hz, 3,5 Hz, 1H, 5'b), 3,64 (dd, $J = 12,0$ Hz, 3,5 Hz, 1H, 5'a), 3,94 (dd, $J = 5,0$ Hz, 3,5 Hz, 1H, 4'), 4,12 (t, $J = 5,0$, 1H, 3'), 4,59 (t, $J = 5,0$ Hz, 1H, 2'), 4,90 (s, 2H, 10''), 5,19 (bs, 1H, 3'OH), 5,43 (bs, 1H, 5'OH), 5,44 (bs, 1H, 2'OH), 5,86 (d, $J = 5,0$ Hz, 1H, 1'), 7,33 (bd, $J = 8,0$ Hz, 1H, 6''), 7,51 (bd, $J = 8,0$, 1H, 7''), 7,56 (bs, 1H, 9''), 7,75 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H, 3''), 7,76 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H, 2''), 7,87 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H, 4''), 7,89 (bs, 1H, 10-NH), 7,98 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H, 1''), 8,19 (bs, 1H, 2), 8,34 (bs, 1H, 8), 10,11 (s, 1H, 8''-CONH); ^{13}C NMR (DMSO, 125 MHz, 30,0°C: 172,17 (C-18), 166,88 (C-12''), 155,31 (C-6), 153,10 (C-2), 148,84 (C-4), 148,10 (C-4b''), 140,32 (C-8), 139,37 (C-5a''), 135,93 (C-8''), 134,77 (C-4a''), 133,91 (C-2''), 132,93 (C-3''), 130,73 (C-12a''), 128,58 (C-6''), 123,55 (C-4''), 123,11 (C-9a''), 122,50 (C-1''), 120,41 (C-5), 119,38 (C-7''), 118,06 (C-9''), 88,61 (C-1'), 86,60 (C-4'), 74,12 (C-2'), 71,35 (C-3'), 62,36 (C-5'), 41,10 (C-10''), 39,82 (C-11), 37,09 (C-17), 29,72 (C-12), 27,03-29,37 (C-13-15), 25,77 (C16); MALDI-TOF-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z obliczona: 612,24; znaleziona: 613,25.

N^6 -[N -(12-okso-10,12-dihydroizoindolo[1,2- b]chinazolin-8-ylo)heptanamid]adenozyna (175f): ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,22 (m, 4H, 13-14), 1,58 (m, 4H, 12/15), 2,32 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H, 16), 3,53 (bs, 2H, 11), 3,55 (dd, $J = 12,0$ Hz, 3,5 Hz, 1H, 5'b), 3,64 (dd, $J = 12,0$ Hz, 3,5 Hz, 1H, 5'a), 3,94 (dd, $J = 5,0$ Hz, 3,5 Hz, 1H, 4'), 4,12 (t, $J = 5,0$, 1H, 3'), 4,58 (t, $J = 5,0$ Hz, 1H, 2'), 4,90 (s, 2H, 10''), 5,19 (bs, 1H, 3'OH), 5,43 (bs, 1H, 5'OH), 5,44 (bs, 1H, 2'OH), 5,86 (d, $J = 5,0$ Hz, 1H, 1'), 7,33 (bd, $J = 8,0$ Hz, 1H, 6''), 7,52 (bd, $J = 8,0$, 1H, 7''), 7,57 (bs, 1H, 9''), 7,74 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H, 3''), 7,76 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H, 2''), 7,87 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H, 4''), 7,89

(bs, 1H, 10-NH), 7,98 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H, 1''), 8,18 (bs, 1H, 2), 8,32 (bs, 1H, 8), 10,10 (s, 1H, 8''-CONH); ^{13}C NMR (DMSO, 125 MHz, 30,0°C: 172,16 (C-17), 166,86 (C-12''), 155,30 (C-6), 153,06 (C-2), 148,09 (C-4), 148,04 (C-4b''), 140,27 (C-8), 139,40 (C-5a''), 135,98 (C-8''), 134,80 (C-4a''), 133,88 (C-2''), 132,90 (C-3''), 130,75 (C-12a''), 128,57 (C-6''), 123,53 (C-4''), 123,07 (C-9a''), 122,48 (C-1''), 120,44 (C-5), 119,44 (C-7''), 118,10 (C-9''), 88,65 (C-1'), 86,59 (C-4'), 74,19 (C-2'), 71,34 (C-3'), 62,37 (C-5'), 41,10 (C-10''), 39,72 (C-11), 37,07 (C-16), 29,65 (C-12), 29,16 (C-13), 26,90 (C-14), 25,79 (C-15); MALDI-TOF-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z znalezione: 626,66; obliczone: 627,30.

N^6 -[N -(12-okso-10,12-dihydroizoindolo[1,2- b]chinazolin-8-ylo)oktanamid]adenozyna (175g): ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,30 (m, 6H, 13-15), 1,57 (m, 4H, 12/16), 2,29 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H, 17), 3,49 (bs, 2H, 11), 3,54 (dd, $J = 12,0$ Hz, 3,5 Hz, 1H, 5'b), 3,63 (dd, $J = 12,0$ Hz, 3,5 Hz, 1H, 5'a), 3,94 (dd, $J = 5,0$ Hz, 3,5 Hz, 1H, 4'), 4,12 (t, $J = 5,0$, 1H, 3'), 4,58 (t, $J = 5,0$ Hz, 1H, 2'), 4,90 (s, 2H, 10''), 5,18 (bs, 1H, 3'OH), 5,42 (bs, 1H, 5'OH), 5,44 (bs, 1H, 2'OH), 5,86 (d, $J = 5,0$ Hz, 1H, 1'), 7,33 (bd, $J = 8,0$ Hz, 1H, 6''), 7,53 (bd, $J = 8,0$, 1H, 7''), 7,56 (bs, 1H, 9''), 7,73 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H, 3''), 7,78 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H, 2''), 7,87 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H, 4''), 7,89 (bs, 1H, 10-NH), 7,98 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H, 1''), 8,18 (bs, 1H, 2), 8,31 (bs, 1H, 8), 10,06 (s, 1H, 8''-CONH); ^{13}C NMR (DMSO, 125 MHz, 30,0°C: 172,19 (C-22), 166,87 (C-12''), 155,31 (C-6), 153,07 (C-2), 148,84 (C-4), 148,07 (C-4b''), 140,30 (C-8), 139,42 (C-5a''), 135,91 (C-8''), 134,78 (C-4a''), 133,89 (C-2''), 132,91 (C-3''), 130,73 (C-12a''), 128,58 (C-6''), 123,54 (C-4''), 123,07 (C-9a''), 122,48 (C-1''), 120,39 (C-5), 119,38 (C-7''), 118,04 (C-9''), 88,63 (C-1'), 86,59 (C-4'), 74,17 (C-2'), 71,34 (C-3'), 62,36 (C-5'), 41,10 (C-10''), 39,67 (C-11), 37,09 (C-21), 29,70 (C-12), 20,0-32,0 (C-13-19), 25,80 (C-20); MALDI-TOF-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z znalezione: 640,69; obliczone: 641,20.

N^6 -[N -(12-okso-10,12-dihydroizoindolo[1,2- b]chinazolin-8-ylo)dodekanamid]adenozyna (175h): ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,25 (m, 14H, 13-19), 1,56 (m, 4H, 12/20), 2,30 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H, 21), 3,49 (bs, 2H, 11), 3,55 (dd, $J = 12,0$ Hz, 3,5 Hz, 1H, 5'b), 3,65 (dd, $J = 12,0$ Hz, 3,5 Hz, 1H, 5'a), 3,95 (dd, $J = 5,0$ Hz, 3,5 Hz, 1H, 4'), 4,12 (t, $J = 5,0$, 1H, 3'), 4,58 (t, $J = 5,0$ Hz, 1H, 2'), 4,89 (s, 2H, 10''), 5,31 (bs, 1H, 3'OH), 5,47 (bs, 1H, 5'OH), 5,56 (bs, 1H, 2'OH), 5,86 (d, $J = 5,0$ Hz, 1H, 1'), 7,33 (bd, $J = 8,0$ Hz, 1H, 6''), 7,54 (bd, $J = 8,0$, 1H, 7''), 7,58 (bs, 1H, 9''), 7,73 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H, 3''), 7,78 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H, 2''), 7,87 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H, 4''), 7,90 (bs, 1H, 10-NH), 7,98

(d, $J = 7,0$ Hz, 1H, 1^{''}), 8,18 (bs, 1H, 2), 8,33 (bs, 1H, 8), 10,17 (s, 1H, 8^{''}-CONH); ¹³C NMR (DMSO, 125 MHz, 30,0°C: 172,19 (C-22), 166,87 (C-12^{''}), 155,31 (C-6), 153,07 (C-2), 148,84 (C-4), 148,07 (C-4b^{''}), 140,30 (C-8), 139,42 (C-5a^{''}), 135,91 (C-8^{''}), 134,78 (C-4a^{''}), 133,89 (C-2^{''}), 132,91 (C-3^{''}), 130,73 (C-12a^{''}), 128,58 (C-6^{''}), 123,54 (C-4^{''}), 123,07 (C-9a^{''}), 122,48 (C-1^{''}), 120,39 (C-5), 119,38 (C-7^{''}), 118,04 (C-9^{''}), 88,63 (C-1[']), 86,59 (C-4[']), 74,17 (C-2[']), 71,34 (C-3[']), 62,36 (C-5[']), 41,10 (C-10^{''}), 39,67 (C-11), 37,09 (C-21), 29,70 (C-12), 20,0-32,0 (C-13-19), 25,80 (C-20); MS [M+H]⁺ *m/z* znaleziona: 696,80; obliczona: 697,20.

5.7. Materiały stosowane podczas badań biologicznych

5.7.1. Linie komórkowe i podłoża hodowlane

Komórki adherentne: niedrobnokomórkowy rak płuc – A549, rak jelita – HCT-116 i HT-29, rak prostaty – LNCaP, rak piersi – MCF-7, fibrosarkoma mysia – WEHI 1640, unieśmiertelnione fibroblasty mysie – NIH-3T3.

Komórki białaczek: ludzka białaczka promielocytarna HL-60, mysia białaczka mieloblastyczna – P388 oraz mysia białaczka limfocytarna – L1210.

Powyzsze linie komórkowe zostały zakupione z American Type Culture Collection (Rockville, MD). Komórki A549, HL-60 LNCaP, P388, L1210 oraz WEHI 1640 hodowano w medium RPMI 1640, zaś komórki HCT-116, HT-29, MCF-7 oraz NIH-3T3 w medium DMEM o wysokim stężeniu glukozy. Media hodowlane suplementowano za pomocą 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS), 2 mM L-glutaminy oraz antybiotyków (100 IU/ml penicyliny oraz 100 µg/ml streptomycyny).

5.8. Metody stosowane w badaniach biologicznych

5.8.1. Hodowla linii komórkowych – pasażowanie komórek

Komórki adherentne, hodowano w plastikowych flaszkiach przeznaczonych do hodowli komórkowych i inkubowano w inkubatorze w 37°C z wilgotną atmosferą zawierającą 5% CO₂ (dla RPMI 1640) oraz 10% CO₂ (dla DMEM H/G). Komórki rozszczepiano 2-3 razy w tygodniu, zlewając znad nich pożywkę i dodając 2 ml trypsyny, w celu odklejenia komórek od podłoża. Następnie komórki zawieszono w 6 ml nowej

pożywki, rozpipetowano i policzono przy użyciu licznika komórek Coulter Counter. Kolejnym krokiem było przeniesienie odpowiedniej liczby komórek do nowych butelek i uzupełnienie pożywką do objętości 10 ml. Wszystkie linie komórkowe rutynowo przebadano na obecność mykoplazmy przy pomocy metody PCR z użyciem Mycoplasma Plus PCR primer set (Stratagene, La Jolla, CA).

5.8.2. Test kolorymetryczny MTT

Cytotoksyczność otrzymanych związków została określona za pomocą testu kolorymetrycznego MTT.

Komórki wysiano na płytki 24-studzienkowe w ilości 4 tys. komórek/2 ml pożywki na studzienkę, a następnie inkubowano w temp. 37°C, 5% CO₂ lub 10% CO₂ przez 24 godz.

Badane związki rozpuszczono w DMSO w celu otrzymania roztworu wyjściowego o stężeniu 20 mM. Następnie przygotowano roztwory badanego związku w DMSO w następującym zakresie stężeń: 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0 μM. Wyjściowe roztwory związku były 200-krotnie stężone w stosunku do założonych stężeń, ponieważ dodawane były w obj. 10 μl do 2 ml pożywki w studzience z komórkami. Do studzienek kontrolnych dodane zostało 10 μl DMSO.

Komórki inkubowano 120 godz. w temp. 37°C w atmosferze zawierającej 5% CO₂ lub 10% CO₂. Następnie do każdego dołka dodano 200 μl roztworu barwnika MTT i pozostawiono w inkubatorze na 4 godz. w temp. 37°C. Po tym czasie odessano płyn z nadkryształów formazanu i dodano 1 ml DMSO do każdej studzienki. Płytki umieszczono na orbitalnej wytrząsarce (30 min.), aby kryształy formazanu uległy rozpuszczeniu. Absorbencję roztworów oznaczono spektrofotometrycznie za pomocą czytnika płytek UVM340 (Biochrom Asys Ltd) (długości fali 540 nm).

Stężenia hamujące wzrost komórek nowotworowych w 50% w porównaniu do próbek kontrolnych były wyznaczone na podstawie krzywej zależności funkcji wzrostu komórek od dawki leku przy użyciu programu GraphPad Prism 5.

5.8.3. Cytometria przepływowa

Dystrybucja komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego została określona po potraktowaniu komórek nowotworowych badanymi związkami. Komórki nowotworowe (linia A549 oraz linia HL-60) traktowano stężeniem związków odpowiadającym wartości IC_{90} , po czym przemyto je chłodnym roztworem PBS oraz utrwalono w 70% etanolu (temp. $-20^{\circ}C$). Komórki barwiono w PBS zawierającym 20 $\mu g/mL$ jodku propidyny oraz 100 $\mu g/mL$ rybonukleazy A przez 30 min. w temp. pok. Próbkę zostały zanalizowane przy użyciu cytometru przepływowego Guava EasyCyte™ 8 (Merck-Millipore), wyposażonego w 488 nm laser. Dystrybucja komórek w poszczególnych fazach cyklu została określona przy użyciu oprogramowania MultiCycle (Phoenix Flow Systems).

5.8.4. Zahamowanie aktywności kompleksu rozszczepialnego topoizomeraza-DNA

Superskręcony plazmidowy DNA pBR322 (>95% formy I) został zakupiony z Thermo Scientific, ludzka topoizomeraza typu I została zakupiona z MoBiTe, zaś typu II α z TopoGen. Roztwór reakcyjny zawierał 200 ng pBR322 DNA w buforze reakcyjnym (20mM Tris-HCl, pH 7,5, 7,5 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT, 150 mM KCl, 1 mM ATP) oraz badane związki. Reakcja została zapoczątkowana w wyniku dodania enzymu topoizomeraza II α i była prowadzona przez 30 min. w temp. $37^{\circ}C$. Reakcję zatrzymano poprzez dodanie buforu (0.1% SDS, 0.05% bromofenolu, 2.5 mM EDTA, 10% sacharozy, końcowe stężenia). Próbkę zostały rozdzielone w 1% żelach agarozowych (przy napięciu 0.5 V/cm) przez 18 godz. w buforze TBE (90mM Tris, 70mM kwas borowy, 1 mM EDTA, pH 8). Żele wybarwiono za pomocą 0.5 $\mu g/mL$ bromku etydyny w celu wizualizacji DNA oraz sfotografowania UV. Badania przeprowadzone dla topoizomerazy I były prowadzone w takich samych warunkach, za wyjątkiem buforu reakcyjnego (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 7,5 mM MgCl₂, 60 mM KCl).

5.8.5. Morfologia komórki i jądra komórkowego

Badane komórki zostały zaszczipione na szkiełka nakrywkowe (35 mm płytki Petriego) oraz potraktowane badanymi związkami w różnych czasach.

Następnie, komórki barwiono przez 15 min. za pomocą 1 µg/mL Hoechst 33342 i 7,5 µg/mL dwuoctanu fluoresceiny, po czym zanalizowano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Olympus BX-60, zaopatrzonego w odpowiednie filtry optyczne. Obrazy zostały zarejestrowane przy użyciu kamery cyfrowej XC50 (oprogramowanie CellSens).

5.8.6. Barwienie β -galaktozydazy

Komórki nowotworowe traktowano stężeniem związków odpowiadającym wartości IC_{90} przez 120 godz., a następnie: przemyto PBS, utrwalano przez 3-5 min. (temp. pok.) w 3,7% formaldehydzie, ponownie przemyto oraz inkubowano przez 12 – 16 godz. w temp. 37°C (bez CO₂) w świeżo przygotowanym roztworze barwiącym zawierającym 1 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indylo- β -D-galaktozy (X-Gal; Stock 20 mg/ml X-Gal w dimetyloformamidzie/40 mM kwasu cytrynowego/fosforanu sodowego, pH 6,0; 5 mM żelazocyjanku potasu; 150 mM NaCl; 2 mM MgCl₂). Obrazy zostały zarejestrowane przy użyciu kamery cyfrowej XC50 (oprogramowanie CellSens).

5.9. Obliczenie wartości IC_{50}

IC_{50} posłużyło do określenia żywotności komórek. Wartość ta została obliczona na podstawie wyników testu MTT. IC_{50} oznacza stężenie związku powodujące śmierć 50% komórek, wyznaczane z liniowego fragmentu zależności absorbancji (OD) od stężenia związku. Do jej obliczenia zastosowano następujące równanie:

$$\% \text{ żywych komórek} = \frac{(OD_z - OD_p)}{(OD_k - OD_p)} \times 100$$

OD_z – średnia absorbancja komórek traktowanych związkiem

OD_k – średnia absorbancja komórek kontrolnych

OD_p – średnia absorbancja pożywki

5.10. Analiza statystyczna

W celu określenia znamienności statystycznej różnic w otrzymanych wynikach stosowano test *t*-Studenta, dla $P < 0,05$ (GraphPad Prism, Wersja 6.02). Wartości średnie i odchylenia standardowe liczone z trzykrotnych powtórzeń dla poszczególnych stężeń.

6. PODSUMOWNIE I WNIOSKI KOŃCOWE

Tematem mojej pracy doktorskiej była synteza oraz badania *in vitro* nowych analogów batracyliny z pochodnymi tuftsyny/retro-tuftsyny acylowanymi na grupie aminowej lizyny dodatkowym aminokwasem (Gly, Ala, Val, Leu, Ile) oraz analogów batracyliny z adenozyną jako potencjalnych związków przeciwnowotworowych.

Projektując wyżej wspomniane analogi, założyłam, że BAT jako związek wykazujący silną aktywność przeciwnowotworową, w wyniku utworzenia kowalencyjnych połączeń z pochodnymi tuftsyny czy z adenozyną powinien przyczynić się do otrzymania związków charakteryzujących się lepszymi właściwościami farmakologicznymi, np. biodostępnością.

W ramach wykonanej pracy uzyskałam następujące rezultaty pracy syntetycznej:

1. Otrzymałam batracylinę przy użyciu zmodyfikowanej metody Czerniaka-Einhorna (Schemat 24). Wydajność reakcji wynosiła 77%.
2. W celu otrzymania zaprojektowanych analogów batracyliny z pochodnymi tuftsyny/retro-tuftsyny:
 - otrzymałam odpowiednio chronione aminokwasy będące substratami w syntezie peptydów (Schemat 28) z wydajnością 77-89%;
 - przeprowadziłam kilkietapową syntezę pochodnych tuftsyny/retro-tuftsyny - metodą mieszanych bezwodników z chloromrówczanem izobutyli i NMM zsyntezowałam odpowiednie tetra- i pentapeptydy (Rysunek 40) z wydajnością w zakresie 32-61%;
 - opracowałam metodę łączenia batracyliny z otrzymanymi pochodnymi tuftsyny/retro-tuftsyny:
 - ✓ Wiązanie amidowe utworzyłam za pomocą odczynnika kondensującego T3P umożliwiające otrzymanie produktów z dobrą wydajnością (24-41%) (Schemat 31).

3. W celu otrzymania zaprojektowanych analogów batracyliny z adenozyną:
- otrzymałam aminokwasowe pochodne batracyliny – substraty w syntezie analogów (wyd. 48-64%) (Schemat 33):
 - opracowałam metodę łączenia rybozydu 6-chloropuryny z aminokwasowymi pochodnymi batracyliny:
 - ✓ Reakcję rybozydu 6-chloropuryny z otrzymanymi pochodnymi batracyliny prowadziłam w temp. wrzenia EtOH w obecności DIPEA otrzymując produkty z wydajnością 51-71% (Schemat 35).

Kolejnym etapem moich badań było określenie w warunkach *in vitro* właściwości cytotoksycznych otrzymanych związków. Badania zostały przeprowadzone wobec dwóch linii komórkowych pochodzenia ludzkiego: A549 oraz HL-60 charakteryzujących się największą wrażliwością w testach prowadzonych z udziałem batracyliny w postaci chlorowodoru (HClxBAT). Ponadto, przeprowadzono badania określające wpływ otrzymanych analogów na aktywność katalityczną kompleksu topoizomeraza-DNA oraz dystrybucję komórek w cyklu komórkowym i indukcję uszkodzeń DNA.

W ramach wykonanej pracy uzyskałam następujące rezultaty badań biologicznych:

1. Batracylina wykazała umiarkowane właściwości cytotoksyczne na wybranych liniach komórkowych (A549, HCT 116, HT-29, LNCaP, MCF-7, HL-60, P388, L1210, WEHI 1640, NIH-3T3). Wartość IC_{50} mieściła się w przedziale od 35,49 μ M dla komórek linii A549 do 90,20 μ M dla komórek linii LNCaP.
2. Pochodne tuftsyny/retro-tuftsyny nie wykazały aktywności cytotoksycznej wobec linii A549 i HL-60.
3. Analogi batracyliny z pochodnymi tuftsyny/retro-tuftsyny wykazywały aktywność porównywalną lub większą od batracyliny. Wyjątek stanowią związki (**178c**) i (**178e**) nieaktywne dla obu linii oraz (**178f**) i (**178i**) nieaktywne tylko dla linii A549. Warto podkreślić, że najlepszy wynik uzyskano dla analogu (**178l**), który był około 12 razy bardziej aktywny niż batracylina.
4. Najlepszą aktywnością cytotoksyczną charakteryzowały się aminokwasowe pochodne batracyliny. Najbardziej aktywny związek (**179h**) był ponad 30-krotnie bardziej aktywny niż batracylina, dla obu badanych linii.

5. Analogi adenozyliny z aminokwasowymi pochodnymi batracyliny okazały się nieaktywne dla wybranych linii nowotworowych, czego przyczyną było tworzenie przez te związki supramolekularnych struktur niemogących wnikać do wnętrza komórek. Wyjątek stanowił analog (**175e**), dla którego odnotowano umiarkowaną aktywność cytotoksyczną (40,6 μ M dla komórek linii A549).
6. Przeprowadzone badania wykazały, że związki (**178e-f**) oraz (**178k-l**) nie hamują w znacznym stopniu relaksacji DNA przez topoizomerazę I, natomiast dają dobre wyniki w przypadku hamowania relaksacji DNA przez topoizomerazę II α . Warto podkreślić, że analogi (**178k-l**) charakteryzujące się największą aktywnością cytotoksyczną, okazały się także najsilniejszymi inhibitorami topoizomerazy II α .
7. Analogi (**178a**) i (**178k**) powodują silną fosforylację histonu H2AX.
8. W wyniku analizy cyklu komórkowego oraz morfologii jądra komórkowego, po traktowaniu komórek nowotworowych analogami (**178a**) oraz (**178k**) można stwierdzić, że przyrost frakcji sub-G1 był znaczący w populacji komórek inkubowanych z omawianymi związkami. Związek (**178a**) powodował 2,5-krotny wzrost frakcji sub-G1 w porównaniu do batracyliny.
9. Komórki A549, nie podatne na apoptozę, poddane działaniu związków (**178a**) oraz (**178k**) nabierały cech fenotypowych charakterystycznych dla komórek ulegających procesowi przedwczesnego starzenia indukowanego lekami.
10. Komórki białaczki HL-60 poddane 24 godz. działaniu batracyliny oraz analogów (**178a**) i (**178k**) nie zatrzymały swojego cyklu komórkowego w fazie G2, ale wchodziły do mitozy, jednakże sama mitozą nie przebiegła poprawnie.

7. SUMMARY

The objective of this dissertation was to synthesize and evaluate biological activity of the new analogues of batracylin with tuftsin/retro-tuftsin derivatives and new analogues of adenosine with batracylin derivatives. Batracylin (BAT) is a drug which showed high antitumor and cytotoxic activity toward several experimental tumor cell models. BAT had been tested in phase I clinical trial in patients with advanced solid tumors and lymphomas. This clinical investigation found that BAT was tolerated in most patients. However, due to absence of a stronger signal for antitumor activity, further development of BAT had been stopped. Tuftsin (TKPR) is a tetrapeptide that has been shown to possess immunologic, tumoricidal, and bactericidal activities. Adenosine (ADO) is an endogenous purine nucleoside and an antiarrhythmic drug with negative chronotropic and dromotropic action.

The chemical part of the work involved synthesis of BAT via modified method based on the Czerniak-Einhorn reaction. I synthesized also the protected tuftsin/retro-tuftsin derivatives containing isopeptide bond between ϵ -amino group of lysine and carboxyl group of simple amino acids such as Gly, Ala, Val, Leu, Ile. Protected peptides were obtained using mixed anhydride method. New analogues of BAT with tuftsin/retro-tuftsin derivatives were synthesized using T3P as a coupling agent in solvent mixture (yields 24-41%). The amino acid-batracylin derivatives were synthesized using DCC and DMAP in anhydrous methyl chloride in good yields 48-64%. Finally, the new analogues of adenosine with batracylin derivatives were synthesized using highly reactive DIEA in solvent mixture. The bond between 6-chloropurine riboside and an amine group of batracylin derivatives was achieved during reaction in anhydrous ethanol (yields 51-71%).

Synthesized analogues were subjected to biological tests. The MTT viability test was used to estimate cytotoxicity of the compounds. Cytotoxic activity testing was performed using different human tumor cells: lung adenocarcinoma (A549) and human promyelocytic leukemia (HL-60). BAT showed moderate cytotoxic properties. Conjugation of BAT with tuftsin alone did not appreciably change the cytotoxicity of the analogues, compared to BAT. In contrast, retro-tuftsin-BAT analogues were about 2-fold (for HL-60 cells) and about 5-fold (for A549 cells) more cytotoxic than BAT. Several of the aminoacid-BAT derivatives showed greatly increased cytotoxicity toward both tumor cell types compared to BAT. Sensitivity toward both A549 and HL-60 cells was higher from about 2- to more than 25-fold compared to the BAT e.g. compound (**179h**) was about 30 times more

cytotoxic toward A549 and HL-60 cells than BAT. The majority of aminoacid-adenosine-BAT analogues were completely biologically inactive toward both A549 as well as HL-60 cells. Only compound (**175e**) was specifically cytotoxic toward A549 cells but showed comparable activity to BAT. Analogues (**178e-f**) and (**178k-l**) did not appreciably inhibit DNA relaxation mediated by type I DNA topoisomerase. Effect of studied analogues on DNA relaxation mediated by topoisomerase II α enzyme was much more pronounced and drug dose-dependent. Treatment of tumor cells with BAT and its two analogues (**178a**) and (**178k**), at doses corresponding to their IC₉₀ concentrations, resulted in a rapid (within 3h) phosphorylation of the H2AX histone which is a typical marker of double-stranded DNA breaks. Analysis of cell cycle progression and nuclear morphology after treatment of tumor cells with compounds (**178a**) and (**178k**) revealed that biological action of BAT and its tuftsin/retro-tuftsin analogs was cell-type specific. The (**178a**) BAT-tuftsin analogue increased debris fraction by about 3,5-fold, compared to BAT.

8. DOROBEK NAUKOWY

Publikacje monograficzne

- Dzierzbicka K., **Januchta W.**, Składanowski A., Novel approaches in the Synthesis of Batracylin and Its Analogs: Rebirth of an Old Player? *Curr. Med. Chem.*, **2012**, *19*, 4475-4487. (Q1)

Publikacje oryginalne

- **Januchta W.**, Serocki M., Dzierzbicka K., Cholewiński G., Składanowski A., Synthesis of functionalized new conjugates of batracylin with tuftsin/retro-tuftsin derivatives and their biological evaluation. *Eur. J. Med. Chem.*, **2015** (przyjęta do druku).
- **Januchta W.**, Serocki M., Dzierzbicka K., Cholewiński G., Gensicka M., Składanowski A., Synthesis and biological evaluation of novel functionalized analogues of batracylin (BAT) with adenosine. *J. Med. Chem.*, **2015** (wysłana).

Udział w sympozjach i konferencjach naukowych

- **Januchta W.**, Dzierzbicka K., Składanowski A. *New analogues of batracylin as potential anticancer agents*, XLVII Symposium of The Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry: program and abstracts, Olsztyn, 4th - 6th September 2013, Abstracts – S. 55.
- Serocki M., **Januchta W.**, Dzierzbicka K., Składanowski A. *Synthesis and biological evaluation of functionalized derivatives of batracylin as new antitumor agents*, 35th EORTC-PAMM Winter Meeting, University of Münster, Germany, 12th - 15th February 2014, Abstracts – S. 41.
- **Januchta W.**, Dzierzbicka K., Cholewiński G., Składanowski A., Serocki M. *Design and synthesis of new analogues of batracylin linked to tuftsin and retro-tuftsin derivatives*, 33rd European Peptide Symposium, Sofia, 31st August – 5th September 2014, Abstracts – S. 161 – S. 162.

- **Januchta W.**, Dzierzbicka K., Serocki M., Cholewiński G., Składanowski A. *Synteza nowych analogów batracyliny jako potencjalnych związków przeciwnowotworowych*, 57 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, Częstochowa 14 – 18.09.2014, Materiały Zjazdowe Streszczenia – S. 218.
- **Januchta W.**, Gensicka M., Cholewiński G., Dzierzbicka K. *Synteza amidowych pochodnych batracyliny*, 57 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, Częstochowa 14 – 18.09.2014, Materiały Zjazdowe Streszczenia – S. 218.
- Serocki M., **Januchta W.**, Cholewiński G., Dzierzbicka K., Składanowski A. *Novel functionalized conjugates of batracylin with aminoacids and short peptides as new antitumor agents*, 36th EORTC-PAMM Winter Meeting, Marseille Provence Metropole, France, 21st – 24th January 2015, Abstracts – S. 84.
- **Januchta W.**, Serocki M., Prejs M., Dzierzbicka K., Cholewiński G., Składanowski A. *Synthesis and cytotoxic activity of conjugates of adenosine with batracylin derivatives*, 16th Tetrahedron Symposium, Grand Hyatt Berlin, Germany, 16th – 19th June 2015.
- **Januchta W.**, Dzierzbicka K., Serocki M., Cholewiński G., Składanowski A. *Synteza i badania biologiczne analogów batracyliny o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych*, 58 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego w Gdańsku, Gdańsk 21-25.09.2015, Materiały Zjazdowe Streszczenia – S. 113.

Praca została sfinansowana przez NCN grant nr 2012/05/B/NZ7/02461.

9. LITERATURA

- [1] Potrykowska A., Strzelecki Z., Szymborski J., Witkowski J., *Zachorowalność i umieralność na nowotwory a sytuacja demograficzna Polski*, wyd. Zakład Wydawnictw Statystycznych, Warszawa, **2014**.
- [2] Saad K., Claude J., *Prawda o raku*, wyd. Państw. Zakł. Wydaw. Lek. Warszawa, **1983**.
- [3] <http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/cancerfactsfigures2015/>
- [4] <http://www.zwrotnikraka.pl/leczenie-immunologiczne-raka/>
- [5] http://wyborcza.pl/1,140942,16913441,Najnowsze_sposoby_na_raka.html
- [6] <http://www.zwrotnikraka.pl/hipertermia-raka-w-leczeniu-onkologicznym/>
- [7] <http://www.zwrotnikraka.pl/nanoknife-klara-rak-pradem-razony/>
- [8] Chaber B.A., Amerin P.C., Druker B.J., *Antineoplastic Agents*, wyd. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, New York, **2006**, 1352.
- [9] Lewiński T., Michałowski J., *Choroby nowotworowe*, wyd. Państw. Zakł. Wydaw. Lek., Warszawa, **1988**.
- [10] Dzierzbicka K., Januchta W., Składanowski A., *Novel approaches in the Synthesis of Batracylin and Its Analogs: Rebirth of an Old Player?*, *Curr. Med. Chem.*, **19**, 4475, **2012**.
- [11] Plowman J., Paull K.D., Atassi G., Harrison Jr. S.D., Dykes D.J., Kabbe H.J., Narayanan V.L., Yoder O., *Preclinical antitumor activity of batracylin (NSC 320846)*, *Invest. New Drugs*, **6**, 147, **1988**.
- [12] Martinez-Viturro C.M., Dominguez D., *Synthesis of the antitumoral agent batracylin and related isoindolo[1,2-b]quinazolin-12(10H)-ones*, *Tetrahedron Lett.*, **48**, 1023, **2007**.
- [13] Wang H.K., Morris-Natschke S.L., Lee K.H., *Recent advances in the discovery and development of topoisomerase inhibitors as antitumor agents*, *Med. Res. Rev.*, **17**(4), 401, **1997**.
- [14] Kabbe H.J., *Heterocycles from diamines and diacyl compounds*, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **398**, **1978**.

- [15] Roservear J., Wilshire F.K., *A comparison of the reactions of some etyl N-arylcabamates with those of the corresponding acetanilides. II Amidomethylation with N-hydroxymethylphthalimide*, *Aust. J. Chem.*, **43**, 339, **1990**.
- [16] Rao V.A., Agama K., Holbeck S., *Batracylin (NSC 320846), a dual inhibitor of DNA topoisomerases I and II induce histone γ -H2AX as a biomarker of DNA damage*, *Cancer Res.*, **67**, 9971, **2007**.
- [17] Lepiarczyk M., Bielawska A., Sosnowska K., Bielawski K., *Ludzka topoizomeraza typu II jako molekularny punkt uchwytu leków przeciwnowotworowych*, *Gazeta Farmaceutyczna*, **4**, 24, **2011**.
- [18] Kik K., Szmigiero L., *Deksrazoksan (ICRF-187) – czynnik kardioochronny i modulator działania niektórych leków przeciwnowotworowych*, *Postępy Hig. Med. Dosw.*, **60**, 584, **2006**.
- [19] Wang H., Mao Y., Zhou N., Hasish T.S., Liu L.F., *ATP-bound topoisomerase II as a target for antitumor drugs*, *J. Biol. Chem.*, **276**(19), 15990, **2001**.
- [20] Atassi G., Dumont P., Kabbe H.J., Yoder O., *A new antitumor agent, batracylin, selected by preclinical solid tumor model*, *Drugs Exp. Clin. Res.*, **14**(9), 571, **1988**.
- [21] Patent US 4757072, **1988**.
- [22] Wound W.R., Harrisom S.D., Gilbert K.S., Laster W.R., Griswold D.P., *Antitumor drug cross-resistance In vivo in a cisplatin-resistant murine P388 leukemia*, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **27**, 456, **1991**.
- [23] Mucci-LoRusso P., Polin L., Bissery M.C., Valeriote F., Plowman J., Luk G.D., Corbett T.H., *Activity of batracylin (NSC-320846) against solid tumors of mice*, *Invest. New Drugs*, **7**, 295, **1989**.
- [24] Ames M.M., Mathiesen D.A., Reid J.M., *High-performance liquid chromatographic assay and preclinical pharmacologic studies with the experimental antitumor agent batracylin*, *J. Chromatogr.*, **491**, 488, **1989**.
- [25] Ames M.M., Mathiesen D.A., Reid J.M., *Differences in N-acetylation of the experimental antitumor agent batracylin in te mouse and the rat*, *Invest. New Drugs*, **9**, 219, **1991**.
- [26] El –Hawari M., Stoltz M.L., Pallas F., *Species differences in the toxic responses to batracylin (NSC 320846)*, *Proc. Am. Assoc. Cancer. Res.*, **30**, 626, **1989**.
- [27] Lower G.M., Bryan G.T., *Enzymatic N-acetylation of carcinogenic aromatic amines by liver cytosol of species displaying different organ susceptibilities*, *Biochem. Pharmacol.*, **22**, 1581, **1973**.

- [28] Hein D.W., Rustan T.D., Ferguson R.J., Doll M.A., Gray K., *Metabolic activation of aromatic and heterocyclic N-hydroxyarylamines by wild-type and mutant recombinant human NAT1 and NAT2 acetyltransferases*, Arch. Toxicol., 68, 129, **1994**.
- [29] Weber W.W., *The acetylator genes and drug response*, Oxford University Press, New York, **1987**.
- [30] Stevens G.J., McQueen C.A., *Species variation in the genotoxicity of batracylin*, Toxicol. Appl. Pharmacol., 126(1), 39, **1994**.
- [31] Stevens G.J., *The role of N-acetylation in the genotoxicity of the antitumor agent, batracylin*, UMI Company, **1995**.
- [32] Stevens G.J., Burkey J.L., McQueen C.A., *Toxicity of the heterocyclic amine batracylin: investigation of rodent N-acetyltransferase activity and potential contribution cytochrome P450 3A*, Cell Biol. Toxicol., 16, 31, **2000**.
- [33] Stevens G.J., La Voie E.J., McQueen C.A., *The role of acetylation in the mutagenicity of the antitumor agent batracylin*, Carcinogenesis, 17(1), 115, **1996**.
- [34] Stevens G.J., Payton M., Sim E., McQueen C.A., *N-acetylation of the heterocyclic amine batracylin by human liver*, DMD, 27(9), 966, **1999**.
- [35] Kummar, S.; Gutierrez, M.E.; Anderson, L.W.; Klecker, R.W.; Chen, A.; Murgu, A.J.; Doroshow, J.H.; Collins, J.M., *Pharmacogenetically driven patient selection for a first-in-human phase I trial of batracylin in patients with advanced solid tumors and lymphomas*. Cancer Chemother Pharmacol., 72, 917, **2013**.
- [36] Davis M., Bunin D.I., Samuelsson S.J., Altera K.P., Kinders R.J., *Characterization of batracylin-induced renal and bladder toxicity in rats*, Toxicol Pathol, 4, 519, **2015**.
- [37] Dzierzbicka K., *Zeszyty Naukowe Politechniki Gdańskiej*, 52, **2004**.
- [38] Meegalla S.K., Stevens G.J., McQueen C.A., *Synthesis and pharmacological evaluation of isoindolo[1,2-b]quinazoline and isoindolo[2,1-a]benzimidazole derivatives related to the antitumor agent batracylin*, J. Med. Chem., 37, 3434, **1994**.
- [39] Eguchi S., Goto S., *An alternative cyclization based on an intramolecular aza-Wittig reaction has been achieved*, Heterocycl. Commun., 1, 51, **1994**.
- [40] Dzierzbicka K., Trzonkowski P., Sewerynek P., Myśliwski A., *Synthesis and cytotoxic activity of conjugates of muramyl and normuramyl dipeptides with batracylin derivatives*, J. Med. Chem., 46, 978, **2003**.

- [41] Shankar R., Wagh M.B., Madhubabu M.V., Vembu N., Kumar U.K.S., *A concise and cascade synthesis of batracylin and substituted isoindolo[1,2-b]quinazolin-12(10H)-ones*, Synlett, 6, 844, **2011**.
- [42] Tseng, M.Ch., Lai, P.Y., Shi, L., Li, H.Y., Tseng, M.J., Chu, Y.Ch., *Synthesis of batracylin and its N-sulfonamido analogues in [b-3C-im][NTf₂] ionic liquid*, Tetrahedron, 70, 2629, **2014**.
- [43] Patent US 4989343, **1990**.
- [44] Patent EP 0501250, **1992**.
- [45] Patent WO 96/31532, **1996**.
- [46] Patent WO 98/ 15571, **1998**.
- [47] Luo Y., Ren Y.F., Chou T.C., Chen A.Y., Yu C., Liu L.F., Cheng C.C., *A structure-activity relationship study of batracylin analogues*, Pharma. Res., 10(6), 918, **1993**.
- [48] Lerchen H. G., baumgreten J., Piel N., Kolb-Bachofen V., *Lecitin-mediated drug targeting: discrimination of carbohydrate-mediated cellular uptake between tumor and liver cells with neoglycoconjugates carrying fucose epitopes regioselectively modified in the 3-position*, Angew. Chem. Int. Ed., 78(24), 3680, **1999**.
- [49] Dzierzbicka K., Trzonkowski P., Bociewicz J., Szmit E., Myśliwski A., *Biological activity of conjugates of muramyl dipeptides with batracylin derivatives*, Int. Immunopharm., 5, 241, **2005**.
- [50] Guillaumel J., Leonce S., Pierre A., Renond P., Pfeiffer B., Arimondo P.B., Monneret C., *Synthesis and biological activity of 6H-isoindolo[2,1-a]indol-6-ones, analogues of batracylin, and related compound*, Eur. J. Med. Chem., 41, 379, **2006**.
- [51] Martiez-Vituro C.M., Dominguez D., *Synthesis of aza analogues of the anticancer agent batracylin*, Tetrahedron Lett., 48, 4707, **2007**.
- [52] Mitunobu O., *Synthesis*, 1, **1981**.
- [53] Beaume A., Courillon C., Derat E., Malacria M., *Unprecedented aromatic hemolytic substitutions and cyclization of amide-iminyl radicals: Experimental and theoretical study*, Chem. Eur. J., 16, 1238, **2008**.
- [54] Cole A.G., Kultgen S.G., Henderson I., *Microwave-assisted, one-pot synthesis of 5 thia-4b,10-diaza-indeno[2,1- α]-indene-5,5-dioxide and 10H-11-thia-5,10a-diaza-benzo[b]fluorine-11,11-dioxide*, Synthetic Commun., 39, 3607, **2009**.

- [55] Seltzman H.H., Fix S.E., Risbood P., *Deuterated batracyclin: deuterium-hydrogen ex-change during synthesis and mass spectral analysis*, J. Label Compd. Radiopharm, 54, 206, **2011**.
- [56] Chen J., Neumann H., Beller M., Wu X., *Palladium-catalyzed synthesis of isoindoloquinazolinones via dicarbonylation of 1,2-dibromoarenes*, Org. Biomol. Chem., 12, 5835, **2014**.
- [57] Tripathi S.K., Goyal R., Kashyap M.P., Pant A.B., Haq W., Kumar P., Gupta K.C., *Depolymerized chitosans functionalized with bPEI as carriers of nucleic acids and tuftsin-tethered conjugate for macrophage targeting*, Biomaterials, 33, 4204, **2012**.
- [58] Najjar V. A., Nishioka K., *'Tuftsin': a Natural Phagocytosis Stimulating Peptide*, Nature, 228, 672, **1970**.
- [59] Garshonov E., Granoth R., Tzehoval E., Gaoni Y., Fridkin M., *1-Aminocyclobutane-carboxylic acid derivatives as novel structural elements in bioactive peptides: application to tuftsin analogs*, J. Med. Chem., 39(24), 4833, **1996**.
- [60] Dzierzbicka K., Rakowski T., Kołodziejczyk A.M., *Tuftsyna - endogenny immunomodulator*, Post. Biochem., 46(4), 327, **2000**.
- [61] Najjar V.A., Nishioka K., *'Tuftsin': a Natural Phagocytosis Stimulating Peptide*, Nature, 228, 672, **1970**.
- [62] Najjar V.A., Konopińska D., Chaudhuri M.K., Schmidt D.E., Linehan L., *Tuftsin, a natural activator of phagocytic functions including tumoricidal activity*, Mol. Cell. Biochem., 41, 3, **1981**.
- [63] Nissen J.C., Selwood D.L., Tsirka S.E., *Tuftsin signals through its receptor neuropilin-1 via the transforming growth factor beta pathway*, J. Neurochem., 127(3), 394, **2013**.
- [64] Navolotskaya E.V., *The second life of antibodies*, Biochemistry Mosc., 79(1), 1, **2014**.
- [65] Jain S., Tran T.H., Amiji M., *Macrophage repolarization with targeted alginate nanoparticles containing IL-10 plasmid DNA for the treatment of experimental arthritis*, Biomaterials, 61, 162, **2015**.
- [66] Siemion Z., Kluczyk A., Cebrat M., *The peptide molecular links between the central nervous and the immune systems*, Amino Acids, 29, 161, **2005**.
- [67] Liu W.J., Liu X.J., Li L., Li Y., Zhang S.H., Zhen Y.S., *Tuftsin based, EGFR-targeting fusion protein and its enediyne-energized analog show high antitumor*

- efficacy associated with CD47 down-regulation*, *Cancer Immunol. Immunother.*, *63(12)*, 1261, **2014**.
- [68] Wu M., Nissen J.C., Chen E.I., tsirka S.E., *Tuftsins promotes an anti-inflammatory switch and attenuates symptoms in experimental autoimmune encephalomyelitis*, *PloS ONE*, *7(4)*, e34933, **2012**.
- [69] Fridkin H., Tsubery H., Tzehoval E., Vonsover A., Biondi L., Filira F., Rocchi R., *Tuftsins-AZT conjugate: potential macrophage targeting for AIDS therapy*, *J. Pept. Sci.*, *11(1)*, 37, **2005**.
- [70] Konopińska D., Galsik-Bartoszek U., Plech A., Najjar V.A., Brus R., *[Hyp3]-tuftsins ([Hyp3]-TU) synthesis and biological activity*, *Int. Pept. Protein Res.*, *38(2)*, 176, **1991**.
- [71] Herman Z.S., Stachura Z., Siemion I.Z., Nawrocka E., *Analgesic activity of some tuftsins analogs*, *Naturwissenschaften*, *67(12)*, 613, **1980**.
- [72] Herman Z.S., Stachura Z., Opielka L., Siemion I. Z., Nawrocka E., *Tuftsins and D-Arg3-tuftsins possess analgesic action*, *Experientia*, *37(1)*, 76, **1981**.
- [73] Nishioka K., Obeyesekere N. U., McMurray J. S., *Enhanced phagocytosis activity of cyclic analogs of tuftsins*, *Biochem Pharmacol.*, *49(5)*, 735, **1995**.
- [74] Paulesu L., Di Stefano A., Luzzi E., Bocci V., Silvestri S., Nencioni L., *Effect of tuftsins and its retro-inverso analogue on the release of interferon (IFN-gamma) and tumor necrosis factor (TNF-alpha) by human leucocytes*, *Immuno Lett.*, *34(1)*, 7, **1992**.
- [75] Agrawal K., Gupta C.M., *Tuftsins-bearing liposomes in treatment of macrophage-based infections*, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, *41*, 135, **2000**.
- [76] Khan M.A., Khan A.A., Dwivedi V., Ahmed M.G., Hakeem S., Owais M., *Tuftsins augments antitumor efficacy of liposomized etoposide against fibrosarcoma in Swiss albino mice*, *Mol. Med.*, *13(5-6)*, 266, **2007**.
- [77] Khan M.A., Nasti T.H., Saima K., Mallick A.I., Firoz A., Wajahul H., Ahmad N., Mohammad O., *Co-administration of immunomodulator tuftsins and liposomized nystatin can combat less susceptible Candida albicans infection in temporarily neutropenic mice*, *Immunol. Med. Microbiol.*, *41(3)*, 249, **2004**.
- [78] Nishioka K., McMurray J., Fahad A.I., Obeidi B., *Tuftsins and tuftsins analogs: biology, synthesis and design theory*, *Curr. Med. Chem.*, *3(3)*, 153, **1996**.

- [79] Trevisani F., Castelli E., Foschi F. G., Parazza M., Loggi E., Bartelli M., Melotti C., Domenicali M., Zoli G., Bernardi M., *Impaired tuftsin activity in cirrhosis: relationship with splenic function and clinical outcome*, Gut., 50(5), 707, **2002**.
- [80] Wang J., Rogove A.D., Tsirka A.E., Tsirka S.E., *Protective role of tuftsin fragment 1-3 in an animal model of intracerebral hemorrhage*, Ann. Neurol., 54(5), 655, **2003**.
- [81] Wang J., Tsirka S.E., *Tuftsin fragment 1-3 is beneficial when delivered after the induction of intracerebral hemorrhage*, Stroke, 36(3), 613, **2005**.
- [82] Bhasin M., Wu M., Tsirka S.E., *Modulation of microglial/macrophage activation by macrophage inhibitory factor (TKP) or tuftsin (TKPR) attenuates the disease course of experimental autoimmune encephalomyelitis*, BMC Immunol., 8, 10, **2007**.
- [83] Pawelczyk E., *Chemia Leków*, wyd. PZWL, **1978**.
- [84] Siemion Z., Kulczyk A., *Tuftsin: on the 30-year anniversary of Victor Najjar's discovery*, Peptides, 20, 645, **1999**.
- [85] Lelekova T.V., Dynowski Z., Kubik A., Siemion I.Z., *[Effects of femto- and picomolar concentrations of thyroliberin and tuftsin on the contractile activity of lymphatic vessels of the rat mesentery]*, Biull. Eksp. Biol. Med., 108, 8, **1989**.
- [86] Paradowski A., Dynowski Z., Kubik A., Siemion I.Z., *Effect of tuftsin and its partial sequences on the arterial blood pressure in guinea-pigs*, Arch. Immunol. Ther. Exp., 39(1-2), 147, **1991**.
- [87] Begum R., Maksimovich B., *Effect of the neuropeptide tuftsin and its derivatives on metabolism in various structures of the brain*, Farmakol. Toksikol., 48(2), 41, **1985**.
- [88] Khan M.A., Faisal S.M., Nasti H.T., *Use of Tuftsin bearing nystatin liposomes against an isolate of C. albicans showing less in vivo susceptibility to amphotericin*, B. J Drug Target, 11, 93, **2003**.
- [89] D'Ursi A., Pegna M., Amadeo P., Molinari H., Verdini A., Zetta L., Temussi P., *Solution conformation of tuftsin*, Biochemistry, 31, 9581, **1992**.
- [90] Tugyi R., Mezo G., Gitta S., Fellingner E., Andreau D., Hudecz F., *Effect of conjugation with polypeptide carrier on the enzymatic degradation of herpes simplex virus glycoprotein D derived epitope peptide*, Bioconjugate Chem., 19, 1652, **2008**.
- [91] Kołodziejczyk A. M., *Naturalne związki organiczne*, wyd. PWN, **2006**.
- [92] Jakubke H., Jeschkeit H., *Aminokwasy, peptydy, białka*, wyd. PWN, **1989**.

- [93] Fridkin M., Najjar V.A., *Tuftsins: its chemistry, biology, and clinical potential*, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., 24(1): 1, **1989**.
- [94] Verdini A., Silversti S., Becherucci C., Longobardi M.G., Parente L., Peppoloni S., Perretti M., Pileri P., Pinori M., Viscomi G., Nencioni L., *Immunostimulation by a partially modified retro-inverso-tuftsins analog containing Thr1.sum..psi [NHCO](R,S) Lys2modification*, J. Med. Chem., 34(12), 3372, **1991**.
- [95] Dzierzbicka K., Wardowska A., Myśliwski A., *Tuftsins - new analogues and properties*, Post. Biochem., 53(1), 61, **2007**.
- [96] Zhag S., Liu G., Xia S., Wu P., Zhang L., *Meshed-Bag Gathered-Bunch" method for solid-phase synthesis of small molecular diverse compounds*, J. Comb Chem., 4(2), 131, **2002**.
- [97] Stabinsky Y., Zakuth V., Fridkin M., Spirer Z., *Tuftsins and some analogs: synthesis interaction with human polymorphonuclear leukocytes*, Biochim. Biophys. Acta, 496(1), 203, **1977**.
- [98] Dzierzbicka K., *Synthesis of conjugates of Muramyl dipeptide and non-muramyl dipeptide with retro-tuftsins (Arg-Pro-Lys-ThrOMe)*, Pol. J. Chem., 78, 409, **2004**.
- [99] Wardowska A., Dzierzbicka K., Szaryński M., Dąbrowska-Szponard M., Wiśniewska K., Myśliwski A., Trzonkowski P., *Analogues of muramyl dipeptide (MDP) and tuftsins limit infection and inflammation in murine model of sepsis*, Vaccine, 27(3), 369, **2009**.
- [100] Mezo G., Kalaszi A., Remenyi J., Majer Z., Hilbert A., Lang O., Kohidai L., Barna K., *Synthesis, conformation, and immunoreactivity of new carrier molecules based on repeated tuftsins-like sequence*, Biopolymers, 73(6), 645, **2004**.
- [101] Wardowska A., Dzierzbicka K., Trzonkowski P., Myśliwski A., *Immunomodulatory properties of New conjugates of muramyl dipeptide and non-muramyl dipeptide with retro-tuftsins (Arg-Pro-Lys-Thr-OMe)*, Int. Immunopharmacol, 6(10), 1560, **2006**.
- [102] Kukowska-Kaszuba M., Dzierzbicka K., Maćkiewicz Z., *Synthesis of linear tuftsins analogues modified at ε-amino group of lysine*, Tetrahedron Lett., 49, 5716, **2008**.
- [103] Dzierzbicka K., Sowiński P., Kołodziejczyk A. M., *Synthesis of analogues of anthraquinones linked to tuftsins or retro-tuftsins residues as potential topoisomerase inhibitors*, J. Peptide Sci., 12(10), 670, **2006**.

- [104] Dzierzbicka K., Trzonkowski P., Sewerynek P., Kołodziejczyk A. M., Myśliwski A., *Synthesis and biological activity of tuftsin, its analogue and conjugates containing muramyl dipeptides or nor-muramyl dipeptides*, J. Peptide Sci., 11(3), 123, **2005**.
- [105] Dzierzbicka K., *Synthesis of new conjugates of MDP and nor-MDP with retro-tuftsin derivatives as potential immunomodulators*, Pol. J. Chem., 82, 1413, **2008**.
- [106] Dzierzbicka K., *Synthesis of conjugates of amino-combretastatin with tuftsin derivatives as potential anticancer agents*, Pol. J. Chem., 83, 81, **2009**.
- [107] Xu Y., Zhu J., Xiang K., Li Y., Sun R., Ma J., Sun H., Liu Y., *Synthesis and immunomodulatory activity of [60]fullerene-tuftsin conjugates*, Biomaterials, 32, 9940, **2011**.
- [108] Kukowska-Kaszuba M., Dzierzbicka K., Serocki M., Składanowski A., *Solid phase synthesis and biological activity of tuftsin conjugates*, J. Med. Chem., 54(7), 2447, **2011**.
- [109] Kolomin T., Shadrina M., Andreeva L., Slominsky P., Limborska S., Myasoedov N., *Expression of inflammation-related genes in mouse spleen under tuftsin analog Selank*, Regul. Pept., 170(1-3), 18, **2011**.
- [110] Kolomin T., Shadrina M., Andreeva L., Slominsky P., Limborska S., Myasoedov N., *The temporary dynamics of inflammation-related genes expression under tuftsin analog Selank action*, Mol. Immunol., 58(1), 50, **2013**.
- [111] Yuan W., Xia G., Zhao Ch., Sui Ch., Ma J., *Anti-idiotypic chain mimicking CA125 linked with tuftsin provides protective immunity against ovarian cancer in mice*, Mol. Med. Rep., 5(2), 388, **2011**.
- [112] Tripathi S.K., Goyal R., Kashyap M.P., Pant A.B., Haq W., Kumar P., Gupta K.C., *Depolymerized chitosans functionalized with bPEI as carriers of nucleic acids and tuftsin-tethered conjugate for macrophage targeting*, Biomaterials, 33(16), 4204, **2012**.
- [113] Shor D., Bashi T., Lachnish J., Fridkin M., *Phosphorylcholine-tuftsin compound prevents development of dextran sulfate-sodium salt induced murine colitis: implications for the treatment of human inflammatory bowel disease*, J. Autoimmun., 56, 111, **2014**.
- [114] Bashi T., Blank M., Shor D., Fridkin M., *Successful modulation of murine lupus nephritis with tuftsin-phosphorylcholine*, J. Autoimmun., 59, 1, **2015**.

- [115] An Y., Li L., Yang D., Jia N., Xu Ch., Wang O., Wang S., Yuan S., *Anticancer activity of tuftsin-derived T peptide postoperative residual tumors*, *Anticancer Drugs*, 25(8), 857, **2014**.
- [116] Go Y., Su Q., Yi Y., Jia Z., Wang H., Lu X., Qui F., Bi S., *Enhanced mucosal immune responses induced by a combined candidate mucosal vaccine based on Hepatitis A virus and Hepatitis E virus structural proteins linked to tuftsin*, *PloS ONE*, 10(4), **2015**.
- [117] Feng J., Meloni M.M., Allan S.M., Faulkner S., Narvainen J., Vidyasagar R., Kauppinen R., *Tuftsin derivatives of FITS, Tb-DOTA, or Gd-DOTA as potential macrophage-specific imaging biomarkers*, *Contrast Media Mol. Imaging*, 5, 223, **2010**.
- [118] Dutta T., Garg M., Jain N.K., *Targeting of efavirez loaded tuftsin conjugated poly(propyleneimine) dendrimers to HIV infected macrophages in vitro*, *Eur. J. Pharmaceut. Sci.*, 34, 181, **2008**.
- [119] Wei C.J., Li W., Chen J.F., *Normal and abnormal functions of adenosine receptors in the central nervous system revealed by genetic knockout studies*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1808(5), 1358, **2011**.
- [120] Cunha R.A., *Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors*, *Neurochem. Int.*, 38, 107, **2001**.
- [121] Gessi S., Varani K., Merighi S., Fogli E., Sacchetto V., Benini A., Leung E., MacLennan S., Borea P.A., *Adenosine and lymphocyte regulation*, *Purinergic. Signal.*, 3, 109, **2007**.
- [122] Kumar V., Sharma A., *Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential*, *Eur. J. Pharmacol.*, 616(1-3), 7, **2009**.
- [123] Drury A.N., Szent-Gyorgyi A., *The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart*, *J. Physiol.*, 68, 213, **1929**.
- [124] Fredholm B.B., Ijzerman A.P., Jacobson K.A., Klotz K.N., Linden J., *International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors*, *Pharmacol. Rev.*, 53, 527, **2001**.
- [125] Dhalla A.K., Shryock J.C., Shreenivas R., Belardinelli L., *Pharmacology and therapeutic applications of A1 adenosine receptor*, *Curr. Top. Med. Chem.*, 3, 369, **2003**.

- [126] Mantell S.J., Stephenson P.T., Monaghan S.M., Maw G.N., Trevethick M. A., Yeadon M., Walker D., Selby M., Batchelor D., Rozze S., Chavaroche H., Lemaitre A., Wright K., Whitlock L., Stuart E., *SAR of a series of inhaled A2A agonists and comparison of inhaled pharmacokinetics in a preclinical model with clinical pharmacokinetic data*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 19(15), 4471, **2009**.
- [127] Fredholm B.B., Arslan G., Halldner L., Kull B., Schulte G., Wasserman W., *Structure and function of adenosine receptors and their genes*, N-S Arch. Pharmacol., 362, 364, **2000**.
- [128] Piirainen H., Ashok Y., Nanekar R.T., Jaakola V.P., *Structural features of adenosine receptors: From crystal to function*, BBA-Biomembranes, 1808(5), 1233, **2011**.
- [129] Fredholm B.B., *Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair*, Cell Death Differ., 14, 1315, 2007.
- [130] Gomez G, Sitkovsky M.V., *Differential requirement for A2a and A3 adenosine receptors for the protective effect of inosine in vivo*, Blood, 102, 4472, **2003**.
- [131] Daly J.W., Bruns R.F., Snyder S.H., *Adenosine receptors in the central nervous-system - relationship to the central actions of methylxanthines*, Life Sciences, 28, 2083, **1981**.
- [132] Hasko G., Cronstein B.N., *Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity*, Trends Immunol., 25, 33, **2004**.
- [133] Porkka-Heiskanen T., Kalinchuk A.V., *Adenosine, energy metabolism and sleep homeostasis*, Sleep Med. Rev., 15, 123, **2011**.
- [134] Gorlach A., *Control of adenosine transport by hypoxia*, Circulation Res., 97, 1, **2005**.
- [135] Souza V., Schlemmer K.B., Noal C.B., Jaques J., Zimmermann C.E.P., Leal C.A.M., Fleck J., Casali E.A., Morsch V.M., Schetinger M.R.C., Leal D.B.R., *E-ntpdase and E-ADA activities are altered in lymphocytes of patients with indeterminate form of Chagas' disease*, Parasitol. Int., 61, 690, **2012**.
- [136] Rucker B., Almeida M.E., Libermann T.A., Zerbini L.F., Wink M.R., Sarkis J.J.F., *E-ntpdases and ecto-5'-nucleotidase expression profile in rat heart left ventricle and the extracellular nucleotide hydrolysis by their nerve terminal endings*, Life Sciences, 82, 477, **2008**.

- [137] Linden J., *Molecular approach to adenosine receptors: Receptor-mediated mechanisms of tissue protection*. *Annu, Rev. Pharmacol. Toxicol.*, *41*, 775, **2001**.
- [138] Fleischmannova J., Kucerova L., Sandova K., Steinbauerova V., Broz V., Simek P., Zurovec M., *Differential response of Drosophila cell lines to extracellular adenosine*, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, *42*, 321, **2012**.
- [139] Podgorska M., Kocbuch K., Pawelczyk T., *Recent advances in studies on biochemical and structural properties of equilibrative and concentrative nucleoside transporters*, *Acta Biochim. Pol.*, *52*, 749, **2005**.
- [140] Leung G.P.H., Ward J.L., Wong P.Y.D., Tse C.M., *Characterization of nucleoside transport systems in cultured rat epididymal epithelium*, *Am. J Physiol.-Cell Physiology*, *280*, C1076, **2001**.
- [141] Baldwin S.A., Yao S.Y.M., Hyde R.J., Ng A.M.L., Foppolo S., Barnes K., Ritzel M.W.L., Cass C.E., Young J.D., *Functional characterization of novel human and mouse equilibrative nucleoside transporters (hENT3 and mENT3) located in intracellular membranes*, *J. Biol. Chem.*, *280*, 15880, **2005**.
- [142] Young J.D., Yao S.Y.M., Sun L., Cass C.E., Baldwin S.A., *Human equilibrative nucleoside transporter (ENT) family of nucleoside and nucleobase transporter proteins*, *Xenobiotica*, *38*, 995, **2008**.
- [143] Kang N., Jun A.H., Bhutia Y.D., Kannan N., Unadkat J.D., Govindarajan R., *Equilibrative nucleoside transporter-3 (hENT3) spectrum disorder mutations impair nucleoside transport, protein localization, and stability*, *J. Biol. Chem.*, *285*, 28343, **2010**.
- [144] Wang C., Pimple S., Buolamwini J.K., *Interaction of benzopyranone derivatives and related compounds with human concentrative nucleoside transporters 1, 2 and 3 heterologously expressed in porcine PK15 nucleoside transporter deficient cells. Structure-activity relationships and determinants of transporter affinity and selectivity*, *Biochem. Pharmacol.*, *79*, 307, **2010**.
- [145] Nagai K., Nagasawa K., Fujimoto S., *Transport mechanisms for adenosine and uridine in primary-cultured rat cortical neurons and astrocytes*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, *334*, 1343, **2005**.
- [146] Hiratochi M., Tatani K., Shimizu K., Kuramochi Y., Kikuchi N., Kamada N., Itoh F., Isaji M., *Hypouricemic effects of novel concentrative nucleoside transporter 2*

- inhibitors through suppressing intestinal absorption of purine nucleosides*, Eur. J. Pharmacol., 690, 183, **2012**.
- [147] Govindarajan R., Bakken A.H., Hudkins K.L., Lai Y., Casado F.J., Pastor-Anglada M., Tse C.M., Hayashi J., Unadkat J.D., *In situ hybridization and immunolocalization of concentrative and equilibrative nucleoside transporters in the human intestine, liver, kidneys, and placenta*, Am. J. Physiol.-Regulatory Integrative and Comparative Physiology, 293, R1809, **2007**.
- [148] Mueller C.E., Jacobson K.A., *Recent developments in adenosine receptor ligands and their potential as novel drugs*, BBA-Biomembranes, 1808, 1290, **2011**.
- [149] Savelieva I., Camm J., *Anti-arrhythmic drug therapy for atrial fibrillation: current anti-arrhythmic drugs, investigational agents, and innovative approaches*, Europace, 10, 647, **2008**.
- [150] Ellenbogen K.A., O'Neill G., Prystowsky E.N., Camm J.A., Meng L., Lieu H.D., Jerling M., Shreenivas R., Belardinelli L., Wolff A.A., *Trial to evaluate the management of paroxysmal supraventricular tachycardia during an electrophysiology study with tecadenoson*, Circulation, 111, 3202, **2005**.
- [151] Staehr P.M., Dhalla A.K., Zack J., Wang X., Ho Y.L., Bingham J., Belardinelli L., *Reduction of free fatty acids, safety, and pharmacokinetics of oral gs-9667, an A1 adenosine receptor partial agonist*, J. Clin. Pharmacol., 53, 385, **2013**.
- [152] Moore C.C., Martin E.N., Lee G.H., Obrig T., Linden J., Scheld W.M., *An A2A adenosine receptor agonist, ATL313, reduces inflammation and improves survival in murine sepsis models*, BMC Infect. Dis., 8, 141, **2008**.
- [153] Sullivan GW. *Adenosine A2A receptor agonists as anti-inflammatory agents*. Curr. Opin. Investig. Drugs., 4, 1313, **2003**.
- [154] Luijk B., van den Berge M., Kerstjens H.A., Postma D.S., Cass L., Sabin A., Lammers J.W., *Effect of an inhaled adenosine A2A agonist on the allergen-induced late asthmatic response*, Allergy, 63, 75, **2008**.
- [155] Al Jaroudi W., Iskandrian A.E., *Regadenoson: a new myocardial stress agent*, J. Am. Coll. Cardiol., 54, 1123, **2009**.
- [156] Udelson J.E., Iteld B.J., Weiland F.L., Foster J.B., Bonow R.O., Ficaro E.P., Gibbons R., Heller G.V., Wackers F.J.T., Barrett R.J., Pixton G.C., *15.27: Double-blinded comparison of the side effects associated with pharmacologic stress induced with binodenoson and adenosine*, J. Nucl. Cardiol., 15, S17, **2008**.

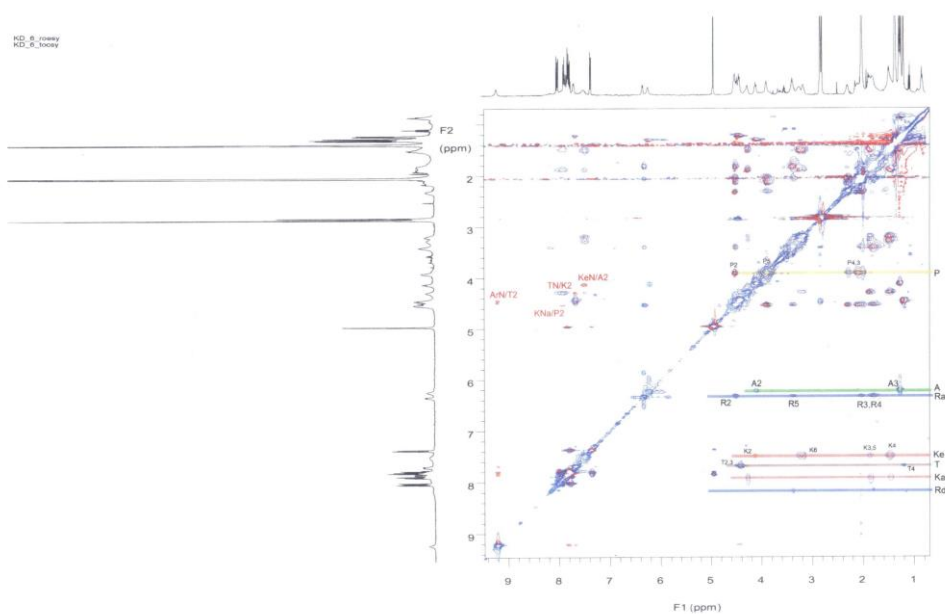
- [157] Zoghbi G.J., Iskandrian A.E., *Selective adenosine agonists and myocardial perfusion imaging*, J. Nucl. Cardiol, 19, 126, **2012**.
- [158] Eltzschig H.K., Bonney S.K., Eckle T., *Attenuating myocardial ischemia by targeting A2B adenosine receptors*, Trends Mol. Med, 19(6), 345, **2013**.
- [159] Aherne C.M., Kewley E.M., Eltzschig H.K., *The resurgence of A2B adenosine receptor signaling*, Biochim. Biophys. Acta, 1808, 1329, **2011**.
- [160] Baraldi P.G., Tabrizi M.A., Fruttarolo F., Romagnoli R., Preti D., *Recent improvements in the development of A(2B) adenosine receptor agonists*, Purinergic Signal., 5, 3, **2009**.
- [161] Sun C.X., Zhong H., Mohsenin A., Morschl E., Chunn J.L., Molina J.G., Belardinelli L., Zeng D., Blackburn M.R., *Role of A2B adenosine receptor signaling in adenosine-dependent pulmonary inflammation and injury*, J. Clin. Invest., 116, 2173, **2006**.
- [162] Zhou Y., Schneider D.J., Blackburn M.R., *Adenosine signaling and the regulation of chronic lung disease*, Pharmacol. Ther., 123, 105, **2009**.
- [163] Dubey R.K., Gillespie D.G., Mi Z., Jackson E.K., *Adenosine inhibits PDGF-induced growth of human glomerular mesangial cells via A(2B) receptors*, Hypertension, 46, 628, **2005**.
- [164] Tostes R.C., Giachini F.R., Carneiro F.S., Leite R., Inscho E.W., Webb R.C., *Determination of adenosine effects and adenosine receptors in murine corpus cavernosum*, J. Pharmacol. Exp. Ther., 322, 678, **2007**.
- [165] Iino M., Ehama R., Nakazawa Y., Iwabuchi T., Ogo M., Tajima M., Arase S., *Adenosine stimulates fibroblast growth factor-7 gene expression via adenosine A2b receptor signaling in dermal papilla cells*, J. Invest. Dermatol., 127, 1318, **2007**.
- [166] Chandrasekharan B.P., Kolachala V.L., Dalmaso G., Merlin D., Ravid K., Sitaraman S.V., Srinivasan S., *Adenosine 2B receptors (A(2B)AR) on enteric neurons regulate murine distal colonic motility*, FASEB, 23, 2727, **2009**.
- [167] Ochaion A., Bar-Yehuda S., Cohen S., Barer F., Patoka R., Amital H., Reitblat T., Reitblat A., Ophir J., Konfino I., Chowers Y., Ben-Horin S., Fishman P., *The anti-inflammatory target A(3) adenosine receptor is over-expressed in rheumatoid arthritis, psoriasis and Crohn's disease*, Cell. Immunol., 258, 115, **2009**.
- [168] David M., Akerman L., Ziv M., Kadurina M., Gospodinov D., Pavlotsky F., Yankova R., Kouzeva V., Ramon M., Silverman M.H., Fishman P., *Treatment of*

- plaque-type psoriasis with oral CF101: data from an exploratory randomized phase 2 clinical trial*, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 26, 361, **2012**.
- [169] Stemmer S.M., Benjaminov O., Medalia G., Ciuraru N.B., Silverman M.H., Bar-Yehuda S., Fishman S., Harpaz Z., Farbstein M., Cohen S., Patoka R., Singer B., Kerns W.D., Fishman P., *CF102 for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma: A Phase I/II, Open-Label, Dose-Escalation Study*, *Oncologist*, 18, 25, **2013**.
- [170] Bar-Yehuda S., Stemmer S.M., Madi L., Castel D., Ochaion A., Cohen S., Barer F., Zabutti A., Perez-Liz G., Del Valle L., Fishman P., *The A3 adenosine receptor agonist CF102 induces apoptosis of hepatocellular carcinoma via de-regulation of the Wnt and NF-kappab signal transduction pathways*, *Int. J. Oncol.*, 33, 287, **2008**.
- [171] Jacobson K.A., Xie R., Young L., Chang L., Liang B.T., *A novel pharmacological approach to treating cardiac ischemia, Binary conjugates of A1 and A3 adenosine receptor agonists*, *J. Biol Chem.*, 275(39), 30272, **2000**.
- [172] Räägel H., Lust M., Uri A., Pooga M., *Adenosine-oligoarginine conjugate, a novel bisubstrate inhibitor, effectively dissociates the actin cytoskeleton*, *FEBS J.*, 275, 3608, **2008**.
- [173] Mathew S.C., Ghosh N., By Y., Berthault A., Virolleaud M.A., Carrega L., Chouraqui G., Commeiras L., Condo J., Attolini M., Gaudel-Siri A., Ruf J., Parrain J.L., Rodriguez J., Guieu R., *Design, synthesis and biological evaluation of a bivalent micro opiate and adenosine A1 receptor antagonist*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19, 6736, **2009**.
- [174] Bednarska K., Olejniczak A.B., Piskala A., Klink M., Sulowska Z., Lesnikowski Z.J., *Effect of adenosine modified with a boron cluster pharmacophore on reactive oxygen species production by human neutrophils*, *Bioorg. Med. Chem.*, 20, 6621, **2012**.
- [175] Hwu J.R., Lin S.Y., Tsay S.C., De Clercq E., Leyssen P., Neyts J., *Coumarin-purine ribofuranoside conjugates as new agents against hepatitis C virus*, *J. Med. Chem.*, 54, 2114, **2011**.
- [176] Samsel M., Dzierzbicka K., Trzonkowski P., *Synthesis and antiproliferative activity of conjugates of adenosine with muramyl dipeptide and nor-muramyl dipeptide derivative*, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 24, 3587, **2014**.
- [177] Shang L., Wang Y., Qing J., Shu B., Cao L., Lou Z., Gong P., Sun Y., Yin Z., *An adenosine nucleoside NITD008 inhibits EV71 proliferation*, *Antiviral Research*, 112, 47, **2014**.

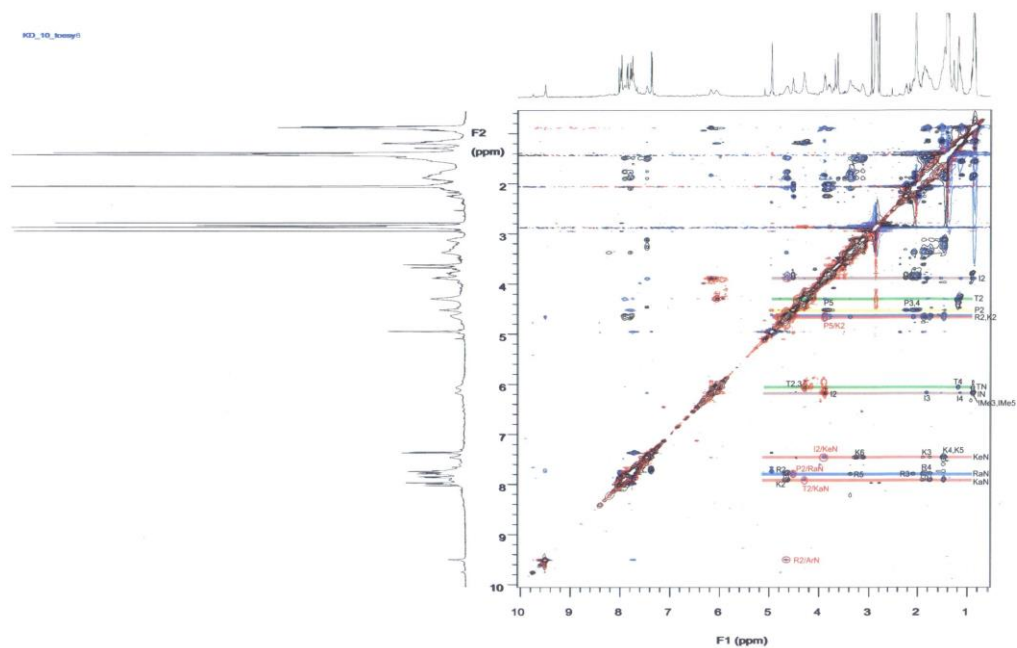
- [178] Liu P., Zhao L., Xu X., Liu F., Zhang W., Zhou Ch., Chen J., N6-Substituted adenosine analogues, a novel class of JAK2 inhibitors, potently block STAT3 signaling in human cancer cells, *Cancer Lett.*, 354, 43, **2014**.
- [179] Wei W., Shi W., Wang P., Zeng X., Li P., Zhang J., Li Q., *Adenosine analogs as inhibitors of tyrosyl-tRNA synthetase: Design, synthesis and antibacterial evaluation*, *Bioorg. Med. Chem.*, 23, 3, **2015**.
- [180] Petrelli R., Torquati I., Kachler S., Luongo L., Maione S., Franchetti P., *5'-C-Ethyl-tetrazolyl-N⁶-substituted adenosine and 2-chloro-adenosine derivatives as highly potent dual acting A₁ adenosine receptor agonist and A₃ adenosine receptor antagonist*, *J. Med. Chem.*, 58(5), 2560, **2015**.
- [181] Biedermann R., Romer H., *Chem. Ber.*, 7, **1874**.
- [182] Moroder L., Hallett A., Wunsch E., Keller O., Wersin G., *Di-tert.-butyl dicarbonate, a useful tert. butyloxycarbonylating reagent*, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 357, 1651, **1976**.
- [183] Isidro-Llobet A., Alvarez M., Albericio F., *Amino acid-protecting groups*, *Chem. Rev.*, 109, 2455, **2009**.
- [184] Goodman M., Toniolo C., Moroder L., Felix A., *Methods in Organic Chemistry, Volume E22, - Synthesis of Peptides and Peptidomimetics, Volumes 1-5 (Workbench Edition)* wyd. Thieme Medical Publishers Inc.: Stuttgart and New York, **2004**.
- [185] Dzierzbicka K., Kołodziejczyk A. M., *Synthesis of modified tuftsin containing MDP or nor-MDP*, XVI Polish Peptide Symposium, Kraków-Przegorzały, Programme and Abstracts, P48, **2001**.
- [186] Lundt B. F., Johansen L. N., Volund A., Markussen J., *Removal of t-butyl and t-butoxycarbonyl protecting groups with trifluoroacetic acid*, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 12(5), 258, **1978**.
- [187] Johnstone R. A., Wilby A. H., *Heterogeneous catalytic transfer hydrogenation and its relation to other methods for reduction of organic compounds*, *Chem. Rev.*, 85, 129, **1985**.
- [188] Khan A.K., Phopase J., Jordis U., *Surprise in lithium hydroxide of a NXO-compound*, 13th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry, **2009**.

- [189] Hiebel J., Alberts D. B., Banyard A. F., *Large-scale synthesis of hemoregulatory nonapeptide SK&F 107647 by fragment coupling*, J. Pept. Res., 54(1), 54, **1999**.
- [190] Dunetz J. R., Xiang Y., Baldwin A., Ringling J., *General and scalable amide bond formation with epimerization-prone substrates using T3P and pyridine*, Org. Lett., 13(19), 5048, **2011**.
- [191] Hanessian S., Margarita R., *1,3-Asymmetric induction in dianionic allylation reactions of amino acid derivatives-synthesis of functionally useful enantiopure glutamates, pipecolates and pyroglutamates*, Tetrahedron Lett., 39, 5887, **1998**.
- [192] Weyermann J., Lochmann D., Zimmer A., *A practical note on the use of cytotoxicity assays*, Int. J. of Pharm., 288 (2), 369, **2005**.
- [193] Dzitko K., Dudzinska D., Grzybowski M., Długonska H., *The utility of MTT and XTT colorimetric tests in the studies conducted in vitro with Toxoplasma gondii tachyzoites*, Wiadomosci parazytologiczne, 56, 145, **2010**.
- [194] Duque A., Rakic P., *Different Effects of Bromodeoxyuridine and H-3 Thymidine Incorporation into DNA on Cell Proliferation, Position, and Fate*, J. of Neurosci., 31, 15205, **2011**.
- [195] Stockert J.C., Blazquez-Castro A., Canete M., Horobin R.W., Villanueva A., *MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets*, Acta Histochem., 114, 785, **2012**.
- [196] Berridge M.V., Herst P.M., Tan A.S., *Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction*, Biotechnol. Annu. Rev., 11, 127, **2005**.
- [197] Arendt A., Kołodziejczyk A.M., Sokołowska T., *Ćwiczenia laboratoryjne z chemii organicznej*, Wyd. Politechniki Gdańskiej, Gdańsk, **1980**.
- [198] Keller O., Keller W.E., Von Look G., Wesin G., *t-Butoxycarbonylation of amino acids and their derivatives: N-tert-butoxycarbonyl-L-phenylalanine*, Org. Synth., 63, 160, **1985**.
- [199] Mezo G., Szekerke M., Sarmay G., Gergely J., *Synthesis and functional Syudies of tuftsin analogs containing isopeptide bond*, Peptides, 11, 405, **1990**.
- [200] Casati S., Manzocchi A., Ottria R., Ciuffreda P., *¹H, ¹³C and ¹⁵N NMR spectral assignments of adenosine derivatives with different amino substituents at C⁶-position*, Magn. Reson. Chem. Lett., 49, 279, **2011**.

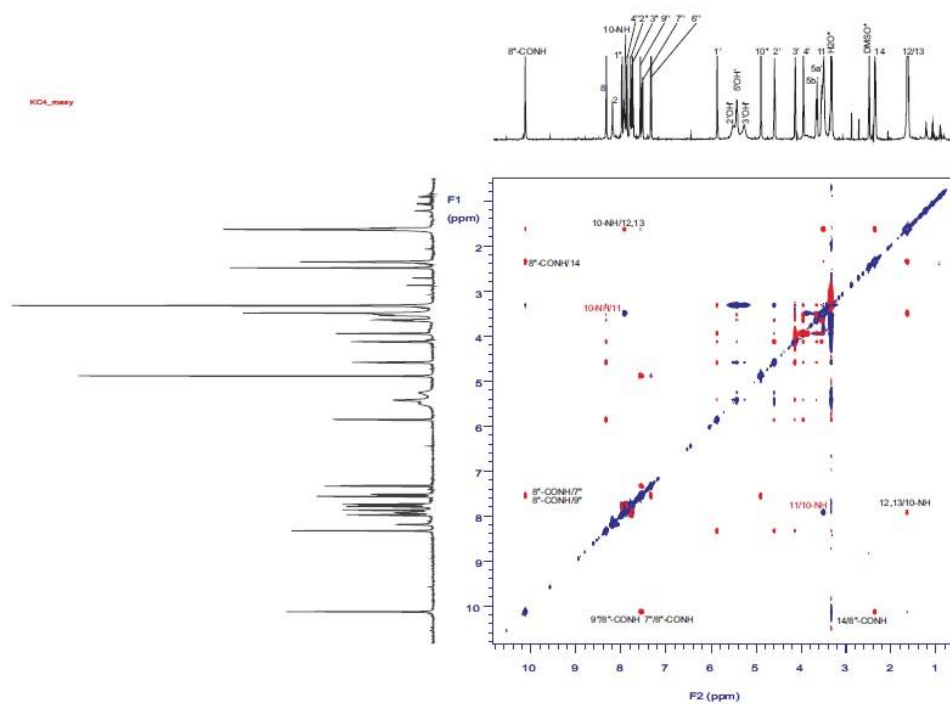
Załącznik 1. Widmo 2D ^1H NMR TOCSY i ROESY związku 173f



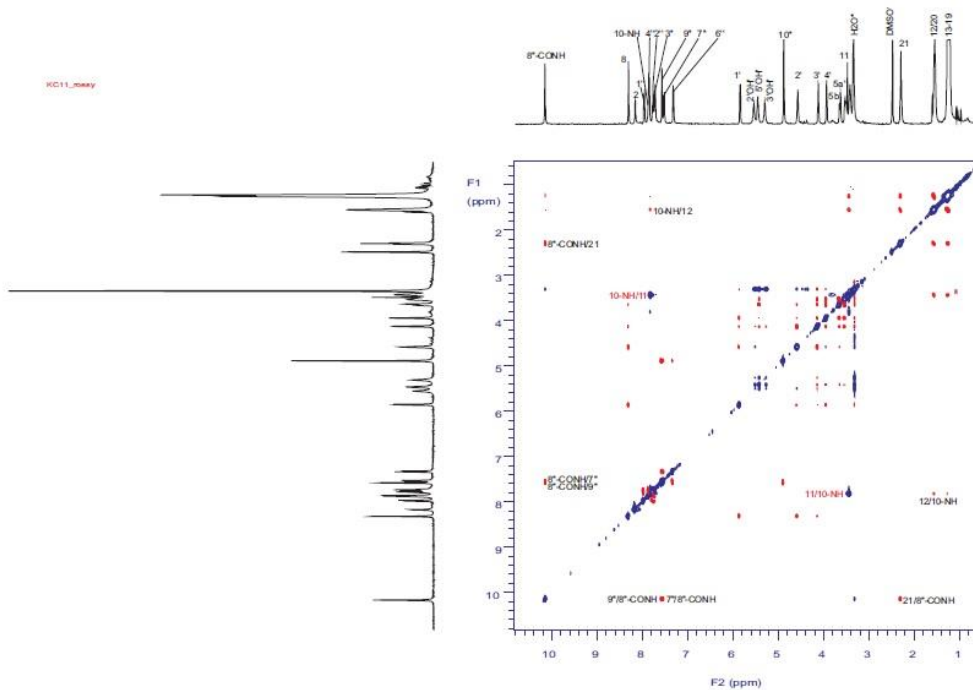
Załącznik 2. Widmo 2D ^1H NMR TOCSY i ROESY związku 173i



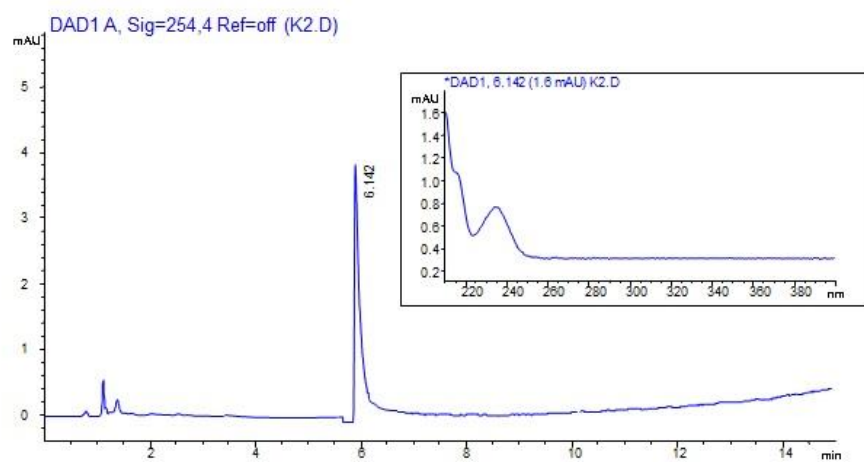
Załącznik 3. Widmo 2D ^1H NMR g-COESY i ROESY związku 175d



Załącznik 4. Widmo 2D ^1H NMR g-COESY i ROESY związku 175h

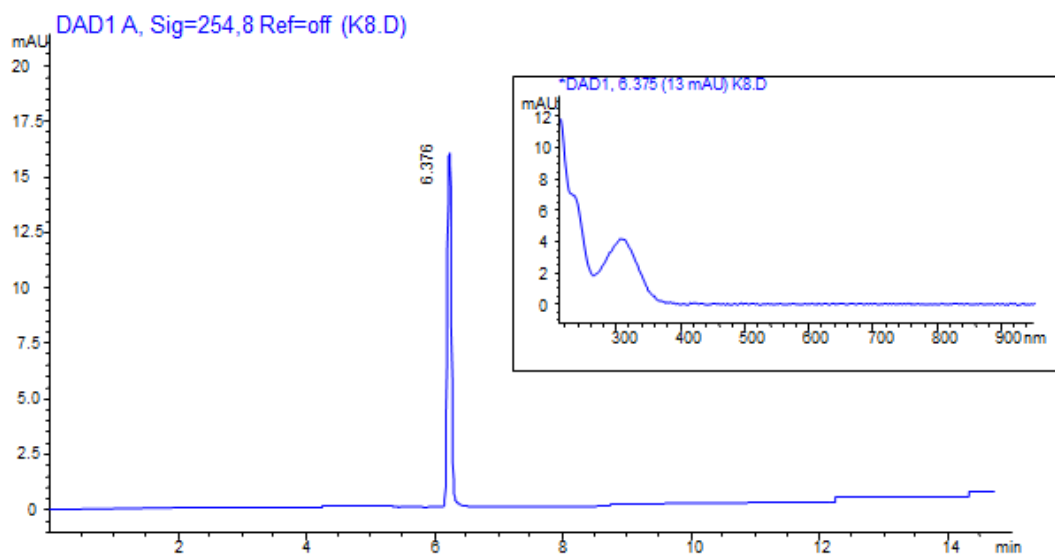


Załącznik 5. Chromatogram związku 173a



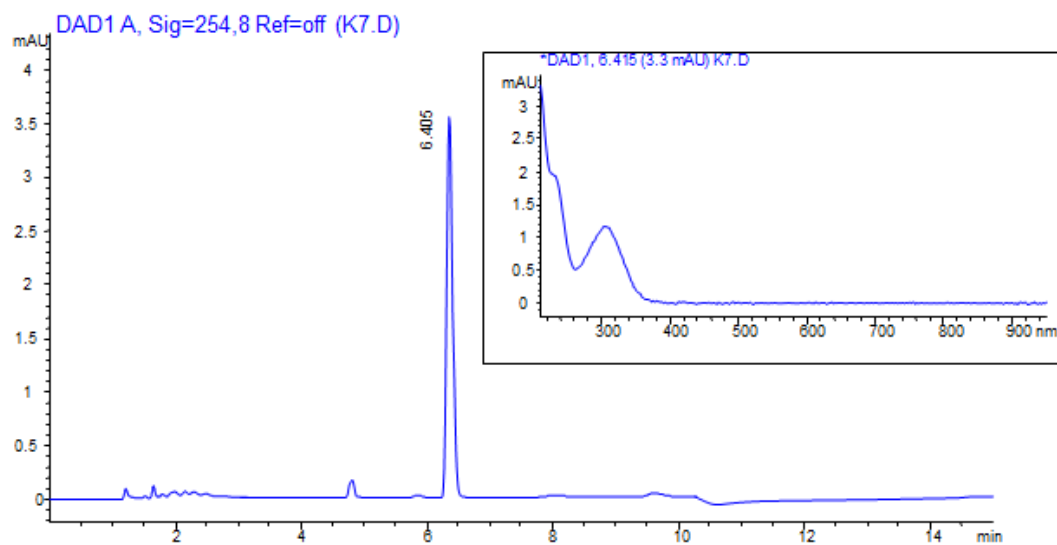
92.45%

Załącznik 6. Chromatogram związku 173b



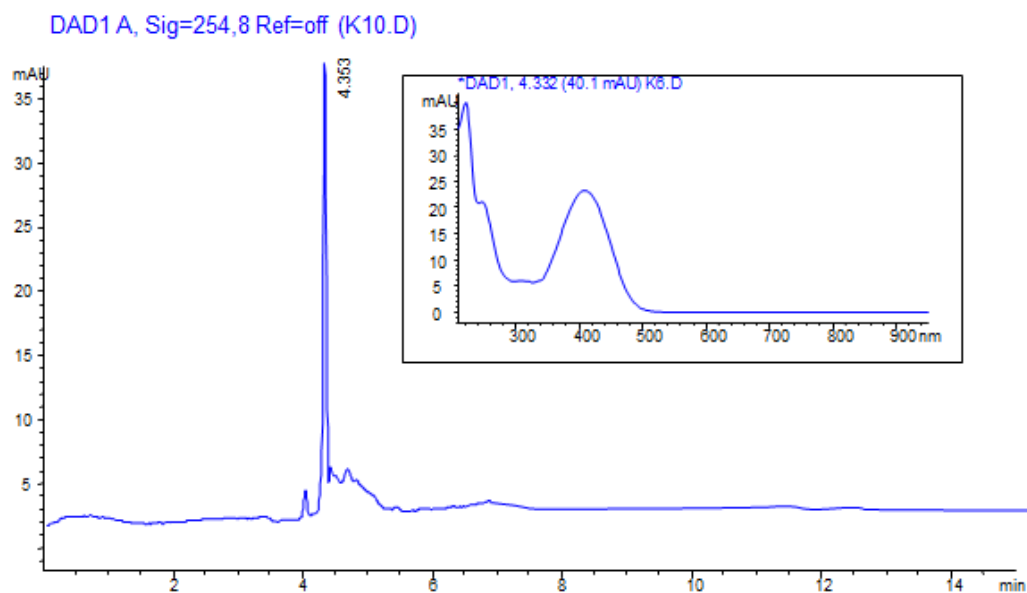
98.87%

Załącznik 7. Chromatogram związku 173d



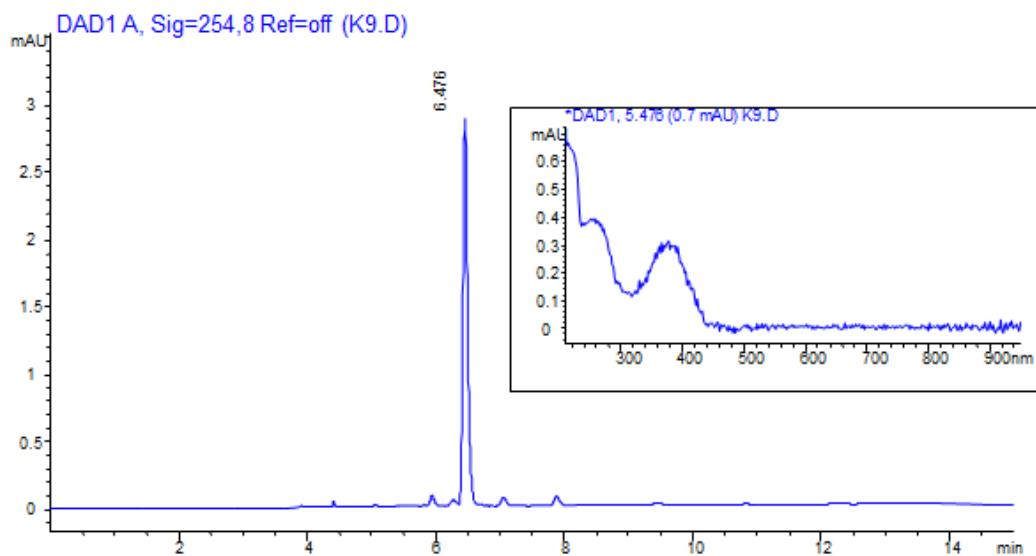
93.72%

Załącznik 8. Chromatogram związku 173e



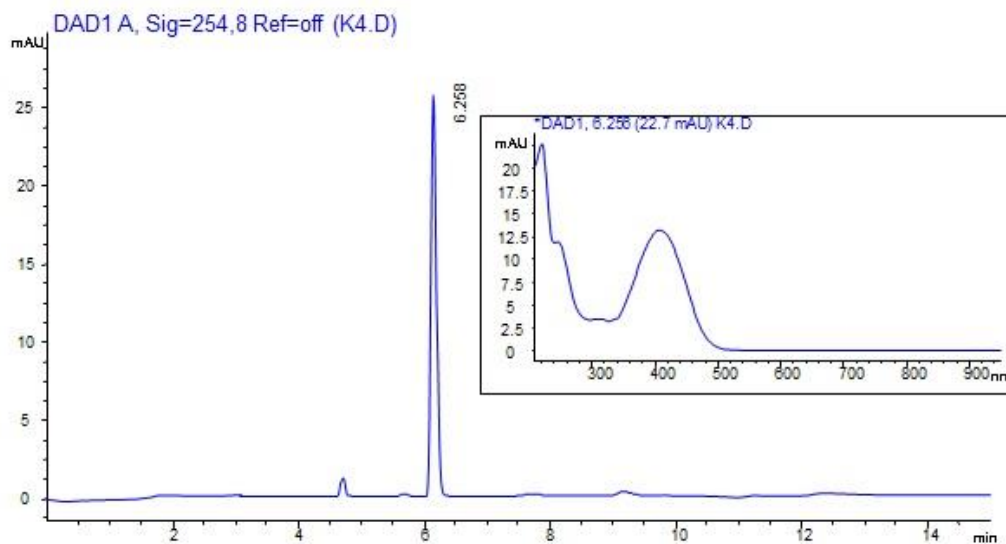
90.58%

Załącznik 9. Chromatogram związku 173f



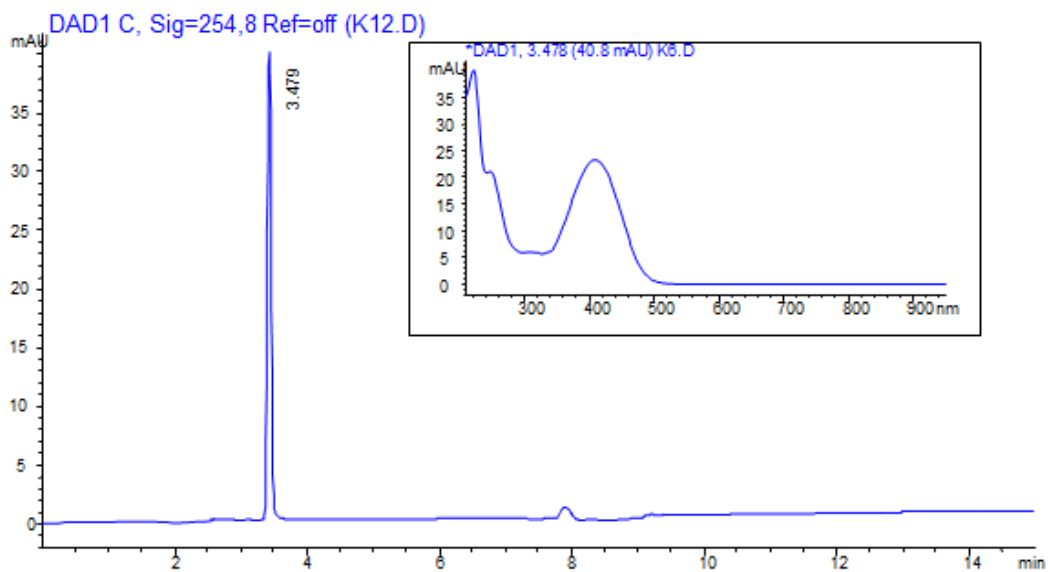
95.67%

Załącznik 10. Chromatogram związku 173g



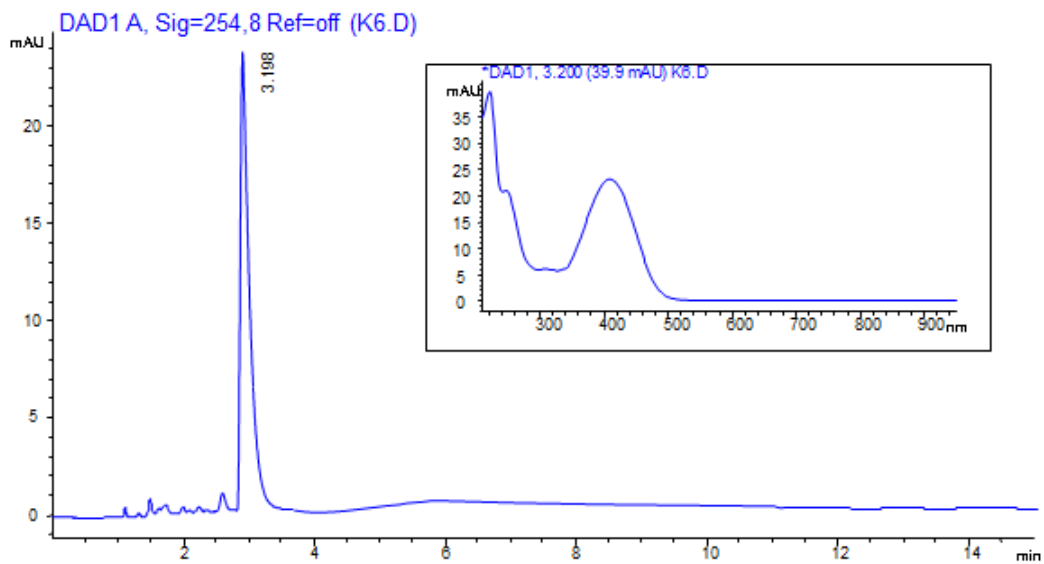
97.03%

Załącznik 11. Chromatogram związku 173h



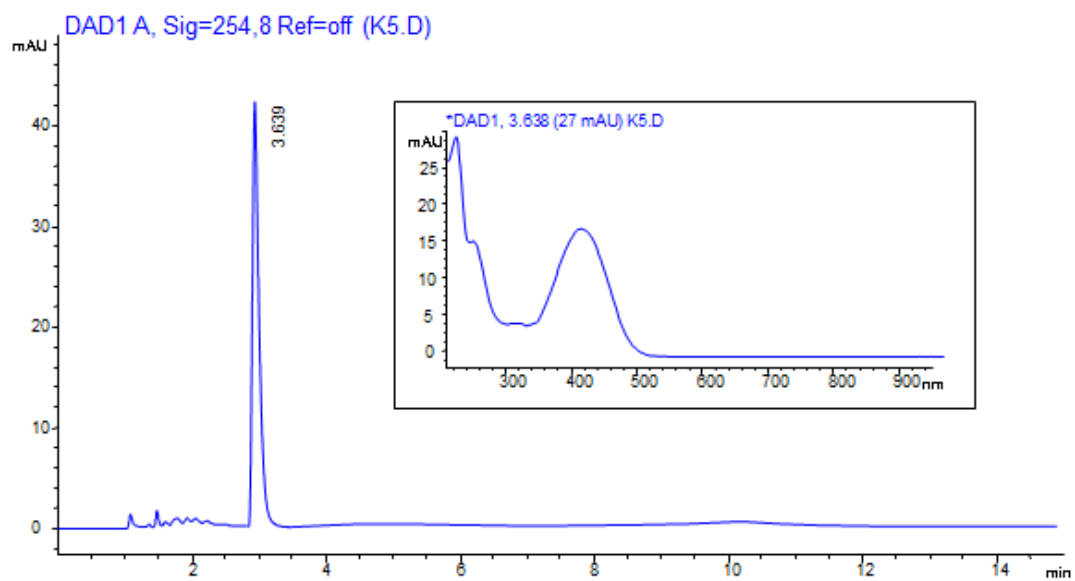
98.04%

Załącznik 12. Chromatogram związku 173i



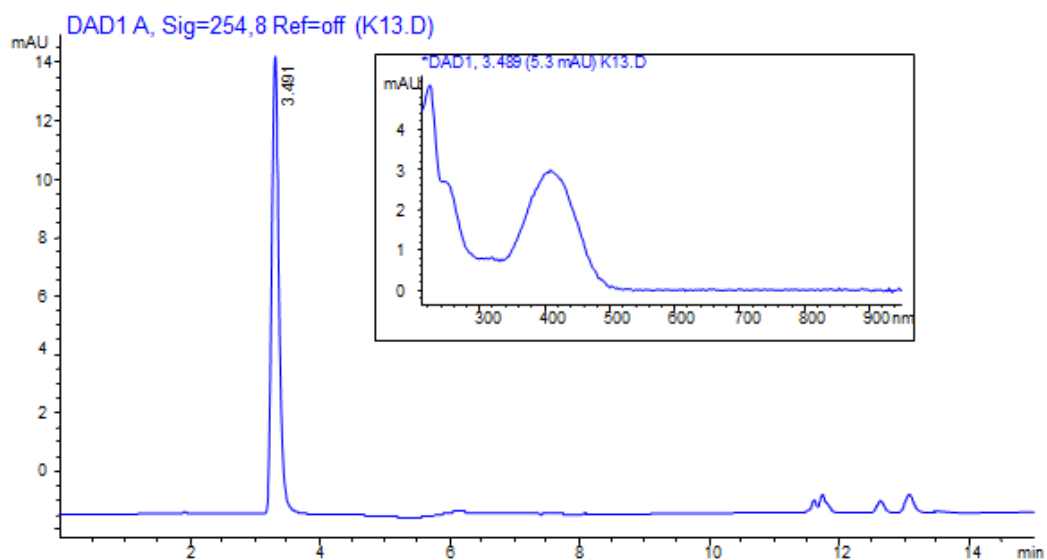
96.48%

Załącznik 13. Chromatogram związku 173k



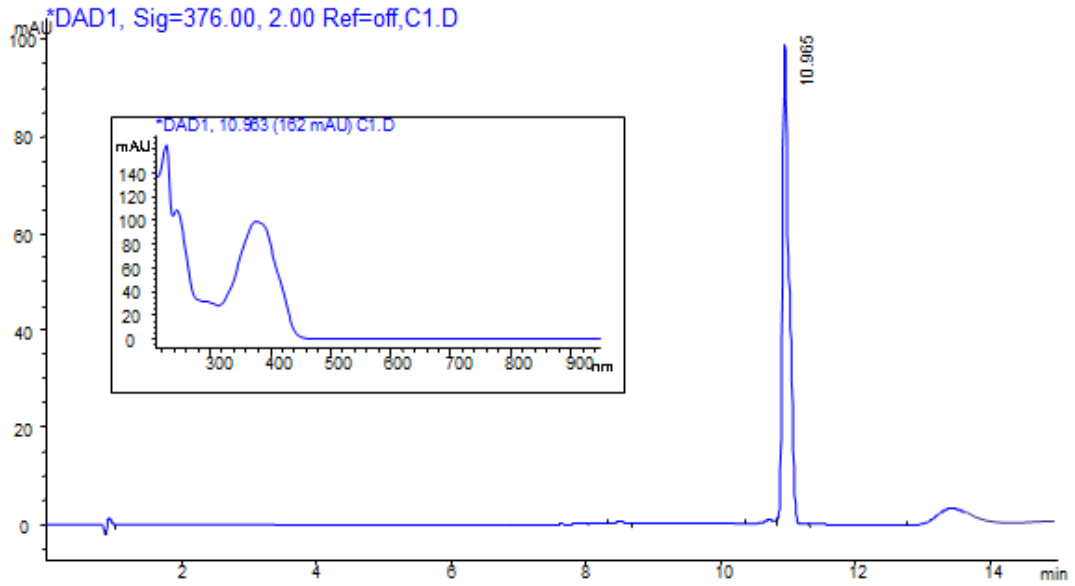
96.89%

Załącznik 14. Chromatogram związku 173l



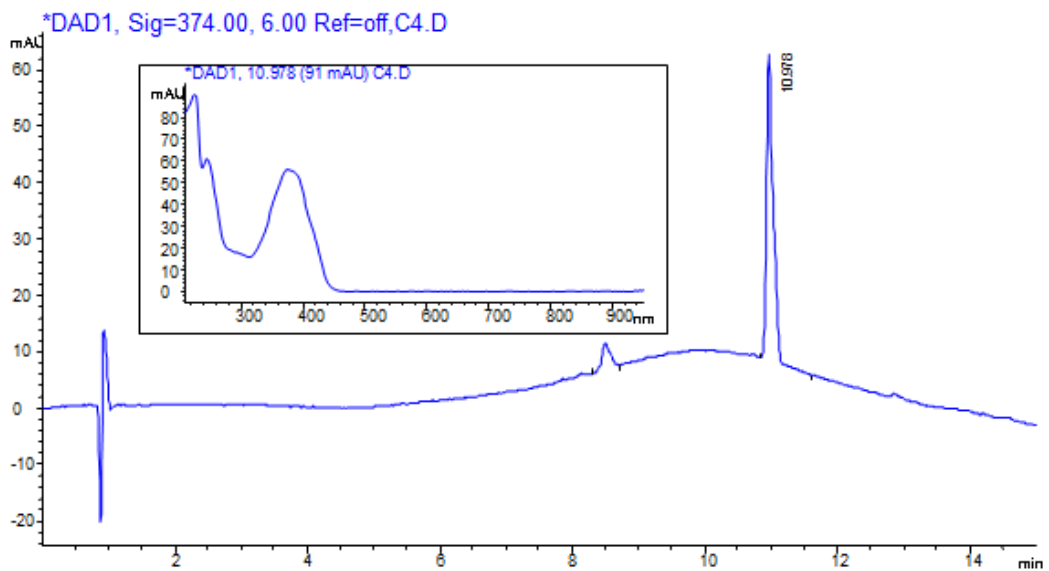
95.77%

Załącznik 15. Chromatogram związku 174a



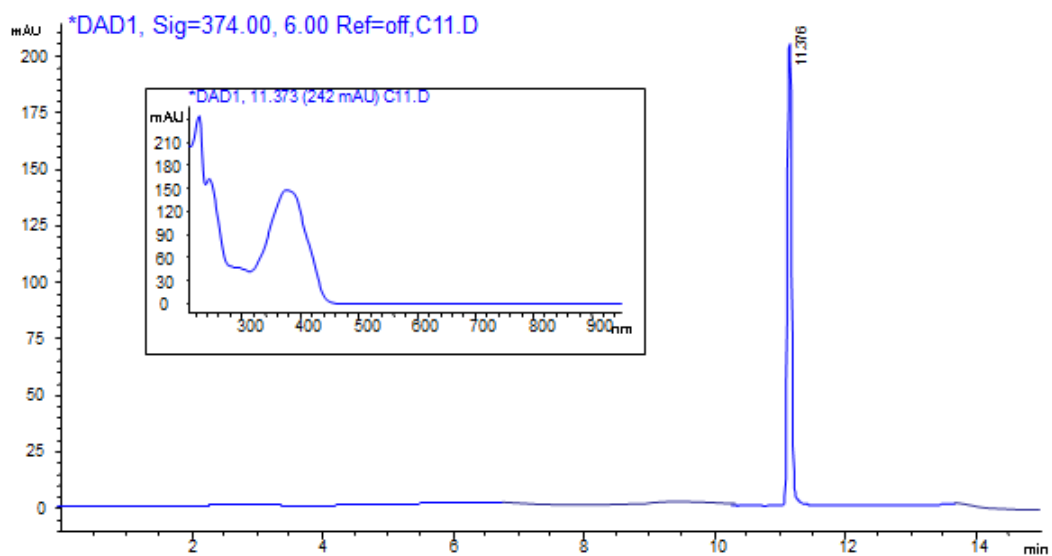
97.92%

Załącznik 16. Chromatogram związku 174d



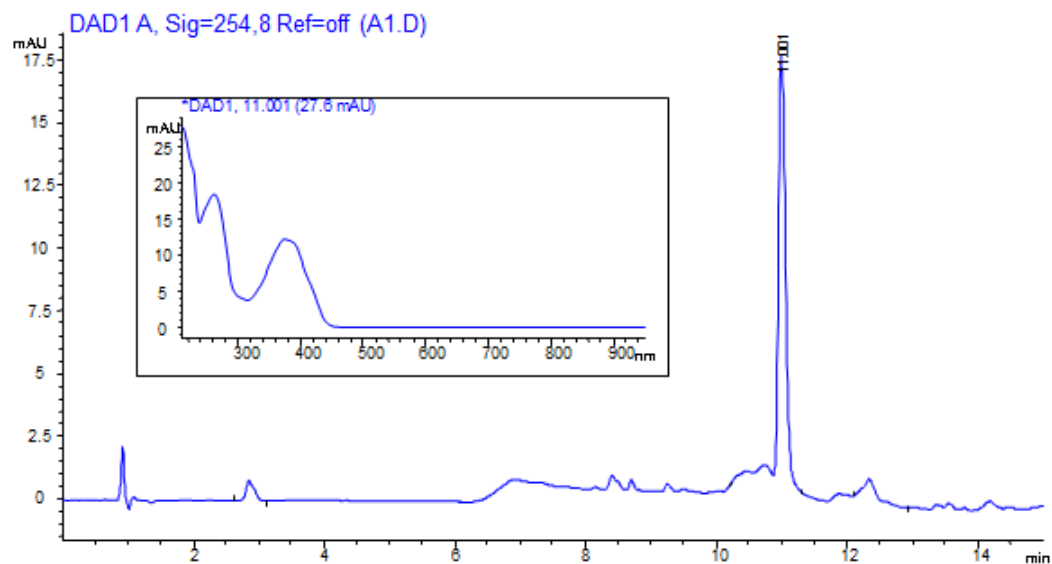
95.74%

Załącznik 17. Chromatogram związku 174h



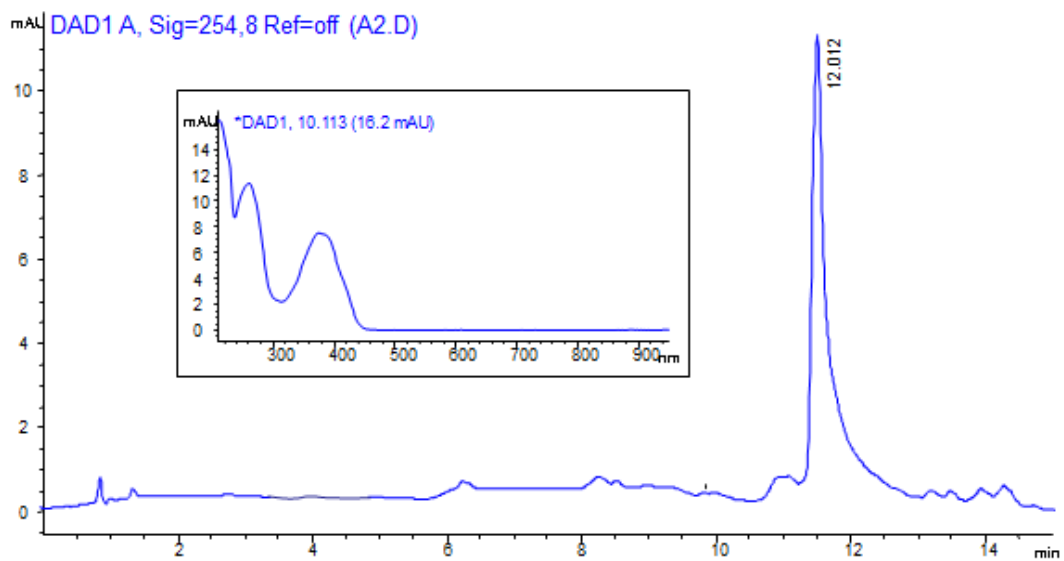
99.94%

Załącznik 18. Chromatogram związku 175a



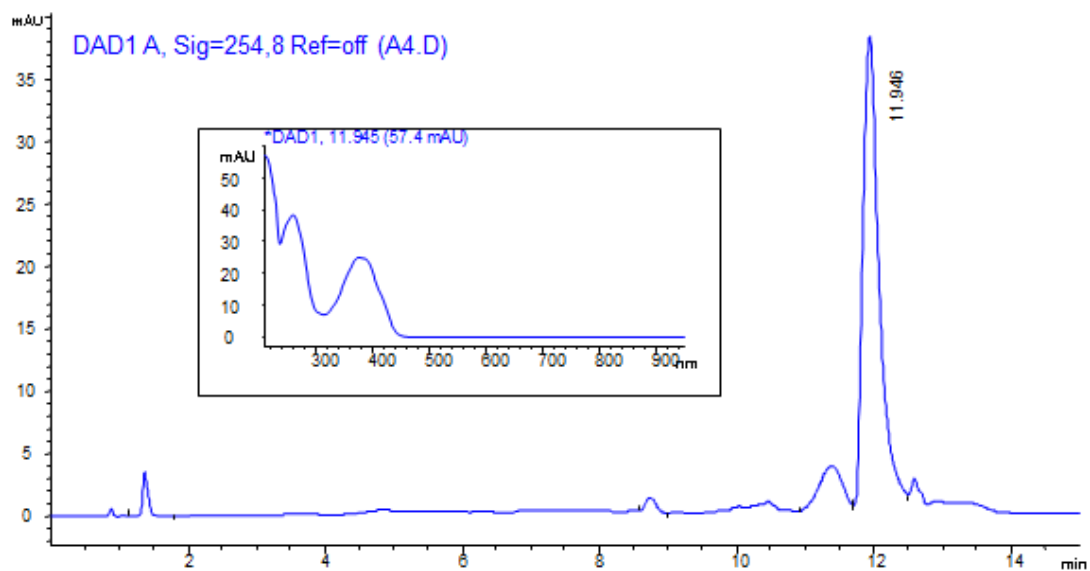
93.34%

Załącznik 19. Chromatogram związku 175b



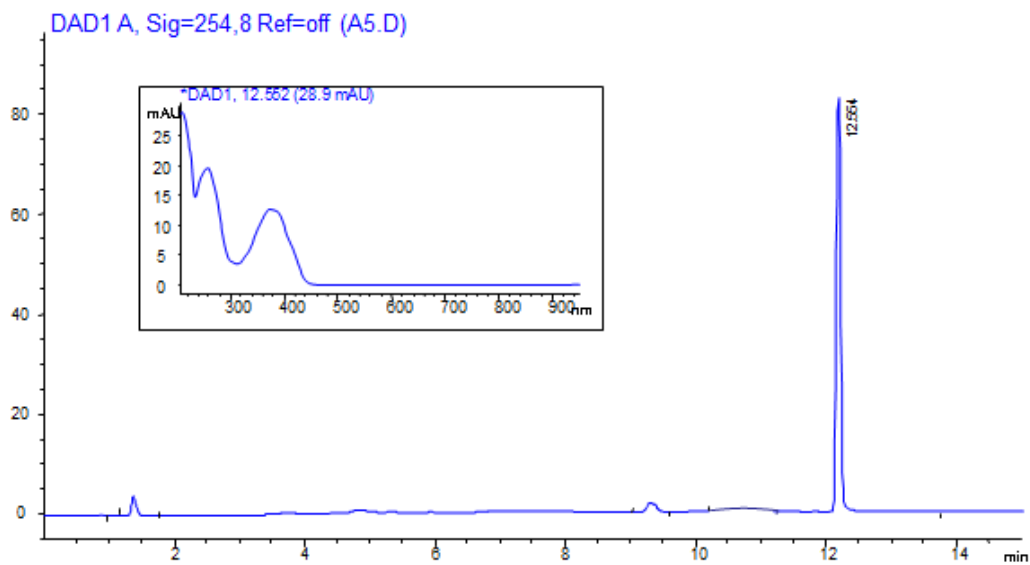
93.35%

Załącznik 20. Chromatogram związku 175d



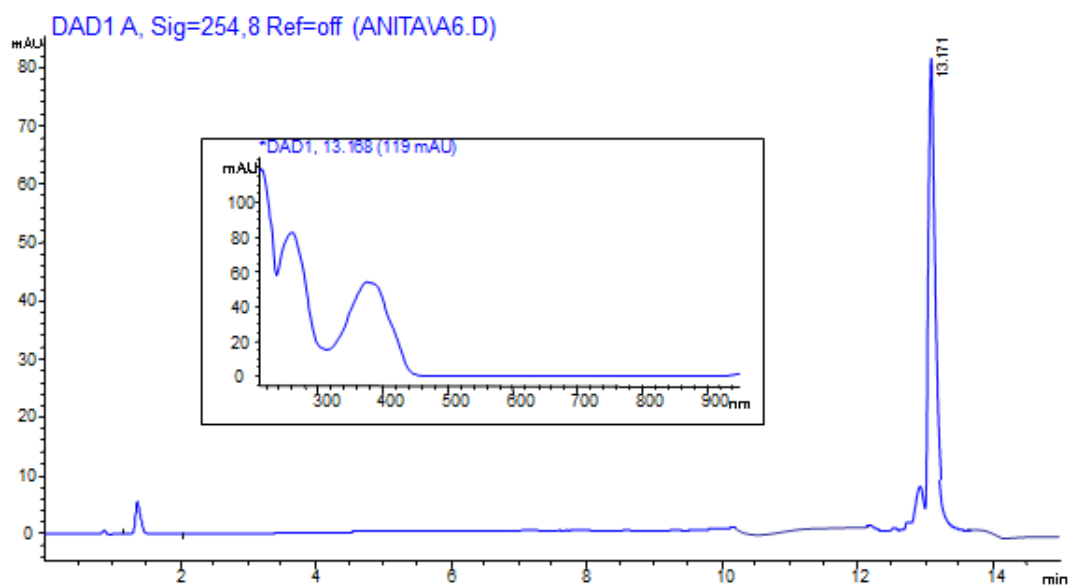
86.24%

Załącznik 21. Chromatogram związku 175e



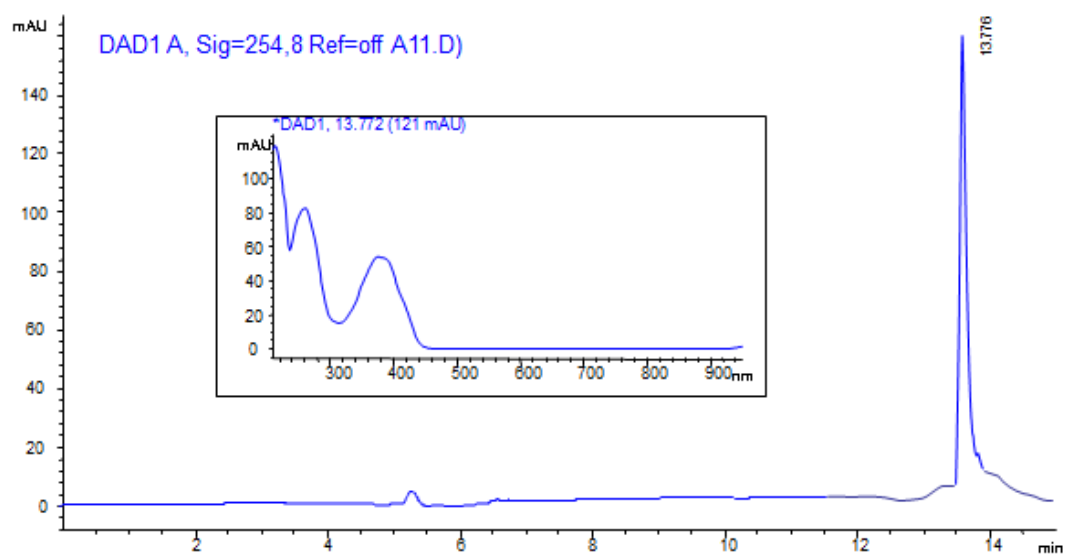
98.88%

Załącznik 22. Chromatogram związku 175f



99.60%

Załącznik 23. Chromatogram związku 175h



96.02%