

Dr inż. Justyna Frączyk
Politechnika Łódzka
Wydział Chemiczny
Instytut Chemii Organicznej
ul. Żeromskiego 116
90-924 Łódź
tel. +48426313221
justyna.fraczyk@p.lodz.pl

Funkcjonalizacja powierzchni ciał stałych przy użyciu pochodnych 1,3,5-triazyny

Autoreferat do wniosku habilitacyjnego

Łódź, 2019

1. IMIĘ I NAZWISKO: Justyna Frączyk (z d. Kolesińska)

2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE (z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej)

2013 Politechnika Łódzka, Wydział Organizacji i Zarządzania, ukończenie studiów podyplomowych w zakresie: Zarządzanie projektem badawczym i komercjalizacja wyników badań
Tytuł pracy dyplomowej: Person Treat

2009 Politechnika Łódzka, Wydział Chemiczny
Uzyskany stopień: doktor nauk chemicznych
Promotor: prof. dr hab. Zbigniew J. Kamiński
Tytuł rozprawy doktorskiej: Synteza, badanie własności i próby zastosowania w diagnostyce medycznej macierzy (arrays) sztucznych receptorów

2003 Politechnika Łódzka, Wydział Chemiczny, Kierunek Inżynieria Materiałowa,
Uzyskany stopień magister inżynier chemii, promotor (prof. dr hab. Zbigniew Kamiński, prof. dr hab. Marian Zaborski)
Tytuł pracy magisterskiej: Otrzymywanie i zastosowanie pochodnych 1,3,5 triazyny immobilizowanych na powierzchniach krzemionki, szkła i celulozy

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH:

VIII.2009 – III.2011	Instytut Chemii Organicznej Politechnika Łódzka Stanowisko: samodzielny referent techniczny
IV.2011 – IX.2012	Instytut Chemii Organicznej Politechnika Łódzka Stanowisko: asystent
X.2012 – obecnie	Instytut Chemii Organicznej Politechnika Łódzka Stanowisko: adiunkt
VI.2016-VI.2017	urlop macierzyński

4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 r. poz.1789):

a) Tytuł osiągnięcia naukowego: Funkcjonalizacja powierzchni ciał stałych przy użyciu pochodnych 1,3,5-triazyny

b) Cytowane w Autoreferacie oryginalne naukowe prace twórcze stanowiące podstawę wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego (tytuł, autorzy, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy).

Podstawę osiągnięcia stanowi cykl jedenastu oryginalnych publikacji, jednego patentu krajowego, oraz jednego artykułu przeglądowego i jednego rozdziału w książce. Kopie publikacji oraz oświadczenia współautorów zostały zamieszczone w załącznikach, odpowiednio 8 i 6.

* autor do korespondencji

** równy udział z pierwszym autorem publikacji

H1. Structure–activity relationship in binding ligands to library of artificial receptors. The search for biocompatible sensor.

Frączyk, J.; Mrozek, A.; Kamiński, Z.J. *Bioelectrochemistry* **80**, 2–9 (2010). IF₂₀₁₀ = 3.520.

H2. The new approach to organocatalysts. Synthesis of a library of *N*-lipidated oligopeptides immobilized on cellulose and screening of their catalytic activity.

Frączyk, J.; Kolesińska, B.; Kamiński, Z.J. *ARKIVOC* (iv) 186-195 (2012). IF₂₀₁₂ = 1.057.

H3. *N*-lipidated oligopeptides immobilized on cellulose as new type of organocatalysts.

Frączyk, J.; Kolesińska, B. Kamiński, Z.J. *Comb. Chem. & H.T.S.* **16**(7), 562-571, (2013). IF₂₀₁₃ = 1.925.

H4. Probing an Artificial Polypeptide Receptor Library Using a Series of Novel Histamine H3 Receptor Ligands.

Bąk, A.; Daszykowski, M.; Kamiński, Z.; Kieć- Kononowicz, K.; Kuder, K.; **Frączyk, J.;** Kolesińska, B.; Ciosek, P.; Polański, J. *Comb. Chem. & H.T.S.* **17**, 141-156 (2014). IF₂₀₁₄ = 1.222.

H5. Preliminary studies on application of library of artificial receptors for differentiation of metabolites in urine of healthy and cancer bearing mice.

Walczak, M.; **Frączyk, J.;*** Kamiński, Z. J.; Wietrzyk, J.; Filip-Psurska B. *Acta Poloniae Pharmaceutica, Drug Research*, **71**(6), 941-953 (2014). IF₂₀₁₄ = 0.737.

H6. Carbon nanotubes functionalized with folic acid attached via biomimetic peptide linker.

Frączyk, J.; Walczak, M.; Szymański, L.; Kołaciński, Z.; Wrzosek, H.; Majsterek, I.; Przybyłowska-Sygut, K.; Kamiński, Z.J. *Nanomedicine*, **12**(18), 2161–2182 (2017). IF₂₀₁₇ = 5.005.

H7. Molecular Fingerprinting of Thyroid Cancer Cells Using Library of Molecular Receptors Formed by *N*-Lipidated Peptides Immobilized on Cellulose.

Frączyk, J.;* Walczak, M.; Balcerzak, W.; Pokajewicz, K.; Wieczorek, P.; Młynarski, W.; Fendler, W.; Kamiński, Z.J. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, **75**(4), 1017-1029 (2018). IF₂₀₁₆ = 0.745.

H8. New Methodology for Automated SPOT Synthesis of Peptides on Cellulose using 1,3,5-Triazine derivatives as Linkers and as Coupling Reagents.

Frączyk, J.; Walczak, M.; Kamiński, Z.J. *J. Pep. Sci.* **24**, e3063 (2018). IF₂₀₁₈ = 1.969.

- H9.** Towards Intelligent Drug Design System: Application of Artificial Dipeptide Receptor Library in QSAR-Oriented Studies.
Bak, A.; Kozik, V.; Walczak, M.; **Frączyk, J.**; Kaminski, Z.J.; Kolesinska, B.; Smolinski, A.; Jampilek, J. *Molecules*, **23**, 1964 (2018). IF₂₀₁₈ = 3.098.
- H10.** Orthogonal Functionalization of Nanodiamond Particles after Laser Modification and Treatment with Aromatic Amine Derivatives.
Frączyk, J.; Rosowski, A.; Kolesinska, B.; Koperkiewicz, A.; Sobczyk-Guzenda, A.; Kaminski, Z.J.; Dudek, M. *Nanomaterials*, **8**, 908 (2018). IF₂₀₁₈ = 3.504.
- H11.** N-Lipidated Amino Acids and Peptides Immobilized on Cellulose Able to Split Amide Bonds.
Frączyk, J.;* Kaminski, Z.J. *Materials*, **12**, 578 (2019). IF₂₀₁₈ = 2.467.
- H12.** Sposób wytwarzania macierzy N-lipidowanych oligopeptydów immobilizowanych na podłożu o regularnej budowie z eksponowanymi grupami polarnymi, macierze N-lipidowanych oligopeptydów, ich zastosowanie do diagnozowania chorób oraz selekcji markerów w badaniach przesiewowych jak również wykorzystujących je do diagnozowania choroby *in vitro*.
Kolesińska, B.; **Frączyk, J.**;** Majchrzak, J.; Kamiński, Z.J.; Wietrzyk, J.; Filip, B.; Bednarek, W.; Wieczorek, P.; Dziarkowska, K.; Fendler, W.; Młynarski, W. Zgłoszenie patentowe **P.393213** z dnia 10.12.2010. Patent **PL 226341** udzielony w dniu 19.12.2016 (ogłoszenie WUP 07/17 z 31.07.2017).
- H13.** Cellulose Template Assembled Synthetic Peptides as Molecular Receptors.
Frączyk, J.; Walczak M.; Kamiński, Z.J. *Current Protein & Pept. Sci.* **17**(2), 117-126 (2016). IF₂₀₁₆ = 2.576.
- H14** Cellulose Functionalised with Grafted Oligopeptides 241-278 rozdział w książce CELLULOSE – MEDICAL, PHARMACEUTICAL AND ELECTRONIC APPLICATIONS Edited by Theo van de Ven and Louis Godbout, InTech Rijeka, Croatia (2013), ISBN 978-953-51-1191-7.
Frączyk J., Kolesińska B., Relich I., Kamiński Z.J.

Sumaryczny impact factor 12 publikacji: 27.825

c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

I. PRZEDMOWA

Zaprezentowany cykl jedenastu oryginalnych publikacji (**H1-H11**) oraz jednego patentu krajowego (**H12**) przedstawia kompleksowe opracowanie metod funkcjonalizacji powierzchni ciał stałych, a w szczególności celulozy, przy użyciu pochodnych 1,3,5-triazyny. Zakres przedstawionych badań obejmuje zarówno opracowanie wydajnych i zróżnicowanych metod modyfikowania powierzchni ciał stałych za pomocą pochodnych dichloro-1,3,5-triazyny, jak i transformacji reaktywnych grup funkcyjnych w pierścieniu triazyny celem wprowadzenia innych grup o zróżnicowanej reaktywności. Racjonalne wykorzystanie reaktywnych pochodnych 1,3,5-triazyny osadzonych na powierzchni

materiałów stałych pozwoliło na zaprojektowanie i otrzymanie struktur będących receptorami molekularnymi, zdolnymi mimikować receptory białkowe i synzymami mimikującymi działanie enzymów. Z drugiej strony, możliwe jest oczywiście wykorzystanie materiałów jako matryc do osadzania różnorodnych związków biologicznie czynnych. W szczególnym przypadku modyfikowanymi materiałami mogą być nanomateriały, co pozwala rozszerzyć zakres zastosowań opracowanych metod funkcjonalizacji materiałów stałych za pomocą 1,3,5-triazyny. Przeprowadzone badania nad funkcjonalizacją nanomateriałów pozwoliły na nakierowanie ich działania do zastosowań biologicznych/medycznych, które zostały potwierdzone odpowiednimi badaniami. Do cyklu dwunastu publikacji dołączony został artykuł przeglądowy (**H13**) oraz rozdział w książce (**H14**), opisujący wykorzystanie celulozy jako matrycy do tworzenia receptorów molekularnych, tworzonych w wyniku samoorganizacji peptydów.

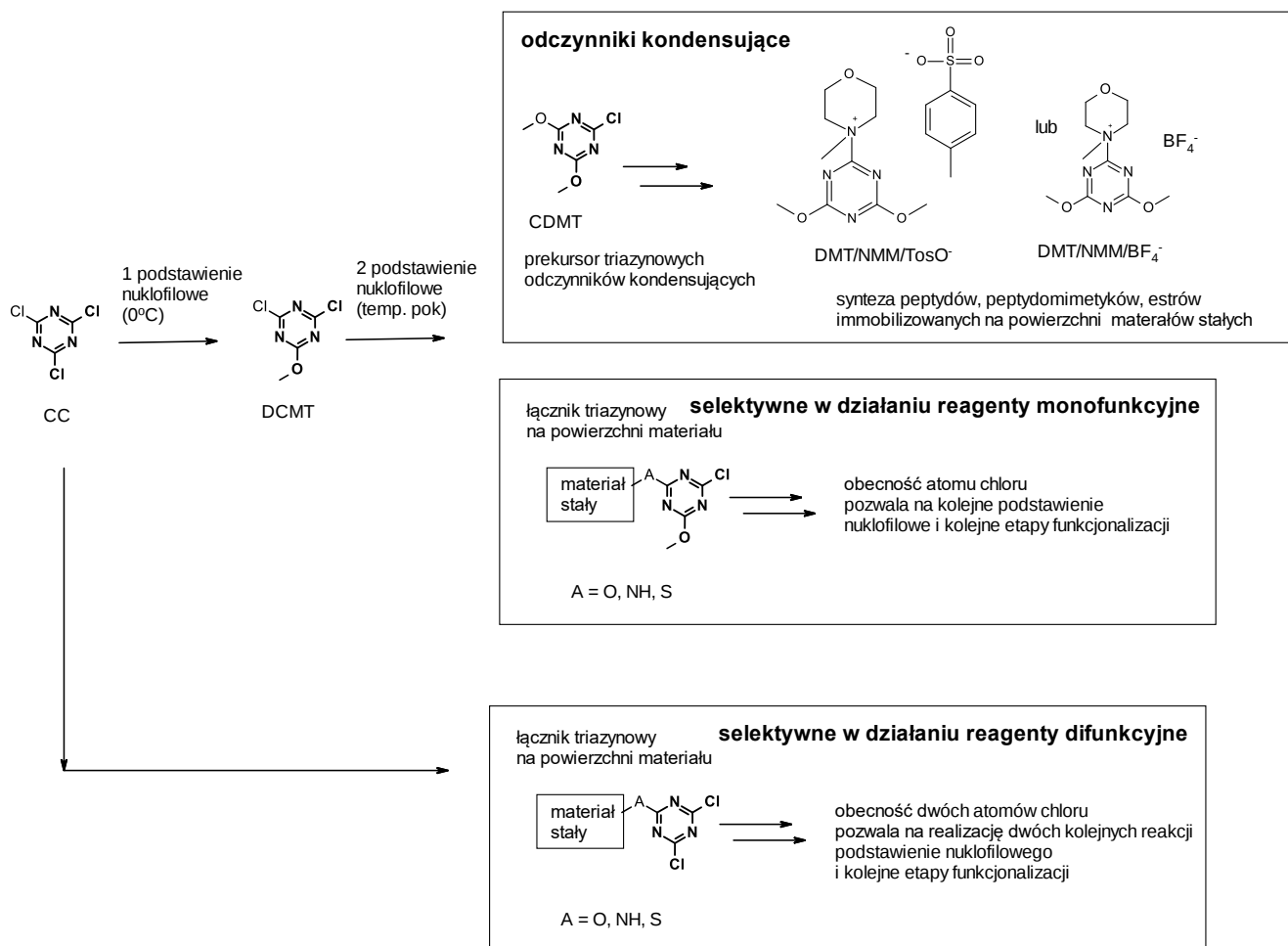
II. WSTĘP

Właściwości powierzchniowe surowych materiałów są zwykle niewystarczające pod względem wymaganych parametrów fizycznych, chemicznych, mechanicznych i biologicznych. Z tego powodu zazwyczaj muszą być one modyfikowane przed ich finalnym zastosowaniem lub poddawane dalszemu przetwarzaniu celem uzyskania pożądanych właściwości. Znane są różnorodne metody funkcjonalizacji, których zastosowanie pozwala na uzyskanie pożądanych dla określonego zastosowania właściwości [1]. Oczywiście, nie ma jednego uniwersalnego rozwiązania pozwalającego na modyfikowanie wszystkich typów stosowanych materiałów. W literaturze chemicznej opisanych jest cały szereg znakomitych prac przeglądowych dotyczących chemicznej funkcjonalizacji: polimerów [2], biopolimerów [3], nanomateriałów [4], krzemionki [5], metali i innych materiałów stałych [6]. Zawężając materiały stałe do grupy użytecznych w aplikacjach biomedycznych, kluczowymi parametrami z punktu widzenia funkcjonalności, które wprowadzane są do materiałów na drodze modyfikacji chemicznych, są: biokompatybilność oraz zdolność oddziaływania na poziomie komórkowym. Właściwości takie jak chropowatość powierzchni, twardość, charakter grup funkcyjnych, reaktywność powierzchni (obojętna lub aktywna), zwilżalność, ładunek powierzchniowy, swobodna energia powierzchniowa są cechami powierzchni materiałów, które odgrywają główną funkcję w adhezji komórkowej, proliferacji komórek i tworzeniu się tkanek [7]. Chemiczna modyfikacja powierzchni materiałów [8] obejmuje szeroko rozumiane transformacje, które mogą być podzielone na: częściową degradację lub modyfikację warstwy powierzchniowej materiału (zazwyczaj jest to hydroliza alkaliczna), immobilizowanie (kwalencyjne unieruchomienie) fragmentów tworzących funkcję, mokre metody chemiczne (wet chemical methods) pozwalające na wysoce zróżnicowane modyfikowanie oraz metody modyfikacji wykorzystujące oddziaływania słabe. Powierzchnia materiałów jest przed

właściwym etapem funkcjonalizacji poddawana reakcjom pozwalającym na jej aktywację (wprowadzanie reaktywnych grup funkcyjnych na powierzchni materiału), aby w kolejnym etapie wykorzystać je do właściwej modyfikacji pozwalającej na osiągnięcie założonych właściwości materiału. Metoda chemiczna na mokro jest jednym z częściej stosowanych podejść, gdyż pozwala na stosowanie roztworów reagentów w rozpuszczalnikach i ich wykorzystaniu w reakcjach z grupami funkcyjnymi, zlokalizowanymi na powierzchni. To co istotne to fakt, że stabilność powierzchni uzyskiwanej na tej drodze jest wyższa od metod wykorzystujących adsorpcję fizyczną (oddziaływania słabe). Modyfikacja chemiczna jest jedną z najczęściej stosowanych metod „obróbki” powierzchni wszystkich rodzajów biomateriałów, takich jak polimery, metale, ceramika i nanokompozyty. Działania te powodują, że funkcjonalizowane na drodze chemicznej materiały znajdują liczne zastosowania, zaś w odniesieniu do aplikacji biomedycznych są one stosowane w chemo/foto terapii, dostarczaniu leków, genów, bioznaczników, sensorów, biokoniugatów i w wielu innych obszarach. Zazwyczaj pomiędzy grupami funkcyjnymi na powierzchni materiału a ugrupowaniami wprowadzanymi na drodze modyfikacji chemicznych konieczne jest stosowanie właściwych łączników, warunkujących właściwe wyeksponowanie związków umożliwiających oddziaływanie na poziomie komórkowym.

III. CEL NAUKOWY PRACY

Badania stanowiące podstawę niniejszej rozprawy habilitacyjnej miały na celu opracowanie efektywnej i możliwie jak najbardziej uniwersalnej metody funkcjonalizacji powierzchni ciał stałych przy użyciu pochodnych 1,3,5-triazyny w celu nadawania im nowych właściwości. Szczególną zaletą pochodnych triazyny jest ich wysoka symetria (trójkrotna oś symetrii). Pochodne 1,3,5-triazyny planowałam zastosować jako łączniki bądź reagenty pozwalające na przyłączanie lub tworzenie nowych struktur warunkujących założone właściwości.

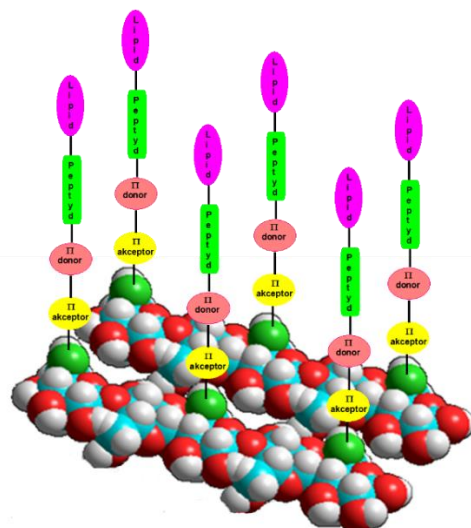


Rysunek 1. Użyteczność 1,3,5-triazyn w funkcjonalizacji powierzchni materiałów.

Założenie to wynikało z faktu, że liczna paleta zróżnicowanych pochodnych 1,3,5-triazyny wywodzi się z wysoce reaktywnego i łatwo dostępnego chlorku cyjanuru, który można przekształcić do bardziej złożonych związków chemicznych, w sposób selektywny, a tym samym wykorzystać je w różnorodnych transformacjach.

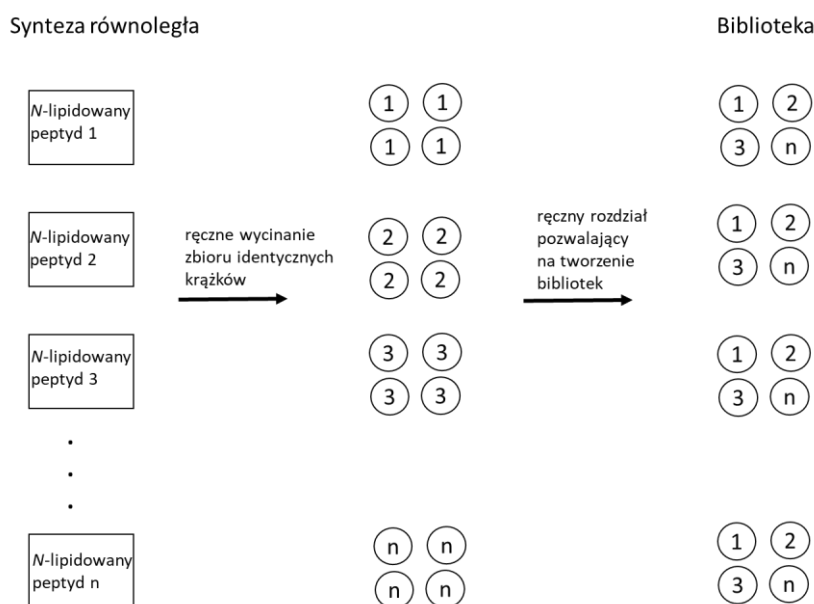
IV. OPTYMALIZACJA PROCESU WSTĘPNEJ FUNKCJONALIZACJI MATRYC POLISACHARYDOWYCH, POZWALAJĄCA NA EFEKTYWNĄ SYNTEZĘ ŁĄCZNIKA ZAWIERAJĄCEGO RDZEŃ 1,3,5-TRIAZyny ORAZ OPRACOWANIE WARUNKÓW AUTOMATYCZNEJ SYNTETY *N*-LIPIDOWANYCH PEPTYDÓW IMMOBILIZOWANYCH NA STAŁYM PODŁOŻU METODĄ SPOT PRZY UŻYCIU TRIAZYNOWYCH ODCZYNNIKÓW KONDENSUJĄCYCH

W trakcie badań opisanych w mojej pracy doktorskiej przedstawiłam hipotezę dotyczącą możliwości zaprojektowania, syntezy oraz wyznaczenia obszaru potencjalnych zastosowań struktur powstających w wyniku samorzutnie następującego uporządkowania podandów peptydowych immobilizowanych na celulozie w sposób ściśle uporządkowany. Zgodnie z hipotezą, zachodząca samorzutnie organizacja takich podandów prowadziła do utworzenia wnęk wiążących, zdolnych do wiązania i rozróżniania ligandów. Zaprojektowana struktura sztucznych receptorów przedstawiona jest na rysunku poniżej.



Rysunek 2. Struktura podandów immobilizowanych w wysoce regularny sposób na celulozie tworzących na drodze samoorganizacji sztuczne receptory.

W ramach badań przeprowadzonych w pracy doktorskiej stwierdziłam, że regularność rozmieszczenia bardziej reaktywnych pierwszorzędowych grup hydroksylowych na celulozie (rys. 2, zielone kulki) pozwala na otrzymanie wnek otoczonych podandami zawierającymi fragmenty π -akceptorowe, π -donorowe, peptydy oraz hydrofobowy lipid o zróżnicowanym charakterze wynikającym ze struktury pierwszorzędowej. Podandy te, w zależności od struktury peptydu oraz lipidu, wiążą i rozróżniają struktury ligandów. Opracowana procedura otrzymywania zbioru sztucznych receptorów polegała na syntezie macierzy *N*-lipidowanych peptydów immobilizowanych na arkuszach modyfikowanej celulozy o znacznym rozmiarze i następnie ręcznym wycinaniu krążków, co pozwoliło mi na otrzymanie zbioru identycznych struktur. Procedura ta gwarantowała powtarzalność struktur wycinanych z jednego arkusza, ale nie gwarantowała identyczności kolejnych kopii arkusza.



Rysunek 3. Manualna metoda otrzymywania zbiorów sztucznych receptorów immobilizowanych na celulozie.

Dodatkowo, proces ten był czasochłonny oraz generował możliwości błędów. Wymienione ograniczenia procedury były szczególnie uciążliwe przy testowaniu znacznej liczby związków. Akceptując wszystkie korzyści wynikające z dotychczasowych doświadczeń, w pracach z macierzami sztucznych receptorów uznałam, że niezbędne jest dokonanie zasadniczego zmodyfikowania procedur syntetycznych w taki sposób, aby uzyskać gwarancję powtarzalności wyników z jednocześnie zachowaną kluczową właściwością immobilizowanych podandów, jaką jest ich zdolność do samoorganizacji i tworzenia struktur supramolekularnych. Przyjęłam więc, że konieczne jest podjęcie badań nad automatyzacją procesu syntezy macierzy peptydowych immobilizowanych na powierzchni matrycy celulozowej. Za koniecznością tych działań przemawiało kilka aspektów, wśród których najważniejsze to:

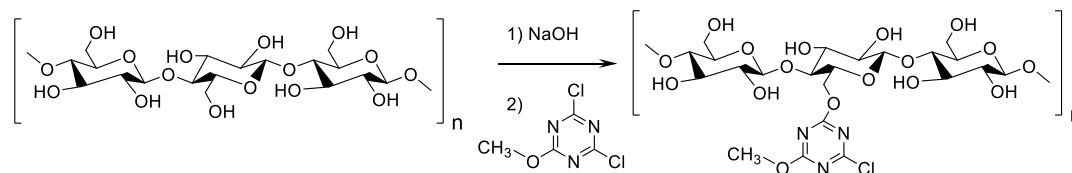
- 1) konieczność zmiany czasochłonnej oraz żmudnej procedury manualnego otrzymywania macierzy peptydowych. W przypadku niewielkich bibliotek sztucznych receptorów procedura taka mogła być zaakceptowana, natomiast dla wieloelementowych macierzy *N*-lipidowanych peptydów takie rozwiązanie było wyjątkowo niedogodne;
- 2) duże zużycie odczynników niezbędne do funkcjonalizowania całych arkuszy celulozy, z których tylko część była wykorzystywana w postaci wycinanych manualnie krążków;
- 3) konieczność stosowania znacznych ilości ligandów, potrzebnych do jednolitego wysycenia wszystkich krążków wyciętych z arkusza, których rozmiar, z uwagi na sposób indeksowania, nie mógł być zmniejszony. Szczególnie niedogodne było to w przypadku próbek biologicznych i niejednokrotnie wiązało się z koniecznością ich rozcieńczania.

Uwzględniając wszystkie ograniczenia procedur opracowanych przeze mnie w trakcie badań zawartych w doktoracie, podjęłam próby opracowania nowej metodyki syntezy macierzy peptydowych. Założyłam, że wykorzystam do tego celu, jak uprzednio, podłoże celulozowe oczekując, że pozwoli to zachować funkcje receptorów molekularnych zdolnych do oddziaływania z ligandami. Przyjęłam, że najbardziej odpowiednią metodą będzie synteza macierzy peptydowych oparta na technice SPOT. Klasyczna metoda SPOT polega na syntezie peptydów w postaci kropek, które naniesione są w regularny sposób na arkusz celulozowy. W ten sposób otrzymywane są wieloelementowe macierze peptydowe, gdzie jedna kropka odpowiada jednemu peptydowi a jej indeksy kodują jego strukturę [9]. W standardowych protokołach syntezy SPOT opracowanych przez Franka, najczęściej jako łączniki wykorzystywane są pochodne aminokwasów (glicyna, prolina, β -alanina) [10, 11]. Zarówno zgodnie z moimi doświadczeniami, jak i danymi literaturowymi, często stwierdzano, że rozwiązanie polegające na bezpośredniej estryfikacji celulozy za pomocą Fmoc-blokowanych pochodnych aminokwasów nie gwarantuje ich stabilnego zakotwiczenia na nośniku (praca **H14**). Dość często bowiem dochodzi do aminolizy wiązania estrowego tworzonego z grupą hydroksylową celulozy, co nie może być zaakceptowane, bowiem skutkuje odszczepianiem podandu

i utratą regularnego ich rozmieszczenia. Stosowane są również stabilniejsze pochodne celulozy modyfikowane aminosilanami [12], co eliminuje problem nietrwałości wiązania estrowego oraz pozwala na zwiększenie dystansu pomiędzy nośnikiem stałym a immobilizowanym peptydem, ale nie oferuje oddziaływań π -akceptorowych. Odczynnikami kondensującymi stosowanymi w syntezach peptydów techniką SPOT są albo pochodne karbodiimidowe albo odczynniki kondensujące, wywodzące się z hydroksybenzotriazolu bądź 7-azabenzotriazolu [13].

Mając na uwadze przedstawione fakty, przyjął, że podejmę próby opracowania całkowicie nowych protokołów syntetycznych otrzymywania macierzy peptydowych oraz macierzy *N*-lipidowanych peptydów immobilizowanych na nośnikach celulozowych, wykorzystując technikę SPOT z użyciem triazynowych odczynników kondensujących przy zastosowaniu jako łączników pochodnych 1,3,5-triazyny. Oczekiwałam, że zastosowanie pochodnych 1,3,5-triazyny jako łączników (lub ich składowych) pozwoli mi na zachowanie sprawdzonych już elementów strukturalnych, co powinno sprzyjać utrzymaniu architektury podandów, gdyż ich wprowadzenie powinno być uprzywilejowane wyłącznie na pierwszorzędowym węglu C6 reszty anhydroglukozy w celulozie [14, 15]. Do założonego problemu syntetycznego podeszłam holistycznie i dokonałam wyboru celulozy z obszernej puli handlowo dostępnych celuloz w postaci arkuszy filtracyjnych. Przeprowadziłam optymalizację warunków syntezy łącznika, dokonałam wyboru czwartorzędowej soli *N*-triazynyloamoniowej pełniącej funkcję odczynnika kondensującego oraz zoptymalizowałam warunki syntezy immobilizowanych peptydów. Wyniki prac nad opracowaniem protokołów syntetycznych pozwalających na automatyczną metodę SPOT macierzy peptydów, *N*-lipidowanych peptydów będących również receptorami molekularnymi przedstawione są w pracy **H8**, zamieszczonej we wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego.

Proces syntezy macierzy immobilizowanych na celulozie pochodnych peptydowych jest wieloetapowy. Pierwszy etap stanowi synteza łącznika, który w opracowywanym przeze mnie rozwiązaniu jest kluczowy, gdyż warunkuje późniejsze równomierne obsadzenie matrycy celulozowej za pomocą peptydów, a to z kolei przekłada się na tworzenie jednakowych wnęk wiążących ligand.

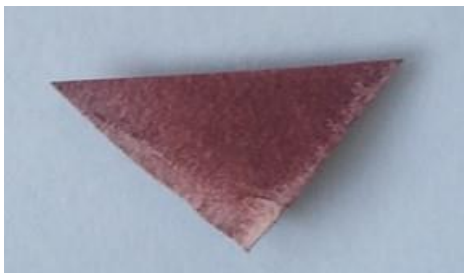


Schemat 1. Immobilizowanie pochodnej 1,3,5-triazyny na podłożu celulozowym.

Osiągnięcie tego celu było możliwe poprzez bardzo szczegółowe opracowanie warunków syntezy, gwarantujących całkowite przereagowanie pierwszorzędowych grup hydroksylowych celulozy, co z uwagi na krystaliczność celulozy, warunkuje równomierne modyfikowanie arkuszy celulozowych.

Gęstość fazy krystalicznej celulozy wynosi 1.59 g/cm^3 , zaś dla celulozy pochodzenia naturalnego wynosi 1.55 g/cm^3 , co odpowiada zawartości ok. 70% składnika krystalicznego [16]. W tym miejscu należy również zwrócić uwagę, że kolejnym ważnym czynnikiem jest stosowanie celulozy w postaci arkuszy, w których celuloza charakteryzuje się odpowiednim stopniem polimeryzacji (właściwa długość łańcuchów polisacharydowych), gdyż warunkuje to zachowanie odpowiednich właściwości mechanicznych biopolimeru, nawet w przypadku rozluźnienia włókien celulozowych w trakcie procedur preparatywnych. Spośród przetestowanych przeze mnie 15 różnych celuloz dostępnych w postaci arkuszy filtracyjnych o zróżnicowanych parametrach fizycznych, tylko trzy spełniały założone kryteria: są to celuloza filtracyjna Whatman typu: C-504, C-50 oraz CHR-1. Pierwszy, niezwykle ważny etap warunkujący powodzenie syntezy, to tworzenie alkalicelulozy działaniem rozcieńczonego ługu sodowego na celulozę. Kolejny etap tworzenia łącznika 1,3,5-triazyny polegał na reakcji alkalicelulozy z 2,4-dichloro-6-metoksy-1,3,5-triazyną (DCMT). Etap ten warunkuje ilość i równomierność rozmieszczenia centrów reaktywnych, zdolnych do przyłączania peptydów na powierzchni celulozy. Postęp procesu dobudowywania DCMT do celulozy kontrolowałam za pomocą kilku metod: (a) oznaczania ilości azotu oraz chloru zawartego w celulozie po modyfikacji (analiza elementarna); (b) wyznaczania stosunku zawartości N/Cl; (c) ocenie grubości i sztywności otrzymanych arkuszy celulozowych oraz (d) sprawdzania efektywności równomierności wbudowania 2-chloro-1,3,5-triazyny na powierzchnię celulozy testem barwnym z użyciem 4-(4'-nitrobenzyl)opirydyny (NBP, test Preussmanna) [17]. Uwzględniając powyższe kryteria stwierdziłam, że najlepsze rezultaty otrzymywane są przy zastosowaniu jako substratu celulozy CHR-1 traktowanej 1.5 M roztworem ługu sodowego przez 10 minut (etap tworzenia alkalicelulozy). Wydłużenie czasu działania NaOH lub zastosowanie bardziej stężonej zasady powodowało nadmierne rozluźnienie włókien celulozowych i utratę jej wytrzymałości mechanicznej. Z drugiej strony, stosowanie krótszego czasu reakcji z NaOH oraz bardziej rozcieńczonych warunków, skutkowało zbyt niskim rozluźnieniem włókien celulozy, co finalnie prowadziło do uzyskiwania niskiego stopnia przereagowania DCMT z pierwszorzędowymi grupami hydroksylowymi celulozy. Arkusze alkalicelulozy muszą być również suszone w odpowiednich warunkach. Najlepsze rezultaty otrzymałam, gdy proces suszenia zachodził w temperaturze 40°C przez 30 min. Obecność wody sprzyja bowiem hydrolizie DCMT, co skutkuje obniżeniem zawartości reaktywnych grup chlorowca. Stwierdziłam, że optymalnym do immobilizowania DCMT na celulozie jest stosowanie 1M roztworu DCMT w tetrahydrofuranie. Ważne jest również stosowanie odpowiednich zasad pełniących rolę akceptora chlorowodoru. Najlepsze rezultaty uzyskuje się stosując mieszaninę złożoną z diizopropylometyloaminy (1.5 ekwiwalentu na 1 ekwiwalent DCMT) oraz stałego NaHCO_3 (0.5 ekwiwalentu na 1 ekwiwalent DCMT). W opisanych powyżej warunkach wyznaczony optymalny czas immobilizowania DCMT na celulozie wynosi 3 godziny. Testem jakościowym na obecność chloropochodnej triazyny jest test z NBP. Obecność reaktywnego chloru w pierścieniu 1,3,5-

triazyny przyłączonej do matrycy celulozowej potwierdzona jest wystąpieniem ciemnoczerwonego zabarwienia (Rysunek 4).

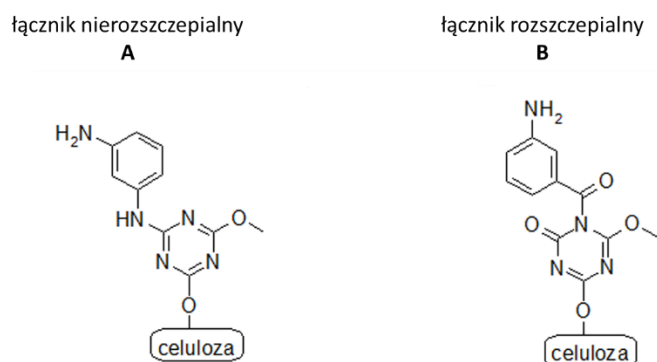


Rysunek 4. Zdjęcie zmodyfikowanej za pomocą DCMT celulozy traktowanej roztworem NBP.

Opracowana procedura zapewniała równomierne funkcyjalizowanie powierzchni arkuszy celulozowych, co potwierdza fakt jednorodnego wybarwienia całego obszaru arkusza. Efektywność procesu immobilizowania DCMT na podłożu celulozowym określiłam w oparciu o wyniki analizy elementarnej, poprzez ilościowe oznaczenie zawartości azotu oraz chloru. Wyliczony wagowy stosunek zawartości azotu do chloru na zmodyfikowanym podłożu wynosi 1.2 ($3 \times 14 \text{ g/mol N}$ do 35.5 g/mol Cl). Wyższa wartość świadczy o ubocznych reakcjach towarzyszących podstawieniu nukleofilowemu (hydroliza, prowadząca do pochodnych hydroksy-1,3,5-triazyn oraz sieciowanie skutkujące również obniżeniem zawartości chloru). W oparciu o wyniki analizy elementarnej pochodnych uzyskanych w niezależnych syntezach, stwierdziłam, że opracowana metoda charakteryzuje się wysoką powtarzalnością. Średnia zawartość azotu i chloru z 12 niezależnych eksperymentów wynosi $\% \text{ N} = 1.655$ i $\% \text{ Cl} = 1.305$. Wysoka powtarzalność procedury immobilizowania potwierdzona była niskimi wartościami odchylenia standardowego, która dla azotu wynosi 0.163, zaś dla chloru 0.178. Zawartość azotu $N_L^s = 1.18 \cdot 10^{-3} \text{ mol (N)/g}$ odpowiada $0.39 \cdot 10^{-3} \text{ mol (triazyny)/g}$, zaś obciążenie celulozy wyznaczone w oparciu o zawartość chloru wynosi $Cl_L^s = 0.37 \cdot 10^{-3} \text{ mol (Cl)/g}$. Nieznacznie niższe obciążenie celulozy wyznaczone na podstawie zawartości chloru może być związane z częściową hydrolizą chlorotriazyny, zakotwiczonej na powierzchni celulozy. Tym samym obciążenie nośnika wyznaczone na podstawie zawartości chloru należy uznać za bardziej precyzyjne i takie było wykorzystywane do dalszych obliczeń.

Opracowana procedura pozwala na jednoczesne funkcyjalizowanie wielu arkuszy celulozowych, przy zapewnieniu odpowiedniej penetracji reagentów. Zakończony sukcesem tego etapu prac badawczych pozwoliło mi na rozpoczęcie badań nad opracowaniem efektywnych metod wbudowywania do pochodnej chloro-1,3,5-triazyny kolejnych fragmentów łącznika. Planowałam opracować dwa warianty łącznika, zawierającego resztę 1,3,5-triazyny. Wstępne warunki tworzenia łącznika A, zawierającego resztę m-fenylendiaminy były opracowane w ramach wcześniej prowadzonych prac badawczych, z tym, że nie była to metoda zoptymalizowana, co groziło brakiem

powtarzalności. Drugim zaprojektowanym przeze mnie łącznikiem, jest pochodna B, zawierająca resztę kwasu *m*-aminobenzoowego. Założeniem do rozpoczęcia badań nad opracowaniem efektywnych i powtarzalnych metod wytwarzania dwóch typów łączników było opracowanie wariantu warunkującego odszczepienie, we względnie łagodnych warunkach, finalnych peptydów z podłoża stałego (wariant B) oraz pochodnej A, której struktura pozwalała na syntezę stabilniejszych struktur bardziej podatnych do tworzenia receptorów molekularnych.



Rysunek 5. Struktury aromatycznych łączników A i B.

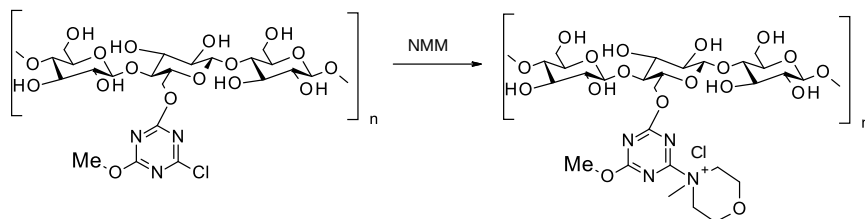
Obecność reaktywnego atomu chloru w pierścieniu 1,3,5-triazyny umożliwiła mi przeprowadzenie dalszego funkcjonalizowania dwoma metodami. Łącznik A otrzymany został w wyniku reakcji z *m*-fenylenodiaminą. Wybór tej aminy na etapie prac optymalizacyjnych wynikał z faktu, że jej przydatność była potwierdzona we wstępnych badaniach nad syntezą sztucznych receptorów, prowadzonych z pochodnymi zawierającymi w swojej strukturze: celulozę-1,3,5-triazynę-*m*-fenylenodiaminę oraz *N*-lipidowany aminokwas lub *N*-lipidowany dipeptyd. Badania te potwierdziły przydatność łącznika, ale też wykazały jego ograniczenia. Stwierdziłam bowiem, że stosowanie aminokwasów chronionych wg strategii Boc/Bzl uniemożliwia deprotekcję grup ochronnych w łańcuchach bocznych bez destrukcji podandów. Dlatego też wstępnie zrealizowane przeze mnie badania ograniczały się wyłącznie do otrzymywania pochodnych aminokwasowych dipeptydowych z blokowanymi grupami funkcyjnymi w łańcuchach bocznych.

Przeprowadzone prace optymalizacyjne umożliwiły mi uzyskanie pełnej powtarzalności syntezy łącznika A stosując 1.5 M roztwór *m*-fenylenodiaminy w THF przez 24 godziny, bez konieczności stosowania akceptora chlorowodoru. Całkowite usunięcie nadmiaru reagentów wymaga zastosowania DMF jako rozpuszczalnika w procesie mycia arkuszy celulozowych. Zrealizowane badania pozwoliły mi na opracowanie efektywnych, powtarzalnych warunków reakcji, prowadzącej do uzyskania pochodnych celulozy z przyłączonym aromatycznym, sztywnym i stabilnym łącznikiem zawierającym fragment π -akceptorowy oraz π -donorowy (łącznik A). Stwierdziłam również, że procedura ta może

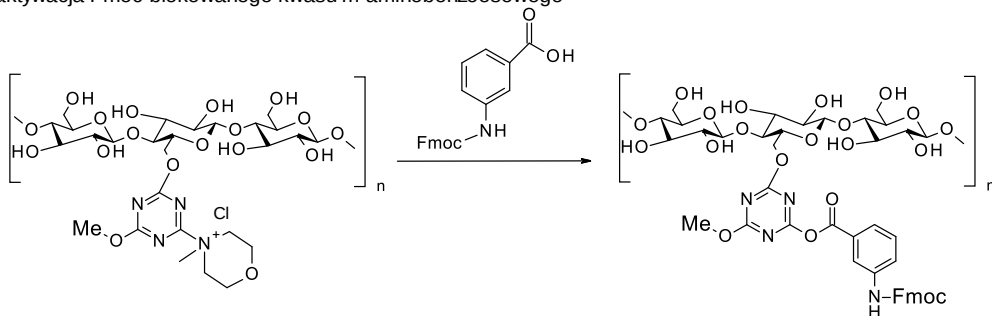
być z powodzeniem stosowana w reakcjach z użyciem innych aromatycznych, jak i alifatycznych amin, co zwiększa swobodę doboru struktury podandów.

Z uwagi na budowę łącznika A, niemożliwe jest odszczepienie immobilizowanych peptydów w łagodnych warunkach, co uniemożliwia potwierdzenie ich struktur standardowymi metodami spektralnymi. Nie jest możliwe również jego wykorzystanie w badaniach, które wymagają odszczepienia peptydu od stałego podłoża. Aby rozwiązać ten problem, podjęłam badania nad zaprojektowaniem nowego łącznika, który warunkowałby odszczepianie peptydów w łagodnych warunkach, a jednocześnie zawierał fragmenty π -akceptorowy oraz π -donorowy. W miejsce *m*-fenylenodiaminy zastosowałam kwas *m*-aminobenzoowy oraz wykorzystałam podatność estrów triazynowych do izomeryzacji do pochodnych izocyjanurowych [18], uzyskując w ten sposób łącznik typu B. Optymalna metoda syntezy łącznika B obejmowała: (a) tworzenie immobilizowanego na celulozie chlorku *N*-triazynyloamoniowego z *N*-metylomorfoliną, (b) aktywację blokowanego grupą Fmoc komponenta karboksylowego do superaktywnego estru triazynowego oraz (c) finalną *O*→*N* izomeryzację termiczną zachodzącą we wrzącym toluenie. Stwierdziłam, że optymalny czas aktywacji wynosi 3 godz. (wynik w oparciu o test z NBP) a czas izomeryzacji – 8 godz.

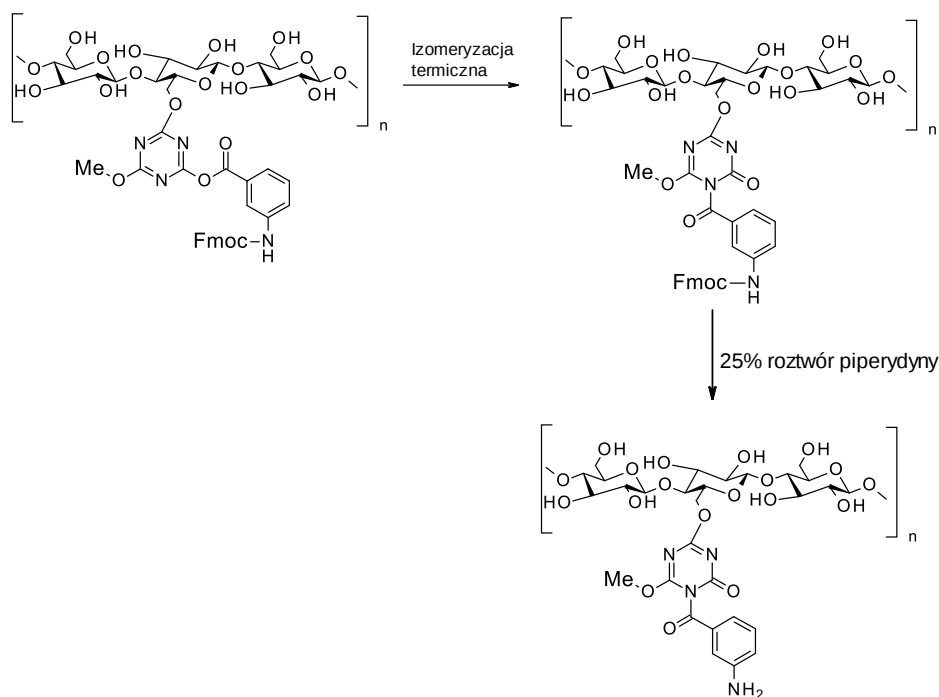
tworzenie triazynowego odczynnika kondensującego immobilizowanego na celulozie



aktywacja Fmoc-blokowanego kwasu m-aminobenzoowego



izomeryzacja estru triazynowego kwasu m-aminobenzoowego



Schemat 2. Synteza aromatycznego łącznika B immobilizowanego na celulozie.

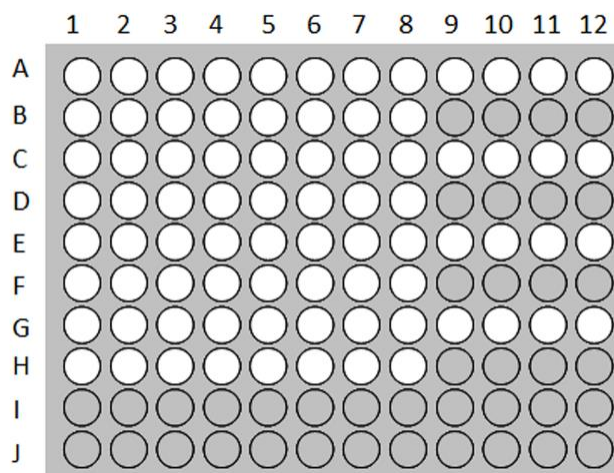
Stwierdziłam, że opracowana metoda ma charakter ogólny i może być zastosowana w syntezie łącznika typu B, zawierającego w miejsce kwasu m-aminobenzoowego również inne aromatyczne jak i alifatyczne aminokwasy, zarówno kodowane jak i niekodowane. Średnia zawartość Fmoc-blokowanego aminokwasu na powierzchni modyfikowanej celulozy wynosi 17 [μmol/g] (wartość średnia dla 8 różnych aminokwasów).

Ostatni etap prac nad opracowaniem warunków do automatycznej syntezy SPOT immobilizowanych peptydów oraz *N*-lipidowanych peptydów obejmował optymalizację syntezy wiązań peptydowych. Przyjęłam, że w syntezie peptydów na celulozie zawierającej oba typy łączników

stosowane będą Fmoc/tBu blokowane aminokwasy, co pozwoli mi na stosowanie procedur warunkujących usuwanie grup ochronnych z łańcuchów bocznych aminokwasów, zaś jako odczynnik kondensujący zastosuję *p*-toluenosulfonian 4-(4,6-dimetoksy-1,3,5-triazyn-2-yl)-4-metylomorfoliniowy (DMT/MMM/TosO⁻). Wybór tego odczynnika uzasadniały wyniki badań nad stabilnymi sulfonianami *N*-triazynyloamoniowymi (prace A11, A14 i A16 po uzyskaniu stopnia doktora, nie wchodzące w skład niniejszego postępowania habilitacyjnego), które potwierdziły jego użyteczność w syntezie peptydów i estrów w roztworze i na fazie stałej oraz długotrwałą stabilność jego roztworów, co jest istotne w przypadku syntezy zautomatyzowanej. Prace nad optymalizacją warunków syntezy wiązania peptydowego obejmowały dobór: rozpuszczalników do syntezy, czasu reakcji niezbędny do dobudowania kolejnych reszt aminokwasowych, liczby powtórzeń cykli sprzęgania oraz warunków deprotekcji, zarówno grupy Fmoc jak również grup ochronnych łańcuchów bocznych. W ramach tych prac stwierdziłam, że optymalne są następujące warunki:

- **etap preaktywacji** – synteza estru triazynowego Fmoc-blokowanego aminokwasu przy użyciu DMT/MMM/TosO⁻ w dimetyloformamidzie (DMF) lub *N*-metylopirolidonie (NMP) jako rozpuszczalniku; czas reakcji od 2 do 6 min; stosowana amina trzeciorzędowa: *N*-metylomorfolina (MMM) lub diizopropyletyloamina (DIPEA);
- **etap sprzęgania** - reakcja sprzęgania aktywowanego aminokwasu z grupą aminową aminokwasu/peptydu lub grupą aminową *m*-fenylenodiaminy (łącznik A), czas reakcji 3-5 min, 4 powtórzenia;
- **etap deprotekcji grupy Fmoc** - 25% roztwór piperydyny w DMF (czas 15 min).

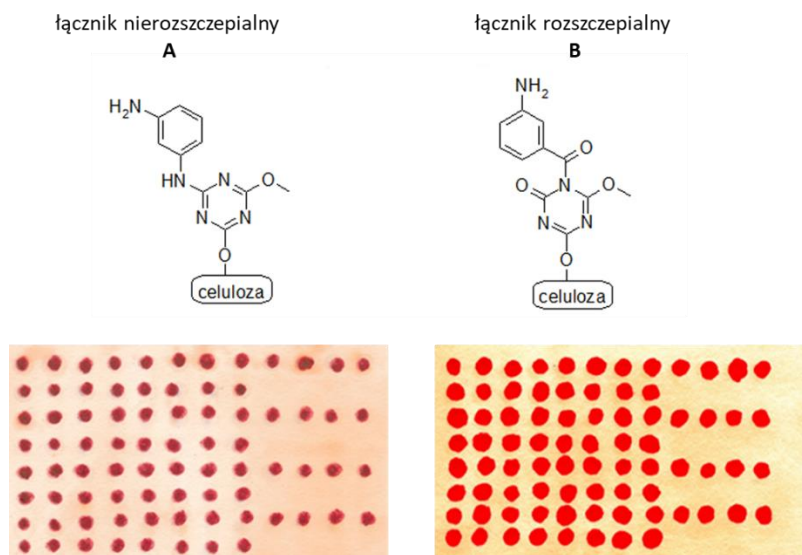
W syntezie *N*-lipidowanych peptydów immobilizowanych na celulozie, ostatnim etapem jest dobudowywanie reszty kwasu tłuszczowego. Stwierdziłam, że optymalne jest prowadzenie aktywacji przy użyciu DMT/MMM/TosO⁻ poza syntezatorem, z uwagi na znacząco dłuższy czas aktywacji długołańcuchowych kwasów tłuszczowych (wydłużony nawet do 2 godz.) w porównaniu do białkowych *N*-chronionych aminokwasów. Bezpośrednie zastosowanie roztworu superaktywnego estru triazynowego kwasu tłuszczowego jako reagenta w synteзаторze i w tej postaci jego wprowadzenie na zdefiniowane miejsca matrycy celulozowej okazało się niekorzystne. Wyznaczony eksperymentalnie czas sprzęgania z grupą aminową *N*-terminalnego aminokwasu wynosi 7.5 minuty. Zoptymalizowane warunki zastosowałam w syntezie biblioteki di-, tri-, tetra- oraz pentapeptydów z wykorzystaniem obydwu typów łączników.



Pozycja	Sekwencja	Pozycja	Sekwencja	Pozycja	Sekwencja	Pozycja	Sekwencja
A 1	A-A	C 1	A-V-A	E 1	A-A-V-A	G 1	A-V-A-V-A
A 2	A-R	C 2	A-Y-R	E 2	A-R-Y-R	G 2	A-Y-R-Y-R
A 3	A-N	C 3	A-W-N	E 3	A-N-W-N	G 3	A-W-N-W-N
A 4	A-D	C 4	A-T-D	E 4	A-D-T-D	G 4	A-T-D-T-D
A 5	A-C	C 5	A-S-C	E 5	A-C-S-C	G 5	A-S-C-S-C
A 6	A-Q	C 6	A-P-Q	E 6	A-Q-P-Q	G 6	A-P-Q-P-Q
A 7	A-E	C 7	A-F-E	E 7	A-E-F-E	G 7	A-F-E-F-E
A 8	A-G	C 8	A-M-G	E 8	A-G-M-G	G 8	A-M-G-M-G
A 9	A-H	C 9	A-K-H	E 9	A-H-K-H	G 9	A-K-H-K-H
A10	A-I	C10	A-L-I	E10	A-I-L-I	G10	A-L-I-L-I
A11	A-L	C11	A-I-L	E11	A-L-I-L	G11	A-I-L-I-L
A12	A-K	C12	A-H-K	E12	A-K-H-K	G12	A-H-K-H-K
B 1	A-M	D 1	A-G-M	F 1	A-M-G-M	H 1	A-G-M-G-M
B 2	A-F	D 2	A-E-F	F 2	A-F-E-F	H 2	A-E-F-E-F
B 3	A-P	D 3	A-Q-P	F 3	A-P-Q-P	H 3	A-Q-P-Q-P
B 4	A-S	D 4	A-C-S	F 4	A-S-C-S	H 4	A-C-S-C-S
B 5	A-T	D 5	A-D-T	F 5	A-T-D-T	H 5	A-D-T-D-T
B 6	A-W	D 6	A-N-W	F 6	A-W-N-W	H 6	A-N-W-N-W
B 7	A-Y	D 7	A-R-Y	F 7	A-Y-R-Y	H 7	A-R-Y-R-Y
B 8	A-V	D 8	A-A-V	F 8	A-V-A-V	H 8	A-A-V-A-V

Rysunek 6. Struktury biblioteki di-, tri, tetra- i pepntapeptydów wraz z ich rozmieszczeniem na arkuszu celulozowym otrzymane z wykorzystaniem opracowanego protokołu syntetycznego.

W celu sprawdzenia, czy opracowany protokół syntetyczny pozwala na efektywną syntezę bibliotek immobilizowanych peptydów, *N*-terminalne reszty aminokwasów poddałam acylowaniu za pomocą DABCYL-u, co finalnie pozwolić miało na sprawdzenie, czy wszystkie peptydy są równomiernie acylowane przez barwny kwas. Przeprowadzone testy (Rysunek 7) potwierdziły, że opracowana metoda syntezy peptydów immobilizowanych na modyfikowanej łącznikiem A i B celulozie, pozwala na efektywną syntezę bibliotek peptydów.



Rysunek 7. Zdjęcia matryc celulozowych z zsyntezowanymi peptydami poddanych reakcji z DABCYLEM przyłączonych do podłoża poprzez łącznik typu A i B.

W przypadku biblioteki peptydów zakotwiczonych na celulozie za pomocą łącznika B możliwe jest ich odszczepienie od podłoża za pomocą 1 M roztworu LiOH. Dla 20 peptydów z biblioteki ich struktura została potwierdzona za pomocą LC-MS. Czystość surowych peptydów (po odsoleniu), odszczepionych od celulozy oznaczyłam za pomocą HPLC i stwierdziłam, że zawarta była w przedziale 87÷99%.

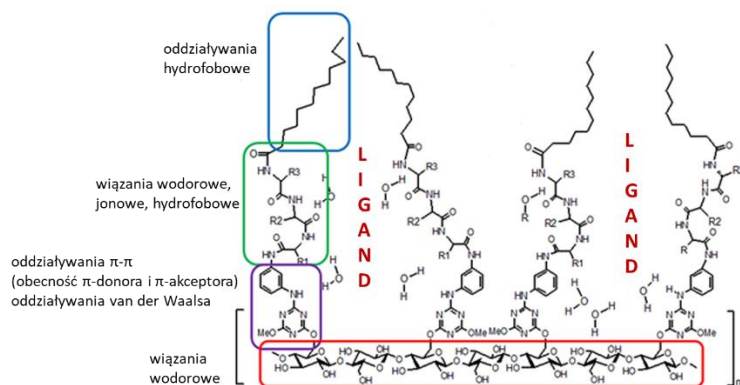
Tabela 1. Struktura, czystość oraz m/z 20 peptydów z 80 elementowej biblioteki di-, tri-, tetra- pentapeptydów.

Struktura peptydu	Symbol/ pozycja	Czystość [%]	[M] obliczone	[M] znajdzone
A-A- <i>m</i> -kwas aminobenzoesowy	A1	96	279.2909	280.1622 [M + H] ⁺
A-E- <i>m</i> -kwas aminobenzoesowy	A7	98	337.3299	338.1422 [M + H] ⁺
A-I- <i>m</i> -kwas aminobenzoesowy	A10	92	321.3689	322.1821 [M + H] ⁺
A-S- <i>m</i> -kwas aminobenzoesowy	B4	99	295.2892	296.1589 [M + H] ⁺
A-V- <i>m</i> -kwas aminobenzoesowy	B8	87	307.3433	308.1932 [M + H] ⁺
A-T-D- <i>m</i> -kwas aminobenzoesowy	C4	98	424.4070	425.1756 [M + H] ⁺
A-M-G- <i>m</i> -kwas aminobenzoesowy	C8	89	396.4593	397.1598 [M + H] ⁺
A-I-L- <i>m</i> -kwas aminobenzoesowy	C11	98	434.5272	435.2715 [M + H] ⁺
A-E-F- <i>m</i> -kwas aminobenzoesowy	D2	99	484.4499	485.2107 [M + H] ⁺
A-D-T- <i>m</i> -kwas aminobenzoesowy	D5	93	424.4019	425.1765 [M + H] ⁺
A-C-S-C- <i>m</i> -kwas aminobenzoesowy	E5	97	501.5742	502.1454 [M + H] ⁺
A-I-L-I- <i>m</i> -kwas aminobenzoesowy	E10	99	547.7044	548.3545 [M + H] ⁺
A-M-G-M- <i>m</i> -kwas aminobenzoesowy	F1	99	527.9564	528.2043 [M + H] ⁺
A-S-C-S- <i>m</i> -kwas aminobenzoesowy	F4	98	485.5082	486.1735 [M + H] ⁺
A-V-A-V- <i>m</i> -kwas aminobenzoesowy	F8	98	477.5515	478.2733 [M + H] ⁺
A-V-A-V-A- <i>m</i> -kwas aminobenzoesowy	G1	99	548.6290	549.3091 [M + H] ⁺
A-S-C-S-C- <i>m</i> -kwas aminobenzoesowy	G5	98	588.6507	589.1967 [M + H] ⁺
A-M-G-M-G- <i>m</i> -kwas aminobenzoesowy	G8	99	584.8758	585.2272 [M + H] ⁺
A-I-L-I-L- <i>m</i> -kwas aminobenzoesowy	G11	99	660.8416	661.4400 [M + H] ⁺
A-A-V-A-V- <i>m</i> -kwas aminobenzoesowy	H8	99	548.6290	549.3114 [M + H] ⁺

Stwierdziłam również, że opracowana procedura automatycznej syntezy SPOT z wykorzystaniem łączników triazynowych pozwala na efektywną syntezę *N*-lipidowanych peptydów. Analiza MS potwierdziła obecność sygnałów m/z odpowiadających $[M + H]^+$ peptydów: *N*-heptanolio-V-F-A-*m*-kwas aminobenzoesowy, *N*-heptanolio-V-F-D-A-*m*-kwas aminobenzoesowy, *N*-heptanolio-V-D-F-S-A-*m*-kwas aminobenzoesowy, *N*-heptanolio-V-Y-T-L-V-P-*m*-kwas aminobenzoesowy, *N*-heptanolio-V-L-K-R-D-H-A-*m*-kwas aminobenzoesowy oraz *N*-heptanolio-V-L-K-R-D-H-A-*m*-kwas aminobenzoesowy. Celuloza modyfikowana łącznikiem typu B, w którym reszta kwasu *m*-aminobenzoesowego została zastąpiona resztą glicyny lub β -alaniny znalazła już zastosowanie w badaniach nad poszukiwaniem aktywnych biologicznie fragmentów białek. Opracowane rozwiązanie zostało zastosowane w badaniach nad poszukiwaniem aktywnych biologicznie fragmentów ureaz patogenów i ich wpływu na rozwój chorób o podłożu autoimmunologicznym (prace A10, A17, A22, C10, C14, C16, C17, C18 po uzyskaniu stopnia doktora, nie wchodzące w skład niniejszego postępowania habilitacyjnego). Rozwiązanie to obecnie jest wykorzystywane w badaniach realizowanych w ramach projektu (UMO-2015/19/B/ST8/02594: pt. "Innowacyjne materiały hybrydowe do regeneracji tkanek wywodzące się wyłącznie ze związków naturalnych", w który jestem głównym wykonawcą) nad poszukiwaniem fragmentów kolagenu, aktyny i elastyny, użytecznych w medycynie regeneracyjnej. Moje zainteresowania skupione były na zbadaniu potencjału aplikacyjnego bibliotek/macierzy *N*-lipidowanych peptydów osadzonych na podłożu celulozowym poprzez łącznik typu A, który zawiera resztę 1,3,5-triazyny i *m*-fenylenodiaminy tożsamej z układem, dla którego potwierdzona została już zdolność wiązania ligandów (aktywność sztucznych receptorów).

V. ZASTOSOWANIE BIBLIOTEK MACIERZY RECEPTORÓW MOLEKULARNYCH OTRZYMANYCH METODĄ Z ŁĄCZNIKIEM TRIAZINOWYM TYPU A

Głównym przesłaniem realizowanych przeze mnie badań nad funkcjonalizacją powierzchni materiałów stałych było nadanie im odpowiednich właściwości użytkowych (praca **H13**). Materiały charakteryzujące się pożądanymi właściwościami użytkowymi tworzyłam w procesie projektowania struktury, wytworzenia i następnie sprawdzenia ich właściwości. We wcześniejszych badaniach stwierdziłam, że *N*-lipidowane peptydy immobilizowane na powierzchni celulozy zdolne są do wiązania ligandów w przestrzeniach pomiędzy tak utworzonymi podandami i tym samym tworzenia w sposób odwracalnych kompleksów supramolekularnych, w których ligand związany jest oddziaływaniami słabymi. Układy te przypominają swoim działaniem receptory, stąd zaproponowałam nazwanie ich receptorami molekularnymi. Przyjęłam, że kluczowe jest projektowanie struktur podandów w taki sposób, aby mogły tworzyć jak największą ilość różnorodnych słabych oddziaływań, oczekując, że finalnie pozwoli mi to na uzyskanie kompleksów gość-gospodarz stabilnych energetycznie.

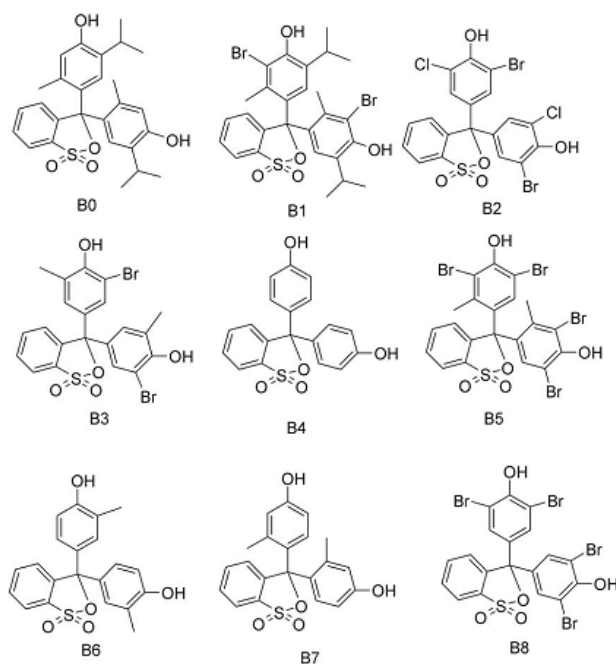


Rysunek 8. Struktura receptorów molekularnych immobilizowanych na podłożu celulozowym umożliwiającą wiązanie ligandów za pomocą różnorodnych oddziaływań słabych.

Obecność w strukturze łącznika fragmentów π -akceptorowych oraz π -donorowych umożliwia tworzenie oddziaływań typu π - π z ligandem. Fragment peptydowy, z którego można usunąć grupy ochronne w łańcuchach bocznych, pozwala na tworzenie wiązań jonowych, wodorowych, hydrofobowych oraz dodatkowych oddziaływań typu π - π w przypadku obecności w łańcuchu peptydowym reszt aromatycznych aminokwasów. Źródłem wiązań wodorowych z ligandem jest też matryca polisacharydowa, na której osadzone są podandy. Reszty kwasów tłuszczowych zapewniają możliwość oddziaływań hydrofobowych z ligandem. Stwierdziłam, zgodnie z oczekiwaniami, że podandy immobilizowane na podłożu celulozowym, tworzące receptory molekularne, posiadają zdolność tworzenia kompleksów molekularnych z różnymi ligandami: począwszy od barwników, poprzez związki aktywne biologicznie (zarówno potencjalne leki jak i związki o udokumentowanej już aktywności biologicznej) a skończywszy na składnikach złożonych mieszanin, będących płynami fizjologicznymi lub homogenatami tkanek.

V.1. Zastosowanie biblioteki receptorów molekularnych do wiązania związków aktywnych biologicznie (potencjalnych leków)

Badania rozpoczęłam od zastosowania modelowych barwników jako ligandów (praca **H1**). Zastosowałam pulę ośmiu barwników tryfenylometylowych o zróżnicowanych podstawnikach pierścieni fenylowych. Obserwowałam znaczne zróżnicowanie zdolności wiązania ligandów do receptorów molekularnych. Jedynie w przypadku ligandu B0, zawierającego przestrzennie rozbudowane podstawniki elektrodonorowe w postaci podstawników izopropylowych, dwóch grup metylowych i jedynie dwóch grupy hydroksylowych warunkujących tworzenie wiązań wodorowych, nie obserwowałam tworzenia kompleksów molekularnych z biblioteką receptorów molekularnych. Stwierdziłam, że wprowadzenie halogenów w strukturę ligandów znacznie poprawia zdolność oddziaływania wnętrza wiążąca - ligand.



Rysunek 9. Struktury barwników B0-B8 zastosowanych jako modelowe ligandy.

Na podstawie analizy SAR (*Structure Active Relationship*) wykazałam, że zdecydowanie większy wpływ na zdolność wiązania ligandów ma fragment aminokwasowy/peptydowy niż reszta kwasu tłuszczowego. Obserwacja ta była potwierdzona zarówno dla długołańcuchowych kwasów tłuszczowych: kwas erukowy, kwas rycynowy, kwas elaidikowy, kwas oleinowy, kwas stearynowy, kwas 10-undecenowy, jak i kwasów karboksylowych, zawierających niewielki podstawnik: kwas 2-metylocynamonowy, kwas 2-fenylomasłowy, kwas 2,2-dimetylopropionowy, kwas 2-etyloheksanowy, kwas heptanowy, kwas heksanowy, kwas pentanowy. Uzyskany wynik stanowił przesłankę do bardziej racjonalnego projektowania kolejnych generacji bibliotek receptorów molekularnych.

Podjęłam również próby sprawdzenia, czy biblioteki receptorów molekularnych mogą być zastosowane do badania substancji aktywnych, które mogą być potencjalnymi lekami. Oczekiwałam, że finalnie możliwe będzie otrzymanie nowych platform badawczych, użytecznych w testowaniu leków oraz że platformy takie stanowiąc będą mogły uzupełnienie zestawu testów wykonywanych na etapie badań przedklinicznych, co finalnie powinno pozwolić na poprawę efektywności selekcji właściwych związków do badań klinicznych.

Badania rozpocząłam od zaprojektowania i otrzymania randomizowanej biblioteki dipeptydów, zawierającej w pozycji *N*-terminalnej wszystkie naturalne aminokwasy, zaś w pozycji *C*-terminalnej resztę alaniny, proliny i fenyloalaniny (praca **H9**). Do finalnego *N*-lipidowania zastosowałam kwas dekanowy i heptanowy. Zsyntezowane biblioteki receptorów molekularnych wykorzystałam do sprawdzenia zdolności wiązania z pulą 20 pochodnych o potwierdzonej aktywności przeciwnowotworowej, zawierających ugrupowanie 2-chloroetyloaminowe, warunkujące aktywność alkilującą oraz rdzeń 1,3,5-triazynowy podstawiony grupami alkilo- i aryloaminowymi, który również

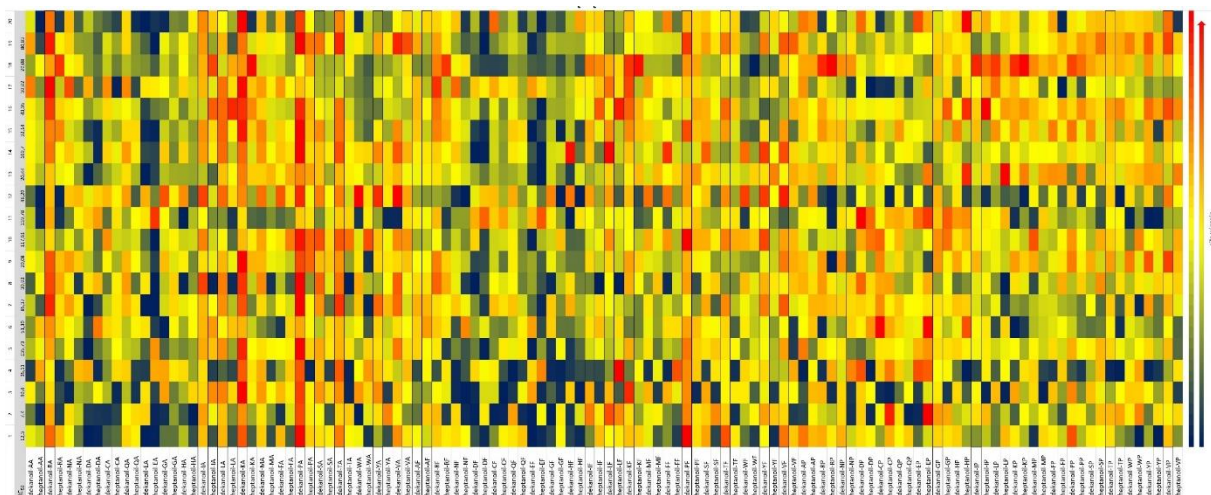
z wysoką częstotliwością występuje w składzie innych związków obdarzonych aktywnością przeciwnowotworową [19]. Ich synteza oraz testy aktywności przeciwnowotworowej są przedmiotem dwóch prac A14 i A21 (po doktoracie, które nie wchodzą bezpośrednio w skład mojej rozprawy habilitacyjnej).

Tabela 2. Struktury oraz wartości IC_{50} 20 triazynowych pochodnych zawierających ugrupowanie 2-chloroetyloaminowe dokowanych do wnęk wiążących biblioteki receptorów molekularnych. Wartości IC_{50} wyznaczone zostały dla linii komórkowej MCF-7.

Związek	Struktura	IC_{50} [μ M]	Związek.	Struktura	IC_{50} [μ M]
1.		12.30	11		139.78
2.		7.40	12.		46.29
3.		49.40	13.		20.44
4.		35.11	14.		169.7
5.		135.73	15.		32.14

6.		51.39	16.		43.95
7.		85.37	17.		111.81
8.		30.02	18.		30.92
9.		29.08	19.		80.83
10.		117.61	20.		33.85

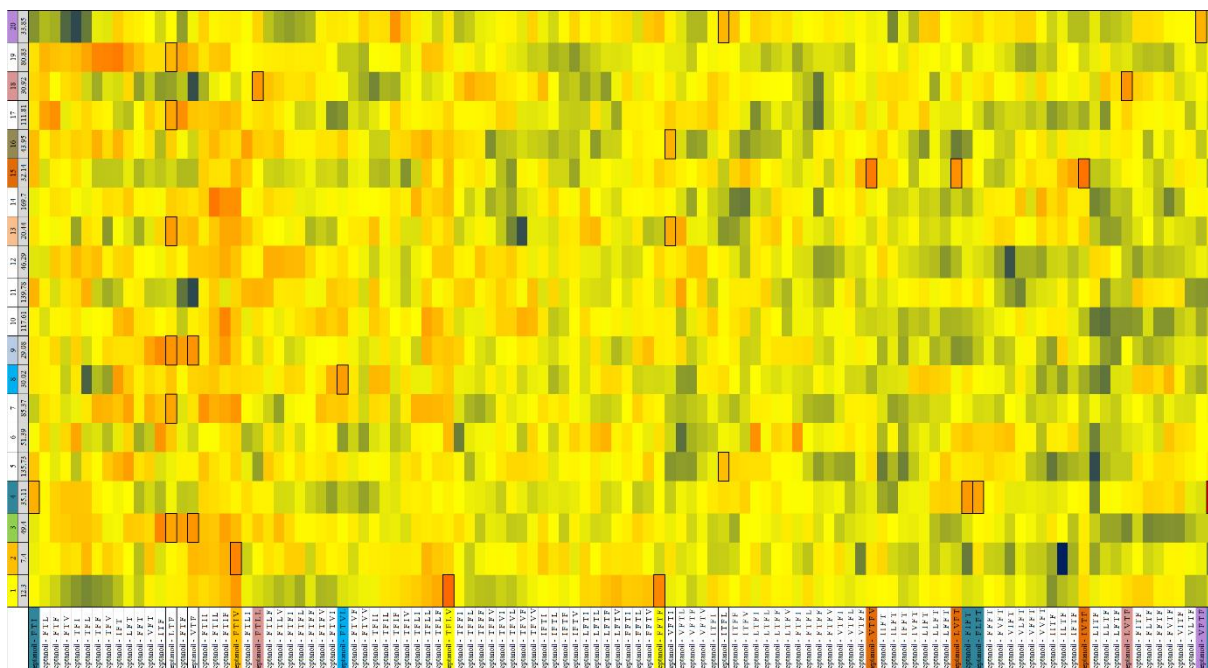
Stosując uprzednio opracowaną metodę wizualizacji wiązania bezbarwnych ligandów przez receptory molekularne za pomocą związków reporterowych (czern brylantowa) stwierdziłam, że testowane pochodne wykazują silnie zróżnicowane powinowactwo do biblioteki receptorów molekularnych.



Rysunek 10. Mapa oddziaływań triazynowych pochodnych chloroetyloaminowych 1-20 z biblioteką receptorów molekularnych. Czerwone pole oznacza brak wypierania ligandu przez barwnik, czyli silny kompleks molekularny, niebieskie pole - silne wypierania ligandu przez barwnik, czyli słaby kompleks molekularny.

Z puli testowanych 120 receptorów molekularnych, zdolność wiązania związków o zbadanej aktywności przeciwnowotworowej posiadały receptory molekularne zawierające jako *N*-lipidowane dipeptydy struktury: dekanolo-ArgAla, dekanolo-SerAla, dekanolo-ThrAla, dekanolo-LysAla, dekanolo-TyrAla, dekanolo-IleAla, dekanolo-LeuAla, dekanolo-ProAla, heptanolo-ValAla, dekanolo-ProPhe, heptanolo-AlaPhe, dekanolo-ThrPhe, dekanolo-LysPhe, dekanolo-IlePhe, dekanolo-TyrPhe, dekanolo-ValPhe, dekanolo-LeuPhe, dekanolo-ThrPro, dekanolo-AsnPro, dekanolo-ValPro, dekanolo-GlyPro oraz dekanolo-IlePro.

W oparciu o wyniki wstępnych badań zaprojektowałam bibliotekę drugiej generacji, z której wyeliminowałam aminokwasy polarne: arginę, lizynę oraz serynę (praca C20). Do badań zsyntezowałam macierz receptorów molekularnych o strukturze: Lipid-Aaa³-Aaa²-Aaa¹-łącznik-celuloza oraz Lipid-Aaa⁴-Aaa³-Aaa²-Aaa¹-łącznik-celuloza, gdzie Aaa⁴, Aaa³, Aaa², Aaa¹: I, L, V, F, FT (to stały fragment), zaś jako lipid użyłam kwas *n*-heptanowy. Wybór aminokwasów do tworzenia wnęk wiążących nie był przypadkowy, lecz inspirowany budową hydrofobowej wnęki wiążącej ATP-azy. Takie podejście pozwalało na dokonanie oceny poprawności opisanej w literaturze hipotezy [20] postulującej, że aktywność cytostatyczna badanych pochodnych uwarunkowana jest blokowaniem wnęki wiążącej ATP-azy. Należy dodać, że opublikowane prace wskazują również na inne miejsca działania pochodnych 1,3,5-triazyn o aktywności przeciwnowotworowej, jednak do chwili obecnej nie zostało do końca wyjaśnione, jaki jest mechanizm ich działania.



Rysunek 11. Mapa oddziaływań związków 1-20 z biblioteką drugiej generacji receptorów molekularnych zawierających jako fragmenty peptydowe tri- i tetrapeptydy będące kombinacją reszt aminokwasowych hydrofobowej wnęki ATP-azy. Czerwone pole oznacza brak wypierania ligandu przez barwnik, czyli silny kompleks molekularny, niebieskie pole - silne wypierania ligandu przez barwnik, czyli słaby kompleks molekularny.

Stwierdziłam, że biblioteka drugiej generacji pozwala na wyselekcjonowanie pól, które znacząco silniej oddziałują z pojedynczym ligandem w porównaniu do pozostałych dokowanych pochodnych. Zestawienie najsilniej wiążących struktur receptorów molekularnych zawarte jest w tabeli 3.

Tabela 3. Zestawienie najbardziej selektywnych receptorów molekularnych pozwalających na efektywne wiązanie badanych pochodnych 1-20.

Struktura fragmentu peptydowego wnęki wiążącej	Numer dokowanego związku
PheThrIle	4
PheThrIleVal	2
PheThrLeuLeu	18
PheThrValLeu	8
ThrPheLeuVal	1
PhePheThrPhe	1
ValPheThrIle	13, 16
IleThrPheLeu	5, 20
ValThrPheVal	15
LeuValPheThr	15
PhellePheThr	4
PheLeuPheThr	4
IleValThrPhe	15
LeuValThrPhe	18
ValPheThrPhe	20
ValValThrPhe	4

We współpracy z grupą badawczą z Uniwersytetu Śląskiego podjęte zostały również próby zdefiniowania właściwości farmakoforowych testowanych związków 1-20 za pomocą takich narzędzi obliczeniowych jak: sprzężona sieć neuronowa, metoda częściowych najmniejszych kwadratów z iteracyjną zmienną eliminacją (IVE-PLS), metoda PCA, wyznaczenie powierzchni molekularnej ligandów metodą porównawczej analizy powierzchni molekularnej (CoMSA). Przeprowadzone kompleksowe badania uwzględniające strukturę ligandu, jego aktywność przeciwnowotworową, strukturę receptora molekularnego oraz siłę wiązania ligandu pozwoliły na pogłębione zbadanie działania receptorów molekularnych będących *N*-lipidowanymi peptydami. Badania te wskazywały, że podejście to będzie można wykorzystać nie tylko w badaniach przesiewowych nad nowymi lekami, ale również w projektowaniu układów do inteligentnego systemu dostarczania leków.

Uzyskane wyniki badań skłoniły mnie do podjęcia prób dokowania do wnęk wiążących receptorów molekularnych również innych związków, które mają zdefiniowaną aktywność farmakologiczną. Oczekiwałam, że działanie takie pozwoli na ocenę, w jakim stopniu obrany kierunek badawczy jest rozwojowy i czy możliwe będzie opracowanie na tej drodze nowego narzędzia badawczego, które mogłoby być zastosowane w badaniach przesiewowych potencjalnych leków. W ramach podjętych badań (praca **H4**) jako ligandy zastosowana została pula związków oddziałujących na receptor histaminowy H₃ o udowodnionej i zróżnicowanej aktywności (związki zsyntezowane i zbadane pod kątem aktywności biologicznej w zespole prof. K. Kieć-Kononowicz z Uniwersytetu Jagiellońskiego). Do badań tych zaprojektowałam oraz otrzymałam randomizowaną 147-mio elementową bibliotekę *N*-lipidowanych dipeptydów, w której fragment peptydowy złożony był z reszt: Ala, Trp, Pro, Glu, His, Lys oraz Ser. Projektując bibliotekę receptorów molekularnych przyjąłam, że zastosowane zostaną aminokwasy zawierające w łańcuchach bocznych następujące grupy funkcyjne: kwasową, zasadową, grupę hydroksylową oraz podstawnik aromatyczny. Oczekiwałam, że obecność tych grup w łańcuchach bocznych aminokwasów pozwoli mi na poznanie zależności pomiędzy strukturą receptora molekularnego, a strukturą substancji aktywnej farmakologicznie. Skorelowanie tych zmiennych powinno umożliwić racjonalne projektowanie struktur macierzy peptydowych, stosowanych w przesiewowych badaniach substancji aktywnych. Jako ligandy zastosowałam pulę 33 związków o zróżnicowanej aktywności wobec receptora histaminowego H₃ oraz o zróżnicowanej budowie i lipofilowości. Wśród 33 przebadanych związków wyróżnić można 3 grupy: acylowe pochodne piperazyny, pochodne zawierające ugrupowanie bipiperydynowe oraz podstawione lub niepodstawione pochodne zawierające jedną resztę piperydyny. W wyniku dokowania 33 ligandów do 147-mio elementowej macierzy *N*-lipidowanych peptydów otrzymałam 4 851 kompleksów molekularnych, złożonych z ligandu i receptora molekularnego. Analiza tak ogromnej ilości danych jest wyjątkowo trudna i poszukiwanie korelacji pomiędzy budową wnęki wiążącej, strukturą ligandu, jego aktywnością biologiczną oraz zdolnością oddziaływania z *N*-lipidowanymi peptydami jest praktycznie

niemożliwa bez zastosowania odpowiednich narzędzi statystycznych i chemometrycznych. W poszukiwaniu korelacji pomiędzy wyżej wymienionymi zmiennymi zastosowane zostały: metoda głównych składowych PCA (*Principal Component Analysis*) oraz metoda cząstkowych najmniejszych kwadratów PLS (*Partial Least Squares Analysis*). Stwierdziliśmy, że macierze *N*-lipidowanych peptydów immobilizowanych na modyfikowanej matrycy celulozowej tworzą kompleksy molekularne z ligandami o zróżnicowanej budowie i aktywności oraz to co najważniejsze, że możliwe jest wyselekcjonowanie receptorów molekularnych, które „rozdzielają” lipofilowość ligandów zawierających te same farmakofory. Analizując wpływ budowy receptorów molekularnych na zdolność „rozdzielania” aktywności biologicznej wiązanych ligandów stwierdzone zostało, że peptydy zawierające resztę kwasu glutaminowego posiadają zdolność rozdzielania aktywności farmakologicznej ligandów. Obserwacja ta jest zgodna z danymi literaturowymi, dotyczącymi wpływu reszty kwasu glutaminowego na zdolność wiązania antagonistów receptora H3 [21].

Wyniki te stanowiły przesłankę do rozszerzenia zakresu badań nad wykorzystaniem bibliotek receptorów molekularnych do badania oddziaływania z innymi związkami aktywnymi biologicznie. Oczekiwałam, że badania powinny pozwolić na skorelowanie zależności rządzących siłą oddziaływania farmakologicznie aktywnych związków z modelem wnęki wiążącej receptorów, a tym samym na poznanie łańcucha zależności pomiędzy strukturą receptora molekularnego – strukturą substancji aktywnej farmakologicznie – trwałością kompleksu molekularnego gość-gospodarz oraz aktywnością biologiczną gościa. Skorelowanie tych czterech zmiennych powinno skutkować zidentyfikowaniem struktur receptorowych oddziałujących selektywnie z agonistami bądź antagonistami, co z kolei powinno przełożyć się na możliwość stworzenia narzędzia do wstępnych badań nad nowymi lekami działającymi na receptory histaminowe. Opracowane rozwiązanie zostało z powodzeniem wykorzystane w badaniach nad projektowaniem i syntezą macierzy receptorów molekularnych, zbudowanych z *N*-lipidowanych peptydów immobilizowanych na celulozie, o strukturze pierwszorzędowej mimikującej stałe fragmenty receptorów histaminowych oraz sprawdzeniu ich użyteczności w oddziaływaniach ze znanymi agonistami i antagonistami tej klasy receptorów. Badania te prowadzone były w ramach pracy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Walczak pt. „Projektowanie, synteza i zastosowanie macierzy receptorów molekularnych w badaniach profilu wiązania leków działających na receptory histaminowe H1-H4”, gdzie pełniłam funkcję promotora pomocniczego. Mając na uwadze złożoność receptorów histaminowych, które należą do grupy 7 TM receptorów sprzężonych z białkiem G przyjęto, że przy projektowaniu macierzy receptorów molekularnych uwzględnione zostaną przesłanki literaturowe wskazujące, które fragmenty białek receptorowych są zaangażowane w wiązanie zarówno agonistów, jak i antagonistów receptorów H1-H4 [22]. Otrzymane zostały więc 4 biblioteki receptorów molekularnych, przy których projektowaniu przyjęto następujące założenia:

1. biblioteka będąca kombinacją reszt aminokwasowych D, (S, D, T, A) F odpowiedzialnych za wiązanie zarówno histaminy jak i agonistów/antagonistów w receptorach H1-H4, w której stałymi aminokwasami są: kwas asparaginowy oraz fenyloalanina, natomiast reszty seryny, kwasu asparaginowego, treoniny i alaniny stanowią element zmienny;
2. biblioteka będąca permutacją stałego dla receptorów związanych z białkiem G motywu (DE)RY obecnego w transmembranowej helisie III, przy czym we fragmencie tym zawsze występować miały reszty argininy i tyrozyny, natomiast reszty kwasu asparaginowego i glutaminowego stanowią element zmienny;
3. biblioteka będąca permutacją stałego dla receptorów H1-H4 motywu CWxP helisy VI;
4. biblioteka będąca permutacją stałego dla receptorów H1-H4 motywu NPxxY helisy VII.

Jako ligandy zastosowane zostały: histamina (naturalny ligand receptorów histaminowych) oraz pula 11 związków o udokumentowanej aktywności agonistycznej i antagonistycznej względem receptorów histaminowych (H1-H4).

Stwierdzone zostało, że z każdej macierzy receptorów molekularnych możliwe jest wyselekcjonowanie receptorów wykazujących zdolność specyficznego oddziaływania ze zróżnicowanymi pod względem aktywności lekami, które dodatkowo wykazują selektywność względem leków działających na różne typy receptorów histaminowych. Wyselekcjonowane zostały receptory molekularne rozróżniające typy receptorów histaminowych oraz rozróżniające aktywność agonistyczną i odpowiednio antagonistyczną testowanych leków. Wykonana analiza statystyczna zebranych wyników metodą aglomeracyjną oraz metodą głównych składowych potwierdziła znamienność stwierdzonych korelacji. Fakt ten stanowi przesłanki do podjęcia prób wykorzystania opracowanego rozwiązania, jako nowego narzędzia badawczego i zastosowanie platform receptorów molekularnych do wstępnych badań przesiewowych. Wykorzystanie proponowanej platformy może stanowić uzupełniającą metodykę badawczą, która może się lokować pomiędzy typowymi badaniami *in silico* a badaniami *in vitro*, rozszerzając tym samym zestaw alternatywnych metod stosowanych w procesie poszukiwania nowych leków.

V.2. Zastosowanie bibliotek receptorów molekularnych do rozróżniania składu metabolitów zawartych w płynach ustrojowych

Monitorowanie składników metabolomu jest obecnie uznawane za wysoce uniwersalne narzędzie diagnostyki medycznej [23]. Nowoczesne metody analityczne coraz częściej wykorzystywane są w badaniu metabolomu, pozwalając na badanie jakościowe i ilościowe metabolitów, umożliwiając na identyfikację specyficznych markerów.

Pomyślne wyniki badań nad zdolnością wiązania zróżnicowanych strukturalnie ligandów przez wnęki wiążące receptorów molekularnych skłoniły mnie do podjęcia prób zastosowania bibliotek receptorów molekularnych do poszukiwania nowych markerów diagnostycznych. Oczekiwałam również, że wykorzystanie bibliotek receptorów molekularnych umożliwi mi nie tylko rozróżnianie stanów chorobowych od dobrostanu fizjologicznego, ale również możliwe będzie monitorowanie rozwoju choroby oraz cofania stanu patologicznego w wyniku podjętego leczenia. Mając świadomość, że istnieć mogą ograniczenia w powiększeniu rozmiaru wnęki wiążącej receptorów molekularnych połączonych z matrycą celulozową poprzez nierozszczepialny łącznik typu A, prace syntetyczne skoncentrowałam na poszukiwaniu markerów diagnostycznych w puli niskocząsteczkowych metabolitów. Wśród wielu korzyści wynikających z badań nad metabolomem, szczególne znaczenie miało opracowanie wysokowydajnych metod gromadzenia zbiorów danych, co pozwala na coraz częstsze zastępowanie pojedynczego testu tzw. chemicznym odciskiem palca poszczególnych jednostek chorobowych (*chemical fingerprint of diseases*) [24]. Szczególnie duże nadzieje wiąże się z zastosowaniu tego podejścia do diagnostyki chorób nowotworowych. Obserwuje się duże zainteresowanie poznaniem, w jaki sposób komórki nowotworowe zmieniają metabolizm komórkowy, czy zmiany te wpływają na proliferację i wzrost guza oraz ustalenia jakie czynniki powodują tę zmienność [25] z jednoczesnym uwzględnieniem heterogeniczność komórek nowotworowych, co z kolei przekłada się na trafność diagnozy i właściwy dobór terapii.

Przyjęłam, że w swoich badaniach jako płyny fizjologiczne stosować będę: mocz, niskocząsteczkowy homogenat tkankowy oraz płyn pobierany z rdzenia kręgowego. Wybór tych właśnie płynów fizjologicznych, z uwagi na złożoność ich składu, niesie oczywiście ze sobą ryzyko niepowodzenia. Z drugiej jednak strony opracowanie narzędzia przydatnego do prostych testów diagnostycznych, które mogłyby być wykonywane w warunkach domowych lub laboratoryjnych bez konieczności hospitalizacji i głębokiej ingerencji w organizm, jest rozwiązaniem bardziej komfortowym z punktu widzenia pacjenta. Wstępne próby zmierzające do wykorzystania sztucznych receptorów do wiązania składników homogenatu tkankowego wykonałam w trakcie realizacji pracy doktorskiej i uzyskane wstępne wyniki skłoniły mnie do kontynuowania tego kierunku badań.

W badaniach z wykorzystaniem homogenatów tkankowych zastosowałam 120-to elementową bibliotekę receptorów molekularnych, w których fragment peptydowy stanowiły dipeptydy zawierające jako C-terminalny aminokwas resztę alaniny, tryptofanu oraz proliny, zaś w pozycję N-terminalną wbudowane były wszystkie naturalne aminokwasy (praca **H7**). Fragment lipidowy stanowiła reszta kwasu rycynowego (A) oraz stearynowego (B). Próbkę homogenatów tkankowych pochodziły od 19 pacjentów po tyreoidectomii. Od każdego pacjenta pobrano dwie próbki: jedna z tkanki nowotworowej, a druga ze zdrowej tkanki.

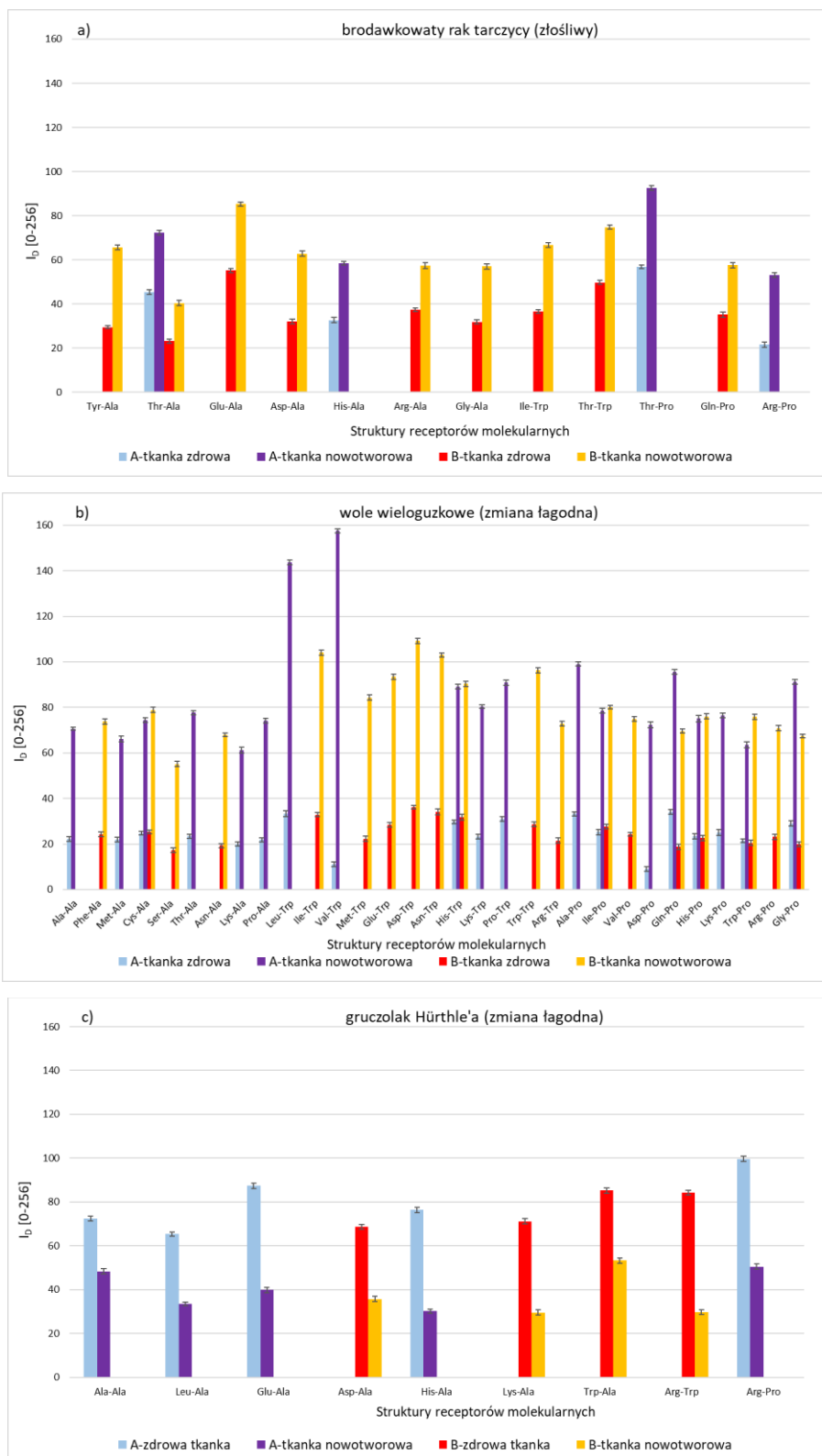
Zdolność receptorów molekularnych do oddziaływania z bezbarwnymi składnikami niskocząsteczkowej frakcji homogenatu tkankowego (I_D) wyznaczyłam jako różnicę intensywności wybarwienia (zdolność do wiązania z receptorem molekularnym) związku reporterowego (I_{Drd}) a intensywności wybarwienia po potraktowaniu receptorów molekularnych bezbarwnym analitem i następczym traktowaniu kompleksów molekularnych związkiem reporterowym (I_{Da}).

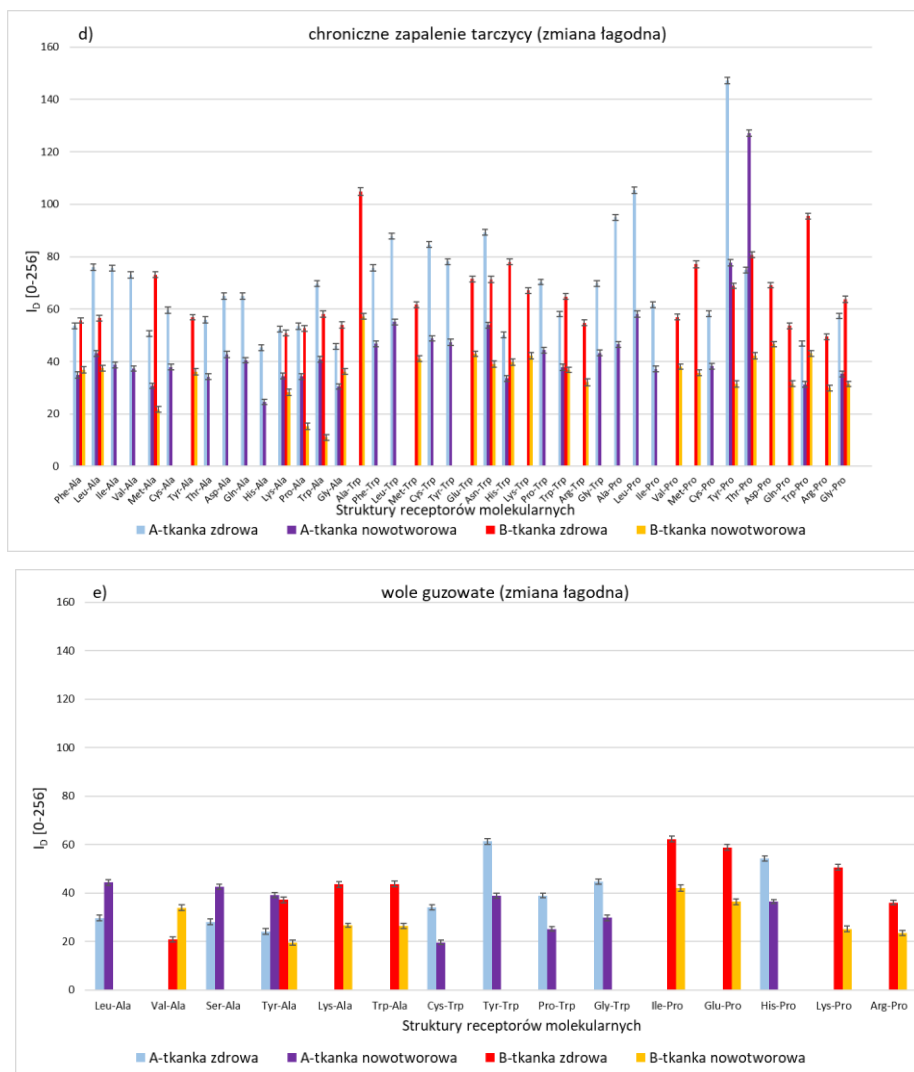
$$I_D = I_{Drd} - I_{Da}$$

I_D – intensywność wiązania ligandu mierzona w 256 stopniowej skali szarości, I_{Drd} – intensywność wybarwienia pod działaniem związku reporterowego, I_{Da} – intensywność wybarwienia po traktowaniu bezbarwnym analitem i następczym działaniu związku reporterowego.

Tak więc I_D jest proporcjonalne do ilości ligandu związanego przez receptor molekularny. Taką samą procedurę obliczenia wartości I zastosowałam przy wyznaczaniu intensywności wybarwienia receptorów molekularnych, traktowanych homogenatami tkanek zdrowych i nowotworowych. Finalnie dla każdego typu nowotworów, jak również tkanek zdrowych dookoła ogniska nowotworowego, wyznaczyłam wartości I_D^c oraz I_D^h .

Głównym celem tych badań było poszukiwanie receptorów molekularnych zdolnych do selektywnego wiązania metabolitów zawartych w homogenatch, co powinno pozwolić na znalezienie profili wiązania odróżniających homogenaty tkanki zmienionej chorobowo od homogenatu tkanki zdrowej. Przyjęłam, że badania te będą ponadto testem sprawdzającym powtarzalność opracowanego rozwiązania syntetycznego i procedur pomiarów kolorymetrycznych z użyciem barwnika reporterowego. Dlatego też wszystkie przeprowadzone testy powtórzone zostały co najmniej trzykrotnie, celem wyznaczenia wartości odchyleń standardowych. Dla zminimalizowania nadmiernie dużego zróżnicowania badanych próbek (zróżnicowanie osobnicze), homogenaty tkankowe pogrupowałam w pięć jednostek chorobowych w oparciu o diagnozę postawioną po badaniach histopatologicznych. Jednostki te obejmowały: brodawkowatego raka tarczycy (nowotwór złośliwy), wole wieloguzkowe (nowotwór łagodny), gruczolak Hürthl'a (nowotwór łagodny), chroniczne zapalenie tarczycy (zmiana łagodna) oraz wole guzowate (zmiana łagodna). Stwierdziłam, że nawet w 120-to elementowej macierzy receptorów molekularnych możliwe jest zależenie receptorów molekularnych „rozróżniających” skład homogenatu tkanki chorobowo zmienionej od homogenatu tkanki zdrowej. Przyjęłam, że dla celów diagnostycznych różnica intensywności wybarwienia musi być wyższa od 30%. Zestawienie wyselekcjonowanych receptorów molekularnych, charakteryzujących się różną selektywnością wiązania homogenatów przedstawia rysunek 12. Najbardziej spektakularną zdolność rozróżniania tkanki zdrowej od nowotworowej, przedstawiającą się największym zróżnicowaniem wartości I_D , obserwowałam dla wola wieloguzkowego. Największe różnice zaś widoczne są dla receptorów molekularnych, zawierających w pozycji C-terminalnej resztę tryptofanu (ValTrp oraz LeuTrp).





Rysunek 12. Wyselekcjonowane receptory molekularne najsilniej różnicujące homogenaty tkankowe pobrane z tkanki zdrowej oraz nowotworowej. A - reszta kwasu rycynowego, B – pochodna kwasu stearynowego.

Ważny przy tym jest fakt, że we wszystkich przypadkach wartości odchylenia standardowego są bardzo niskie, co wskazuje na wysoką powtarzalność danych. Fakt ten wynika oczywiście z identycznej procedury dokowania homogenatów, ale również przede wszystkim z wysokiej powtarzalności syntezy, wskazując jednoznacznie, że opracowana metoda gwarantuje wysoką powtarzalność, nawet przy uwzględnieniu faktu, że celuloza jest materiałem naturalnym i tym samym jej właściwości mogą być zmienne. W przypadku realizowanych przeze mnie badań zmienność celulozy przekłada się na ilości fazy krystalicznej oraz stopień polimeryzacji (długość łańcuchów polisacharydowych).

Nie ulega jednak wątpliwości, że zastosowanie do testów, jako płynu fizjologicznego, homogenatów tkankowych może być użyteczne w praktyce szpitalnej i z trudnością może być przeniesione do standardowych badań diagnostycznych. W związku z tym przeprowadziłam badania z wykorzystaniem moczu jako płynu fizjologicznego, który może być pobierany w warunkach bezinwazyjnych. We wstępnym etapie badań zastosowałam 120-to elementową bibliotekę receptorów molekularnych, identyczną jak wykorzystana uprzednio w badaniach z użyciem homogenatów tkankowych.

W badaniach zastosowałam: i) mocz zdrowych myszy C57B1/6 oraz tych samych myszy z wszczepionym rakiem okrężnicy C38, ii) mocz zdrowych myszy C3H oraz myszy z rakiem piersi 16/C, iii) mocz zdrowych myszy BDF1 oraz myszy z rakiem płuc LLC. Stwierdziłam, że w przypadku moczu jako płynu fizjologicznego, możliwe jest wyselekcjonowanie receptorów z różną intensywnością wiążących składniki płynu fizjologicznego pochodzącego od zwierząt zdrowych i chorych (praca **H5**). Najbardziej efektywne pod tym względem receptory molekularne przedstawione są poniżej w tabelach 4÷6.

Tabela 4. Receptory molekularne “rozdzielające” mocz zdrowych myszy oraz C57B1/6 oraz myszy z rakiem okrężnicy C38.

Podbiblioteka z resztą Ala w pozycji C-terminalnej	Podbiblioteka z resztą Trp w pozycji C-terminalnej	Podbiblioteka z resztą Pro w pozycji C-terminalnej
rycynoilo-Leu-Ala- rycynoilo-Ile-Ala- stearoilo-Met-Ala- rycynoilo-Tyr-Ala- stearoilo-Asp-Ala- stearoilo-Pro-Ala-	stearoilo-Ile-Trp- stearoilo-Met-Trp- stearoilo-Thr-Trp- rycynoilo-Pro-Trp- rycynoilo-Gly-Trp-	rycynoilo-Phe-Pro- stearoilo-Ile-Pro- rycynoilo-Cys-Pro- stearoilo-Ser-Pro- rycynoilo-Tyr-Pro- stearoilo-Asp-Pro- stearoilo-Arg-Pro

Tabela 5. Receptory molekularne “rozdzielające” mocz zdrowych myszy oraz C3H oraz myszy z rakiem piersi 16/C.

Podbiblioteka z resztą Ala w pozycji C-terminalnej	Podbiblioteka z resztą Trp w pozycji C-terminalnej	Podbiblioteka z resztą Pro w pozycji C-terminalnej
rycynoilo-Ala-Ala- stearoilo-Ala-Ala- stearoilo-Phe-Ala- rycynoilo-Met-Ala- stearoilo-Met-Ala- stearoilo-Cys-Ala- rycynoilo-Glu-Ala- stearoilo-Gln-Ala- stearoilo-His-Ala- rycynoilo-Pro-Ala- stearoilo-Trp-Ala-	rycynoilo-Ala-Trp- stearoilo-Ala-Trp- stearoilo-Leu-Trp- rycynoilo-Tyr-Trp- stearoilo-Tyr-Trp- rycynoilo-Thr-Trp- stearoilo-His-Trp- stearoilo-Arg-Trp- stearoilo-Gly-Trp-	rycynoilo-Leu-Pro- rycynoilo-Tyr-Pro- stearoilo-Tyr-Pro- stearoilo-Asn-Pro- rycynoilo-Trp-Pro- stearoilo-Arg-Pro- rycynoilo-Gly-Pro-

Tabela 6. Receptory molekularne “rozdzielające” mocz zdrowych myszy oraz DBF1 oraz myszy z rakiem płuc LLC.

Podbiblioteka z resztą Ala w pozycji C-terminalnej	Podbiblioteka z resztą Trp w pozycji C-terminalnej	Podbiblioteka z resztą Pro w pozycji C-terminalnej
rycynoilo-Ala-Ala- rycynoilo-Phe-Ala- stearoilo-Leu-Ala- stearoilo-Ile-Ala- rycynoilo-Val-Ala- rycynoilo-Cys-Ala- stearoilo-Tyr-Ala- rycynoilo-Thr-Ala- rycynoilo-Asn-Ala- rycynoilo-Pro-Ala- rycynoilo-Trp-Ala-	stearoilo-Ile-Trp- stearoilo-Met-Trp- rycynoilo-Cys-Trp- rycynoilo-Tyr-Trp- stearoilo-Glu-Trp- rycynoilo-Trp-Trp- stearoilo-Trp-Trp-	stearoilo-Ala-Pro- rycynoilo-Leu-Pro- rycynoilo-Ile-Pro- stearoilo-Val-Pro- rycynoilo-Ser-Pro- stearoilo-Asp-Pro- stearoilo-Lys-Pro- stearoilo-Pro-Pro- rycynoilo-Trp-Pro- rycynoilo-Arg-Pro-

Odmienne profile wiązania składników występujących w moczu pochodzącym od myszy zdrowych i od chorych były przesłanką do przeprowadzenia badań systematycznych z wykorzystaniem moczu mysiego, jako mieszaniny analitów oddziaływujących z wnękami wiążącymi kolejnych generacji biblioteki receptorów molekularnych. Wyniki tych badań zamieszczone są w sprawozdaniu merytorycznym projektu NN 405669540 pt. „Mikromacierze Sztucznych Receptorów do Bezinwazyjnej Diagnostyki Chorób Nowotworowych”, którego byłam kierownikiem. W trakcie badań zastosowałam 60-cio elementową bibliotekę receptorów molekularnych (biblioteka II generacji), zawierających jako fragment peptydowy pochodne dipeptydów. Jako C-terminalne aminokwasy zastosowałam reszty Ala, Phe, Pro. Zastąpiłam resztę tryptofanu mniejszą, aromatyczną resztą fenyloalaniny. Decyzja taka podyktowana była obserwacją wskazującą, że z podbiblioteki zawierającej tryptofan w pozycji C-terminalnej selekcjonowałam najmniej struktur przydatnych diagnostycznie. W pozycję N-terminalną fragmentu peptydowego wbudowałam 20 kodowanych aminokwasów w celu poznania wpływu poszczególnych łańcuchów bocznych aminokwasów na zdolność oddziaływania ze składnikami moczu mysiego. W miejsce długołańcuchowych kwasów tłuszczowych (stearynowego i rycynowego) zastosowałam krótkołańcuchowy hydrofobowy kwas n-heptanowy, celem sprawdzenia wpływu tego parametru na zdolność wiązania ligandów obecnych w składzie polarnego moczu. Bibliotekę receptorów molekularnych wykorzystałam w badaniach wiązania analitów zawartych w moczu myszy zdrowych i w moczu myszy z następującymi wszczepionymi nowotworami: nowotwór okrężnicy LoVo, nowotwór okrężnicy LoVo DX, nowotwór okrężnicy MC 38 EGFP, nowotwór płuc H15 81, nowotwór piersi 4T1, nowotwór jajnika SKOV-3, ludzka białaczka szpikowa MV-4-11 oraz nowotwór gardła JAR. Oczekiwałam, że zastosowanie w badaniach ośmiu różnych typów nowotworów dostarczy danych do oceny przydatności opracowanej metody i pozwoli mi na stworzenie bazy struktur receptorów molekularnych, użytecznych w diagnostyce medycznej. Podobnie jak w badaniach opisanych powyżej, z użyciem biblioteki I generacji wyselekcjonowałam pulę receptorów molekularnych, które „rozdzielają” anality zawarte w moczu mysim, z uwzględnieniem typu nowotworu. Dla struktur wymienionych poniżej w tabeli 7 obserwowałam najbardziej zróżnicowane profile wiązania.

Tabela 7. Receptory molekularne „rozdzielające” moczu zdrowych myszy od moczu myszy z wszczepionymi nowotworami.

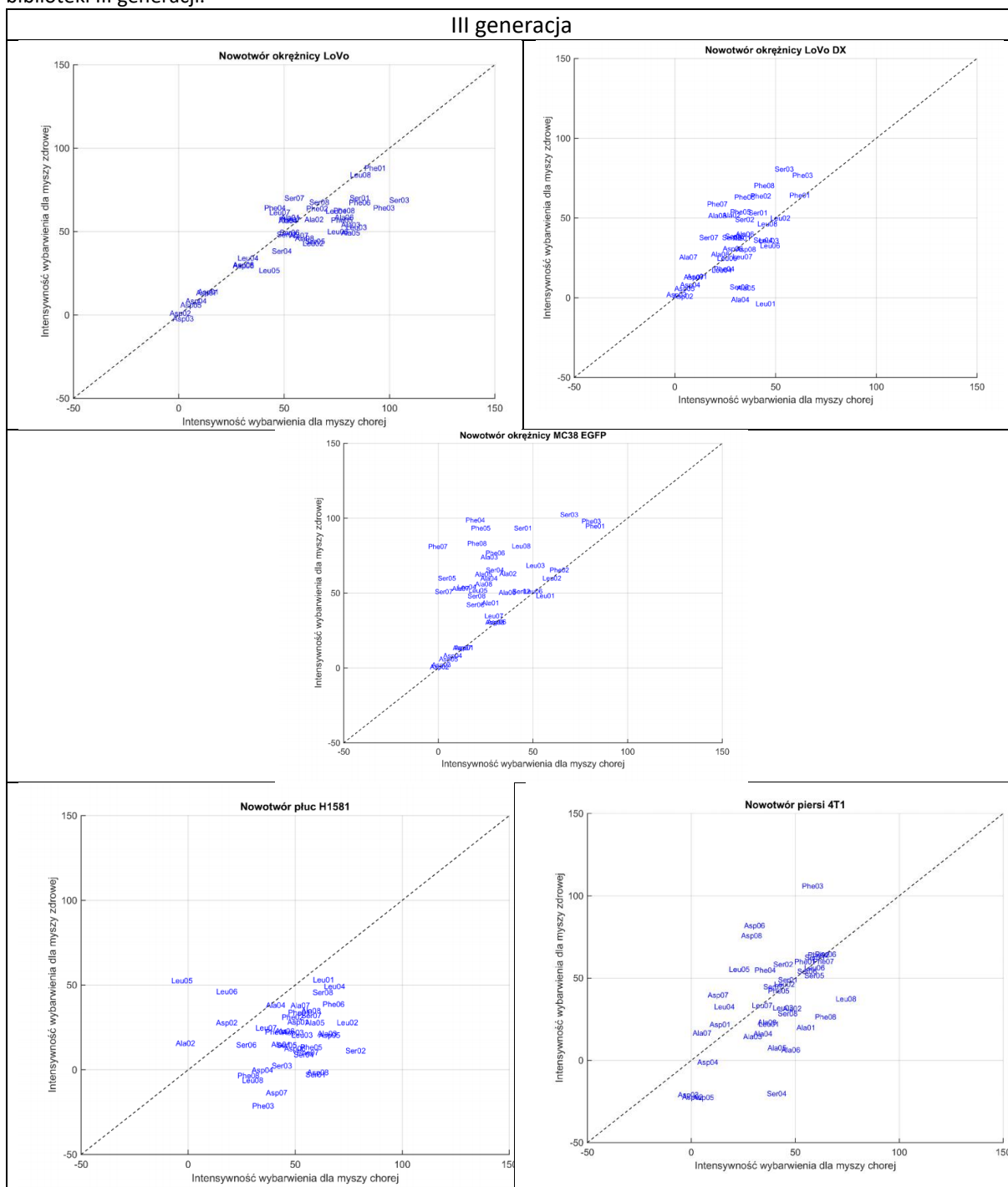
Nowotwór okrężnicy LoVo	Nowotwór okrężnicy LoVo DX	Nowotwór okrężnicy MC 38 EGFP	Nowotwór płuc H15 81	Nowotwór piersi 4T1	Nowotwór jajnika SKOV-3	Białaczka szpikowa MV-4-11	Nowotwór gardła JAR
-Arg-Phe- -Lys-Phe- -Pro-Phe-	-Asn-Phe- -Cys-Phe- -His-Phe- -Met-Phe- -Phe-Phe- -Trp-Phe-	-Met-Phe- -Met-Phe- -Met-Pro- -Pro-Ala- -Pro-Phe- -Pro-Pro- -Val-Ala-	-Ala-Ala- -Ala-Phe- -Ala-Pro- -Thr-Ala- -Thr-Phe- -Thr-Pro-	-Asn-Phe- -Asp-Ala- -Asp-Pro- -Cys-Phe- -Gly-Phe- -His-Phe- -Met-Phe-	-Ala-Ala- -Ala-Phe- -Ala-Pro- -Lys-Ala- -Lys-Phe- -Lys-Pro- -Pro-Ala-	-Gln-Phe- -Gly-Phe- -Leu-Phe- -Phe-Phe- -Ser-Phe- -Lys-Ala- -Lys-Phe-	-Tyr-Ala- -Ser-Ala- -Ser-Phe- -Lys-Ala- -Lys-Phe- -Leu-Ala-

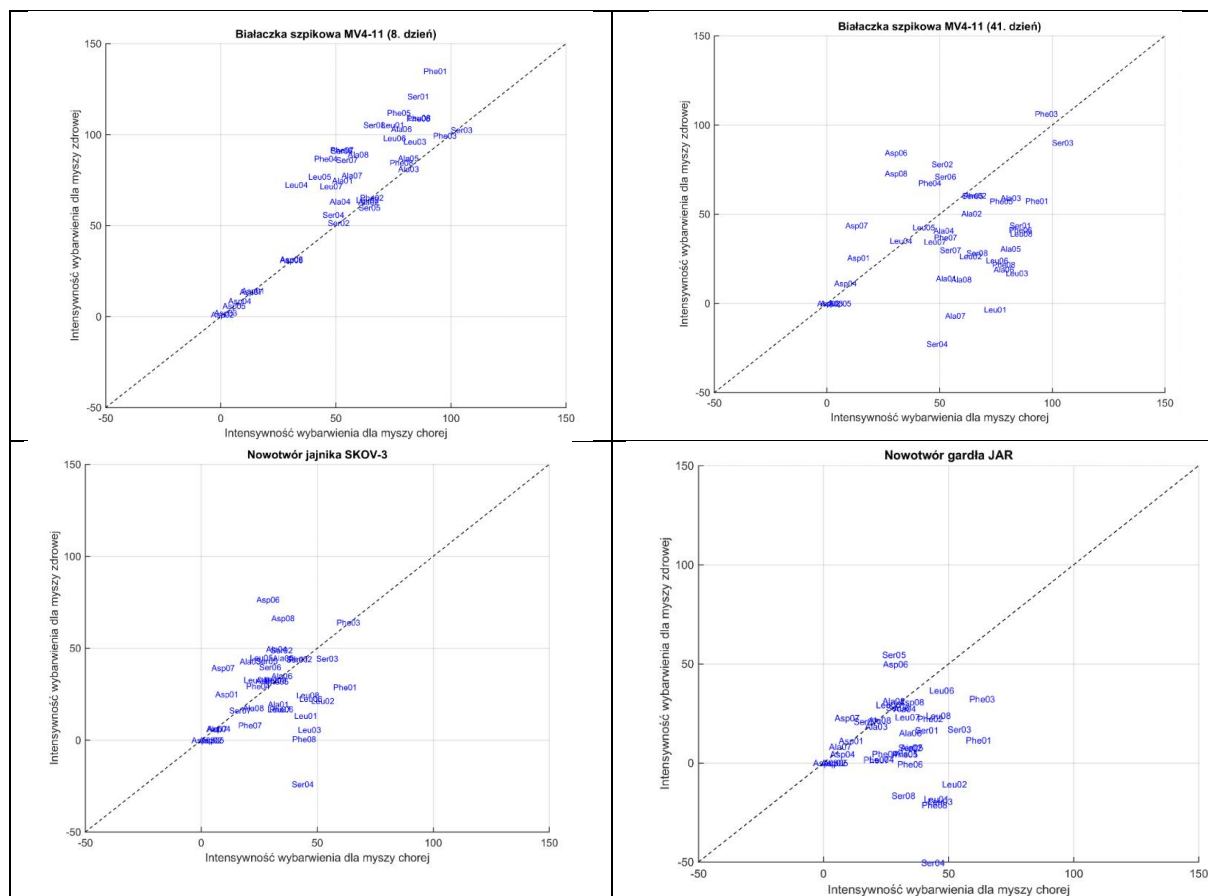
		-Val-Phe- -Val-Pro-	-Tyr-Ala- Tyr-Phe- -Tyr-Pro- -Val-Ala- -Val-Phe- -Val-Pro-	-Ser-Phe- -Thr-Phe-	-Pro-Phe- -Ser-Ala- -Ser-Phe- -Thr-Ala- -Thr-Phe- -Thr-Pro- -Trp-Ala- -Trp-Phe- -Trp-Pro- -Tyr-Ala- -Tyr-Phe- -Tyr-Pro- -Val-Ala- -Val-Phe- -Val-Pro-	-Lys-Pro-	
--	--	------------------------	---	------------------------	---	-----------	--

Na podstawie danych uzyskanych po analizie wyników eksperymentów z 60 elementową biblioteką II generacji zaprojektowałam oraz zsyntezowałam bibliotekę receptorów molekularnych III generacji. Projektując ją założyłam, że część struktur będą stanowić peptydy wyselekcjonowane z biblioteki II generacji (5 receptorów molekularnych), wykazujące największe zróżnicowanie w profilach wiązania moczu myszy chorych i zdrowych. Pozostałe struktury będą zawierały nowe elementy, które powinny umożliwić mi określenie wpływu zarówno zawady przestrzennej łańcuchów bocznych aminokwasów (reszta alaniny vs reszta leucyny), jak również wpływ polarnych reszt aminokwasów zdolnych do tworzenia wiązań wodorowych i jonowych (reszta seryny oraz reszta kwasu asparaginowego). W pozycji *N*-terminalnej zastosowałam: Ala, Asp, Ser, Leu, Phe, w pozycji *C*-terminalnej: Asn, Asp, Cys, Gly, His, Phe, Trp, Tyr, zaś jako fragment lipidowy wbudowany został ponownie kwas *n*-heptanowy. Bibliotekę III generacji wykorzystałam do badań kompleksów molekularnych tworzonych ze związkami zawartymi w moczu myszy zdrowych oraz myszy chorych z wszczepionymi, tak jak uprzednio, ośmioma typami nowotworów. Na podstawie otrzymanych profili wiązania uzyskanych przy stosowaniu metody z barwnikiem reporterowym przeprowadziłam wstępną analizę matematyczną otrzymanych wyników. W celu wyselekcjonowania struktur receptorów molekularnych użytecznych z diagnostycznego punktu widzenia wyselekcjonowałam pola o największym zróżnicowaniu wybarwień po traktowaniu moczem myszy zdrowych i moczem myszy chorych i równocześnie wyeliminowałam pola o słabym stopniu zróżnicowania wyników. W tym celu dla każdego badanego nowotworu wyznaczone zostały zależności wiązania związków zawartych w moczu przez składowe macierzy II jak i III generacji w funkcji stanu zdrowia (na osi *x* odłożone zostały wybarwienia pól traktowanych moczem myszy z wszczepionym nowotworem, zaś na osi *y* wybarwienia pól poddanych działaniu moczu myszy zdrowych). W przypadku braku różnic w zdolności wiązania, punkty powinny układać się na przekątnej, co oznacza, że struktury te nie są użyteczne z diagnostycznego punktu widzenia. Postępując w opisany powyżej sposób

podjęłam próby wyznaczenia przydatności diagnostycznej bibliotek receptorów molekularnych w odniesieniu do wszystkich testowanych nowotworów.

Tabela 8. Zdolność „rozróżniania” moczu myszy zdrowych od moczu myszy chorych przez receptory molekularne biblioteki III generacji.





Bardzo interesujące są wyniki badań moczu myszy z wszczepioną ludzką białaczką MV411, które wykazują znaczące różnicowanie wyników w czasie rozwoju nowotworu. Dane uzyskane dla moczu mysiego w ósmym dniu eksperymentu wskazują, że tylko nieznaczna część pól różnicuje materiał biologiczny (większość punktów układa się na przekątnej). Dopiero w 41 dniu eksperymentu, w chwili pojawienia się guza, obserwowałam wyraźne i silne zróżnicowanie wybarwień. Zależność potwierdziłam również w badaniach z użyciem biblioteki receptorów molekularnych II generacji. Stwierdziłam również, że wśród receptorów molekularnych biblioteki III generacji najmniejszą zdolność do rozróżniania metabolitów moczu myszy chorych i zdrowych mają struktury zawierające resztę kwasu asparaginowego.

Podjęłam również próby sprawdzenia, czy w składzie macierzy receptorów molekularnych pierwszej, drugiej i trzeciej generacji obecne są „uniwersalne” struktury zdolne do rozróżniania analitów obecnych w moczu myszy chorych oraz zdrowych, a więc takie, które byłyby użyteczne diagnostycznie dla wszystkich badanych typów nowotworów. Wyselekcjonowanymi receptorami molekularnymi były: immobilizowane na matrycy celulozowej *N*-heptanoilowane dipeptydy o strukturach: -Asn-Ala-, -Gly-Ala-, -Ile-Ala-, -Leu-Ala-, -Lys-Ala-, -Gln-Phe-, -His-Ala-, -Arg-Phe-, -Cys-Phe-, -Val-Phe-, -Ala-Pro-, -Arg-Pro-, -Leu-Pro- oraz -Trp-Pro-, -His-Asp-, -Phe-Asp-, -Trp-Asp-, -Tyr-Asp-, -Cys-Ser-, -Gly-Ser-, -Gly-Leu-, -His-Leu- oraz -Phe-Leu-.

Prace nad wykorzystaniem celulozy (lub innych matryc stałych) funkcjonalizowanej *N*-lipidowanymi peptydami o aktywności receptorów molekularnych w bezinwazyjnej diagnostyce są przedmiotem kontynuowanych badań. Ich kolejnym celem jest opracowanie metod otwarcia wnęki wiążącej (rozkład kompleksu molekularnego) desorpcji zadokowanego analitu i podjęcie badań nad poznaniem struktury zadokowanych ligandów. Rozwiązanie to pozwoliłoby na rozszerzenie aplikacyjności uzyskiwanych profili wiązania ligandów zawartych w płynach fizjologicznych o badania jakościowo-ilościowe identyfikujące struktury potencjalnych markerów diagnostycznych. Podejście takie pozwala również na poszukiwanie nowych markerów nowotworowych w płynach ustrojowych. Dotychczas przeprowadzone badania wstępne z użyciem modelowych ligandów o charakterze obojętnym, kwasowym i zasadowym pozwoliły na wykazanie, że możliwe jest ilościowe wymycie zadokowanego związku przy użyciu wodnego roztworu DMF lub wodnego roztworu DMF z dodatkiem kwasu lub zasady. Po całkowitym otwarciu wnęki wiążącej, analiza struktury ligandów jest możliwa przy zastosowaniu wysokoczułych technik analitycznych tj. LC/MS i GC/MS. Szczegółowe wyniki tych prac nie są jeszcze ujawnione z uwagi na ich aplikacyjny charakter.

Stwierdziłam również, że jako podłoże stałe do syntezy receptorów molekularnych z powodzeniem mogą być stosowane matryce nieorganiczne: szkło, krzem, krzemionka, krzemiany i glinokrzemiany (np. montmorylonit) (praca **H12**). Ich przydatność w analityce nie została jeszcze dogłębnie udokumentowana. Prace nad określeniem przydatności receptorów molekularnych immobilizowanych na podłożu nieorganicznym są kontynuowane.

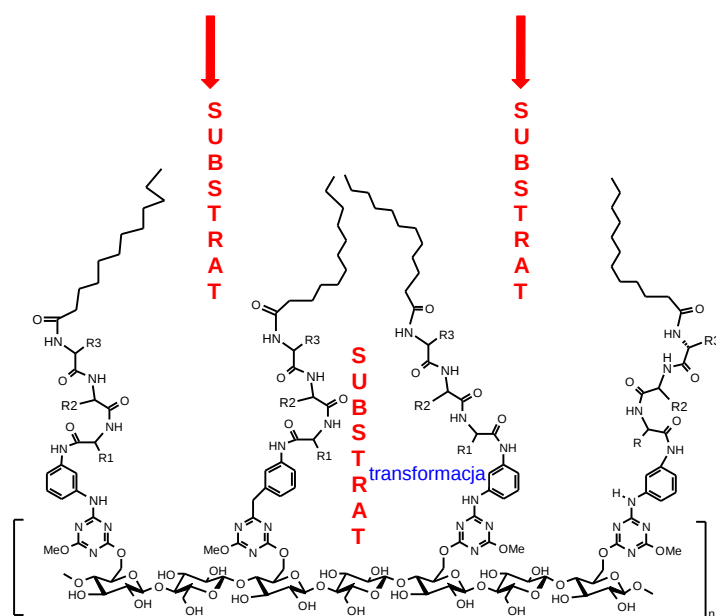
V.3. Receptory molekularne jako katalitycznie aktywne synzyny

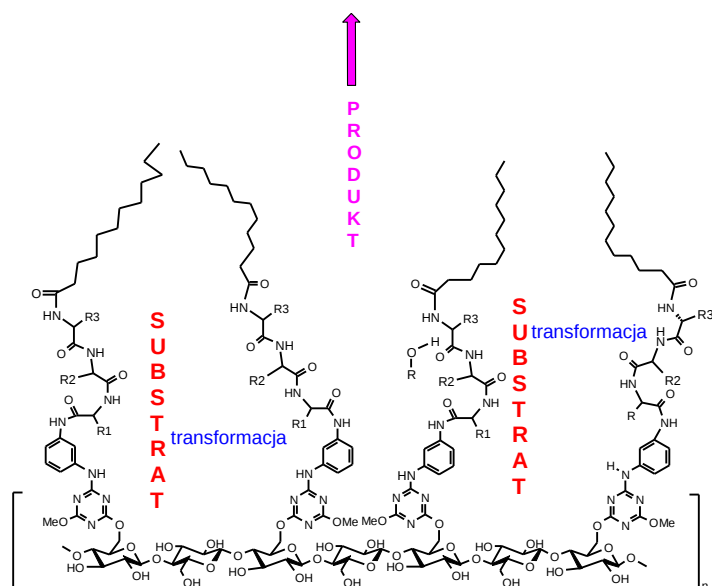
Badania przeprowadzone nad zdolnością rozpoznawania molekularnego oraz wiązania ligandów przez opracowane przeze mnie receptory molekularne wskazują, że odpowiedzialnym za tworzenie stabilnych kompleksów jest głównie fragment peptydowy. Fakt ten otwiera możliwość zastosowania immobilizowanych na celulozie *N*-lipidowanych peptydów również w innych obszarach, gdyż poprzez właściwy dobór komponentów aminokwasowych w peptydzie możliwe jest nadawanie projektowanym macierzom nowych właściwości aplikacyjnych.

Przedstawione założenie pozwoliło mi na podjęcie badań nad zastosowaniem receptorów molekularnych jako struktur aktywnych katalitycznie (synzymów), których aktywność zależeć powinna od budowy fragmentu peptydowego. Tym samym oczekiwałam, że możliwe będzie zaprojektowanie i otrzymanie układów mimikujących swoim działaniem naturalne enzymy. W literaturze chemicznej opisany został cały szereg struktur naśladujących aktywność enzymów: chemzyny [26], sztuczne enzymy [27], sztuczne metaloenzymy [28], abzyny, nanozyny [29], sztuczne rybozyny, aptazyny [30], wdrukowane w polimery (MIP) analogi stanu przejściowego [31] oraz proste pochodne zawierające

jednostki warunkujące aktywność katalityczną (zazwyczaj aminokwasy, imidazol, kwas salicylowy i krótkie peptydy) przyłączone do makrocząsteczkowych nośników [32]. Synzymy pozwalają na przewyższenie wielu ograniczeń naturalnych enzymów, którymi są niska stabilność, ograniczona selektywność, wysokie koszty związane z przygotowaniem i oczyszczaniem, niekompatybilność z rozpuszczalnikami organicznymi, a także ograniczona zdolność do działania w warunkach abiotycznych lub w szerokim zakresie warunków odbiegających od biogodnych. W swoich poszukiwaniach nowych struktur aktywnych katalitycznie przyjęłam, że immobilizacja na nośnikach stałych zdolnych do samoorganizacji krótkich peptydów złożonych z aminokwasów obecnych w centrach katalitycznych enzymów, pozwoli mi na uzyskanie katalitycznych aktywnie pochodnych, których efektywność mogłaby być porównywalna z naturalnymi enzymami [33].

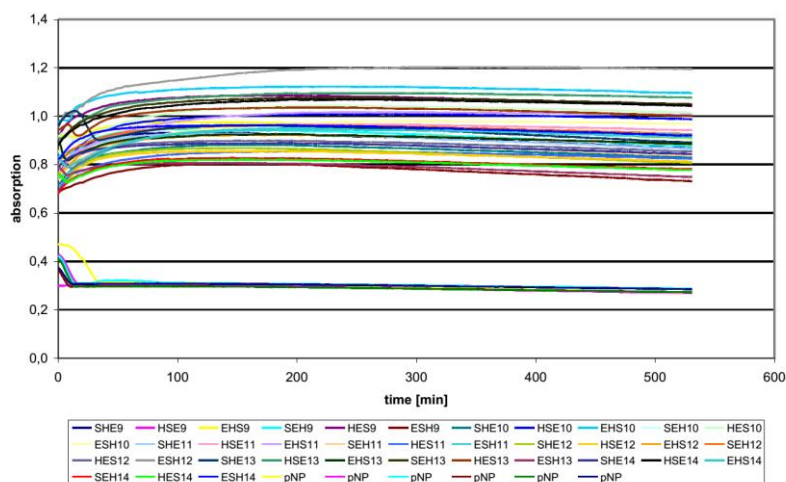
Oczekiwałam, że *N*-lipidowane peptydy immobilizowane w regularny sposób na matrycy celulozowej o odpowiedniej strukturze fragmentu peptydowego będą zdolne do tworzenia kompleksów molekularnych zarówno z substratami jak i intermediatami tworzonymi na drodze transformacji substratu do produktu. Zakładałam, że zaproponowane rozwiązanie wyeliminuje problem niekompatybilności syntetycznych polimerów stosowanych jako stałe nośniki, gdyż funkcję tą spełni biokompatybilna celuloza, wspomagająca samoorganizację krótkich peptydów zawierających grupy funkcyjne, niezbędne w procesach katalitycznych.





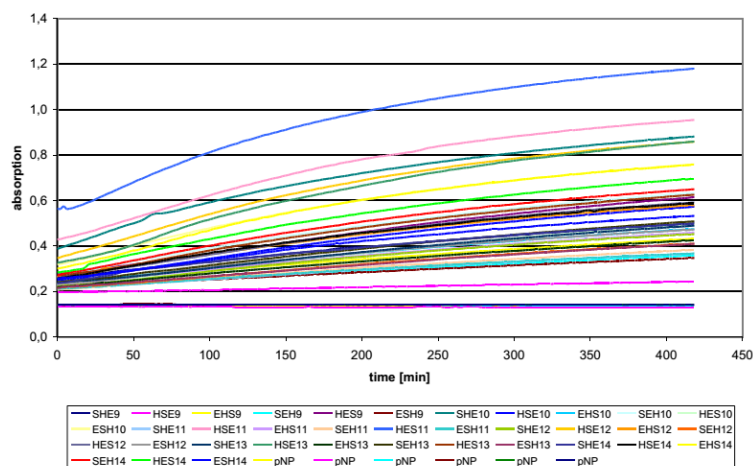
Schemat 12. Immobilizowane na celulozie *N*-lipidowane peptydy jako synzymy. Decydującym czynnikiem powodzenia jest dynamika konformacyjna fragmentów peptydowych warunkująca rozpoznawanie, wiązanie substratu oraz stabilizująca reaktywne produkty i stany pośrednie występujące na ścieżce transformacji substratu do produktu i wreszcie wymuszająca dysocjację produktów z kieszeni katalitycznej.

W celu zweryfikowania tej hipotezy zaprojektowałam oraz zsyntezowałam macierz *N*-lipidowanych peptydów, przyłączonych do podłoża celulozowego poprzez nierozszczepialny łącznik triazynowy typu A. W pierwszych pracach fragment peptydowy stanowił permutację histydyny, seryny oraz kwasu glutaminowego (aminokwasy triady katalitycznej). Zastosowanie reszty Glu w miejsce typowego dla enzymów kwasu asparaginowego wynikało z oczekiwania, że dłuższy łańcuch boczny będzie bardziej elastyczny i sprzyjający zaangażowaniu grupy karboksylowej zarówno na etapie wiązania substratu, jak i jego transformacji. Tripeptydy lipidowałam resztami kwasów: oleinowego (*cis*-9-oktadecenowy), rycynowego ((*R*)-12-hydroksy-*cis*-9-oktadecenowy), 10-undecenowego, kaprynowego (dekanowy), erukowego (*cis*-13-dokosenowy) oraz stearynowego (oktadekanowy). Użyteczność biblioteki *N*-lipidowanych peptydów jako układów synzymów testowałam w modelowej reakcji hydrolizy wiązania estrowego w Z-Leu-Leu-ONp (praca **H2**). Produktem reakcji jest barwny *p*-nitrofenolan, co umożliwia bezpośrednie śledzenie postępu reakcji metodą spektrofotometryczną z użyciem czytnika mikromacierzy. W oparciu o pomiary kolorymetryczne stwierdziłam, że wszystkie struktury *N*-lipidowanych tripeptydów wysoce efektywnie katalizują hydrolizę estru. Praktycznie po czasie 3 minut hydroliza była zakończona.



Rysunek 13. Przebieg reakcji hydrolizy Z-Leu-Leu-ONp z zastosowaniem jako katalizatorów *N*-lipidowanych tripeptydów immobilizowanych na celulozie. Reakcja hydrolizy prowadzona była przy zastosowaniu 0.01 M roztworu Z-Leu-Leu-ONp w metanolu z dodatkiem 3.5% wody (pH = 7).

Jako kontrolę (blank) zastosowałam Z-Leu-Leu-ONp w obecności różnorodnie skomponowanych mieszanin następujących składników: metanol, woda i celuloza. We wszystkich próbach kontrolnych stwierdziłam brak reakcji. Z uwagi na fakt, że wszystkie testowane *N*-lipidowane tripeptydy katalizowały reakcję hydrolizy Z-Leu-Leu-ONp postanowiłam nadmiernie reaktywny substrat zastąpić Z-L-Ala-Aib-ONp oczekując, że wprowadzenie reszty α,α -dipodstawionego aminokwasu znacząco utrudni, a może nawet uniemożliwi hydrolizę.

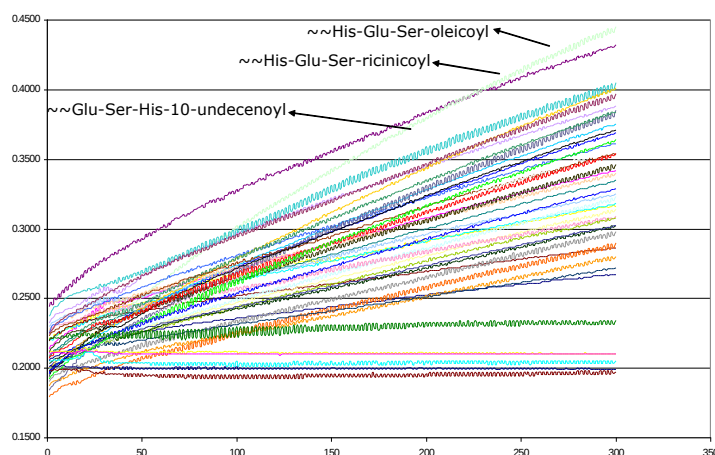


Rysunek 14. Przebieg reakcji hydrolizy Z-L-Ala-Aib-ONp w obecności *N*-lipidowanych tripeptydów immobilizowanych na celulozie zastosowanych jako katalizatory. Hydrolizie poddano 0.01 M roztwór Z-L-Ala-Aib-ONp w metanolu z dodatkiem 3.5% wody (pH = 7).

Jak można było oczekiwać, wprowadzenie rozbudowanej przestrzennie reszty Aib w centrum reakcji znacząco spowolniło proces hydrolizy i zróżnicowało aktywność katalityczną struktur. Z 36 elementowej biblioteki synzymów wyselekcjonowałam pięć katalitycznie najbardziej aktywnych struktur *N*-lipidowanych tripeptydów: undec-10-enoilo-His-Glu-Ser-, undec-10-enoilo-His-Ser-Glu-, (Z)-dokos-13-enoilo-Ser-His-Glu-, dekanoilo-Glu-Ser-His- oraz (9Z,12R)-12-hydroksyoktadek-9-enoilo-Ser-

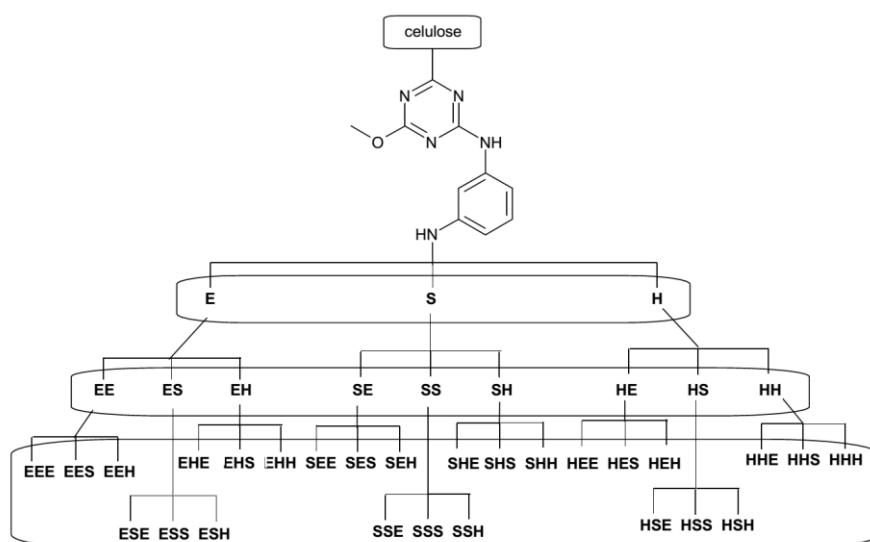
His-Glu-. Dla pozostałych tripeptydów hydroliza zachodziła wolniej, jednak i tak znacząco szybciej niż dla puli pochodnych zastosowanych jako układ kontrolny (blank). Badania SAR biblioteki synzymów pozwoliły mi na znalezienie zależności wskazujących, że dominującym czynnikiem wpływającym na aktywność katalityczną jest fragment peptydowy. Szereg aktywności katalitycznej fragmentów peptydowych układał się w sposób następujący: His-Glu-Ser > His-Ser-Glu > Ser-His-Glu. Natomiast w odniesieniu do reszty kwasu tłuszczowego najbardziej optymalnym okazało się stosowanie kwasu 10-undecenowego.

Stwierdziłam również, że immobilizowane *N*-lipidowane tripeptydy katalizują reakcję transestryfikacji (alkoholizy) 0.01 M roztworu Z-Leu-Leu-ONp w metanolu.



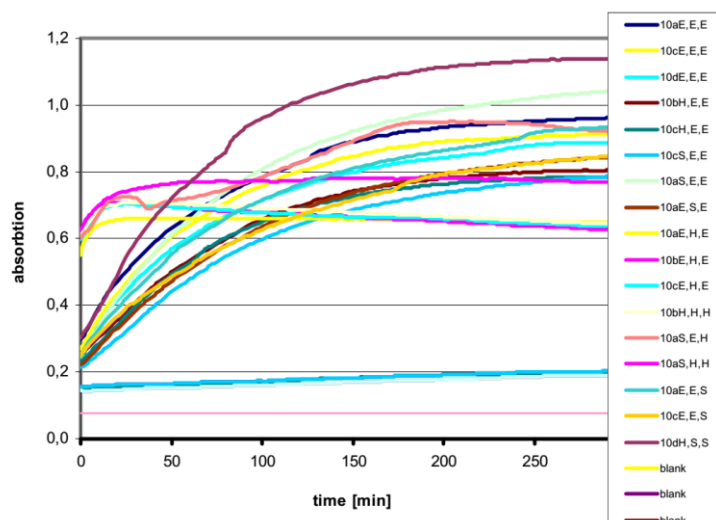
Rysunek 15. Przebieg reakcji metanolizy Z-L-Leu-L-Leu-ONp w obecności *N*-lipidowanych tripeptydów jako katalizatorów. Alkoholiza prowadzona była przy użyciu 0.01 M roztworu Z-Leu-Leu-ONp w metanolu.

Poszukując odpowiedzi, czy można zmniejszyć rozmiar fragmentu peptydowego synzymu zaprojektowałam i otrzymałam 156 elementową bibliotekę tri-, dipeptydów do której dołączyłam również podbibliotekę *N*-lipidowanych aminokwasów (praca **H3**). Zastosowane zostały te same reszty aminokwasowe triady katalitycznej. Rozszerzyłam jednak pulę kwasów tłuszczowych, celem sprawdzenia ich wpływu na aktywność katalityczną synzymów. Zastosowałam: kwas heptanowy (a), stearynowy (b), elaidikowy (c) i palmitynowy (d). Jako substrat do testów zastosowałam jeszcze mniej reaktywny Z-Aib-Aib-ONp, oczekując, że będzie to model dostatecznie trudny do hydrolizy, a zarazem hydrofobowy, co pozwoli na zróżnicowanie efektywności katalitycznej i poznanie zależności pomiędzy aktywnością katalityczną a budową synzymu.



Rysunek 16. Struktura biblioteki aminokwasów, dipeptydów i tripeptydów *N*-lipidowanych za pomocą kwasów a-d użytej w badaniach zdolności solwolizy Z-Aib-Aib-ONp.

W badaniach z użyciem *N*-lipidowanych aminokwasów obserwowałam powstawanie plateau absorbancji na poziomie $0.5 \div 0.7$ relatywnie szybko (po około 20 min) a wydłużanie czasu solwolizy aż do 300 min w większości przypadków nie powodowało dalszego postępu reakcji. Podobne obserwacje dotyczyły podbiblioteki *N*-lipidowanych dipeptydów. We wszystkich przypadkach obserwowałam powstawanie plateau na poziomie absorbancji $0.4 \div 0.8$ po krótkim czasie i znaczące spowolnienie dalszego postępu reakcji. Spośród *N*-lipidowanych tripeptydów użytych jako katalizatory wyselekcjonowałam pulę struktur, dla których absorbancja osiągała wartość 1.0. W sumie wyselekcjonowałam 17 najbardziej aktywnych katalitycznie synzymów.



Rysunek 17. Solwoliza Z-Aib-Aib-ONp w obecności 17 najbardziej aktywnych synzymów wyselekcjonowanych ze 108-elementowej biblioteki *N*-lipidowanych tripeptydów.

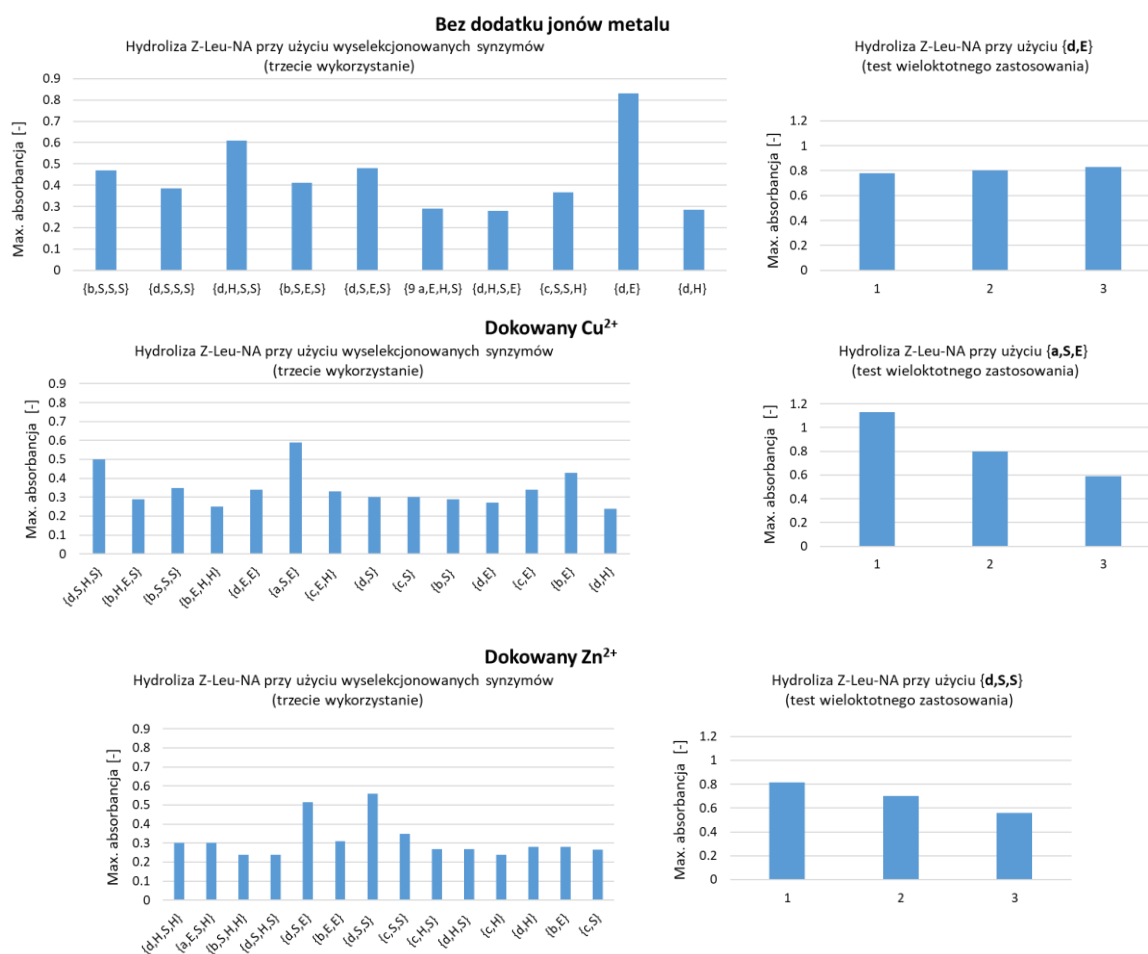
Z puli tej wyselekcjonowałam 10 *N*-lipidowanych tripeptydów katalizujących solwolizę Z-Aib-Aib-ONp z utworzeniem Z-Aib-Aib-OH i p-nitrofenolu. Synzymami tymi są: *N*-palmitynoilo-His-Ser-Ser-*m*-

NH-C₆H₄-NH-DMT-cel, *N*-heptanoilo-Ser-Glu-Glu-*m*-NH-C₆H₄-NH-DMT-cel, *N*-heptanoilo-Ser-His-Glu-*m*-NH-C₆H₄-NH-DMT-cel, *N*-heptanoilo-Glu-Glu-Glu-*m*-NH-C₆H₄-NH-DMT-cel, *N*-elaidikoilo-Glu-Glu-Glu-*m*-NH-C₆H₄-NH-DMT-cel, *N*-heptanoilo-Glu-Ser-Glu-*m*-NH-C₆H₄-NH-DMT-cel, *N*-palmitynoilo-Glu-Glu-Glu-*m*-NH-C₆H₄-NH-DMT-cel, *N*-elaidikolilo-Glu-Ser-Glu-*m*-NH-C₆H₄-NH-DMT-cel, *N*-heptanoilo-Glu-Ser-Glu-*m*-NH-C₆H₄-NH-DMT-cel oraz *N*-elaidikoilo-His-Glu-Glu-*m*-NH-C₆H₄-NH-DMT-cel. W 50% wyselekcjonowanych synzymów kwasem tłuszczowym okazał się być krótkołańcuchowy kwas heptanowy, zaś dominująca reszta aminokwasowa pochodziła od kwasu glutaminowego.

Bibliotekę synzymów zawierającą 156 elementów zastosowałam w badaniach zmierzających do stwierdzenia, czy układy te będą zdolne do rozszczepienia wiązania amidowego (peptydowego) (praca **H11**). Jako aminokwasy tworzące fragment peptydowy synzymów zastosowałam ponownie: Ser, His oraz Glu. Biblioteka zawierała lipidowane aminokwasy, di- oraz tripeptydy. Do *N*-lipidowania użyłam: dwa kwasy krótkołańcuchowe: kwas heptanowy (**a**) i kwas oktanowy (**b**) oraz dwa długołańcuchowe kwasy tłuszczowe: kwas (E)-octadec-9-enoowy (elaidikowy) (**c**) oraz heksadekanowy (palmitynowy) (**d**). Przystępując do badań brałam pod uwagę fakt, że o ile hydroliza wiązania estrowego zachodzi stosunkowo prosto, to hydroliza wiązania amidowe w łagodnych warunkach (temperatura pokojowa, neutralne pH) jest znacząco mniej prawdopodobna bez efektywnego katalizatora. Jako substrat do hydrolizy zastosowałam modelowy amid *p*-nitroaniliny Z-Leu-NA. Założyłam, że za aktywne katalitycznie uznaję te struktury, dla których wartość absorbancji korespondujące z obecnością *p*-nitroaniliny, będą wynosiły co najmniej 0.8. Kryterium to spełniło jedynie osiem *N*-lipidowanych tripeptydów: *N*-oktanoilo-Ser-Ser-Ser-*m*-NH-C₆H₄-NH-DMT-cel, *N*-palmitynoilo-Ser-Ser-Ser-*m*-NH-C₆H₄-NH-DMT-cel, *N*-palmitynoilo-His-Ser-Ser-*m*-NH-C₆H₄-NH-DMT-cel, *N*-oktanoilo-Ser-Glu-Ser-*m*-NH-C₆H₄-NH-DMT-cel, *N*-palmitynoilo-Ser-Glu-Ser-*m*-NH-C₆H₄-NH-DMT-cel, *N*-heptanoilo-Glu-His-Ser-*m*-NH-C₆H₄-NH-DMT-cel, *N*-palmitynoilo-His-Ser-Glu-*m*-NH-C₆H₄-NH-DMT-cel oraz *N*-elaidikoilo-Ser-Ser-His-*m*-NH-C₆H₄-NH-DMT-cel. We wszystkich wyselekcjonowanych synzymach dominującym aminokwasem okazała się być seryna. Podjęłam również próby sprawdzenia, czy zadokowanie jonu Zn²⁺ lub Cu²⁺ do wnęk wiążących receptorów molekularnych immobilizowanych na celulozie będzie wpływało na zdolność do hydrolizy wiązania amidowego i czy będzie się również to przedkładało na możliwość modulowania aktywności katalitycznej synzymów. W przypadku synzymów z zadokowanym jonem Cu²⁺ założone kryterium (wartość absorbancji powyżej 0.8) ze 156 elementowej biblioteki spełniło 18 struktur, które jako fragment lipidowo-peptydowy (aminokwasowy) zawierały: *N*-oktanoilo-Ser-, *N*-elaidikolilo-Ser-, *N*-palmitynoilo-Ser-, *N*-oktanoilo-Glu-, *N*-elaidikoilo-Glu-, *N*-palmitynoilo-Glu-, *N*-palmitynoilo-His-, *N*-elaidikolilo-Glu-His-, *N*-heptanoilo-Ser-Glu-, *N*-palmitynoilo-Glu-Glu-, *N*-oktanoilo-Ser-Ser-Ser-, *N*-oktanoilo-His-Glu-Ser-, *N*-palmitynoilo-Ser-His-Ser-, *N*-oktanoilo-Ser-Glu-His-, *N*-elaidikoilo-Ser-Glu-His-, *N*-elaidikoilo-Glu-Glu-His, *N*-elaidikoilo-Ser-His-His- oraz *N*-oktanoilo-Glu-His-His-. Natomiast w przypadku synzymów z zadokowanym jonem Zn²⁺ założone

Kryterium ze 156 elementowej biblioteki spełniło 16 związków. Struktury te jako fragment lipidowo-peptydowy (aminokwasowy) zawierały: *N*-elaidoilo-Ser-, *N*-oktanoilo-Glu-, *N*-elaidoilo-His-, *N*-palmitynoilo-His-, *N*-elaidoilo-Ser-Ser-, *N*-palmitynoilo-Ser-Ser-, *N*-elaidoilo-His-Ser-, *N*-palmitynoilo-His-Ser-, *N*-palmitynoilo-Ser-Glu-, *N*-oktanoilo-Glu-Glu-, *N*-palmitynoilo-Ser-His-Ser-, *N*-heptanoilo-Glu-His-Ser-, *N*-palmitynoilo-Ser-Glu-His-, *N*-oktanoilo-Ser-His-His-, *N*-heptanoilo-Glu-Ser-His- i *N*-palmitynoilo-His-Ser-His-.

Wykazałam, że możliwe jest również wielokrotne zastosowanie aktywnych katalitycznie synzymów. W oparciu o wyniki trzykrotnego zastosowania stwierdziłam pełne zachowanie aktywności lub jej stopniowo postępujące obniżenie.

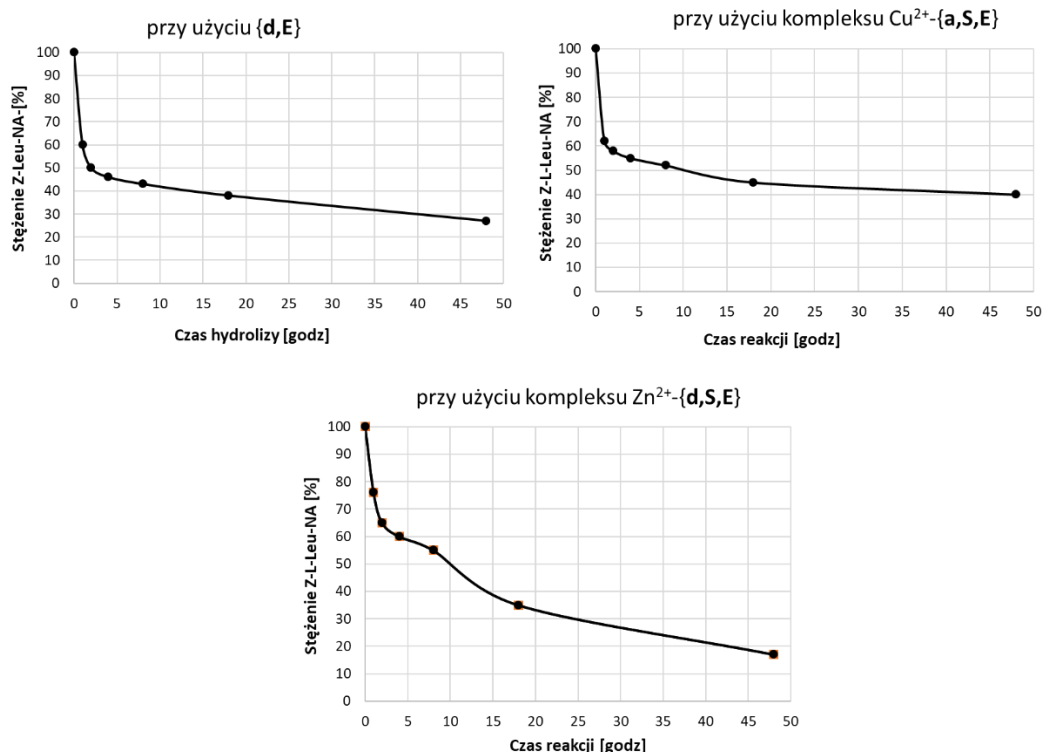


Rysunek 18. Wykresy przedstawiające możliwość wielokrotnego stosowania wyselekcjonowanych w pierwszym teście synzymów.

Wykazałam również, stosując synzymy wyselekcjonowane w teście wielokrotnego zastosowania, że {d,Glu}, kompleks {a,Ser,Glu}-Cu²⁺ oraz kompleks {d,Ser,Glu}-Zn²⁺ umożliwiają transformację substratu do produktu, nawet w przypadku 40 krotnego zwiększenia ilości substratu (Z-Leu-NP) w odniesieniu do ilości synzymu. Postęp reakcji prowadzonej z udziałem zwiększonej ilości substratu

monitorowałam metodą HPLC, mierząc zanik Z-Leu-NA ($R_t = 22.81$ min), któremu towarzyszył wzrost sygnału Z-Leu-O-HNMM⁺ o $R_t = 3.86$ min oraz p-nitroaniliny i $R_t = 8.72$ min.

Hydroliza Z-Leu-NA

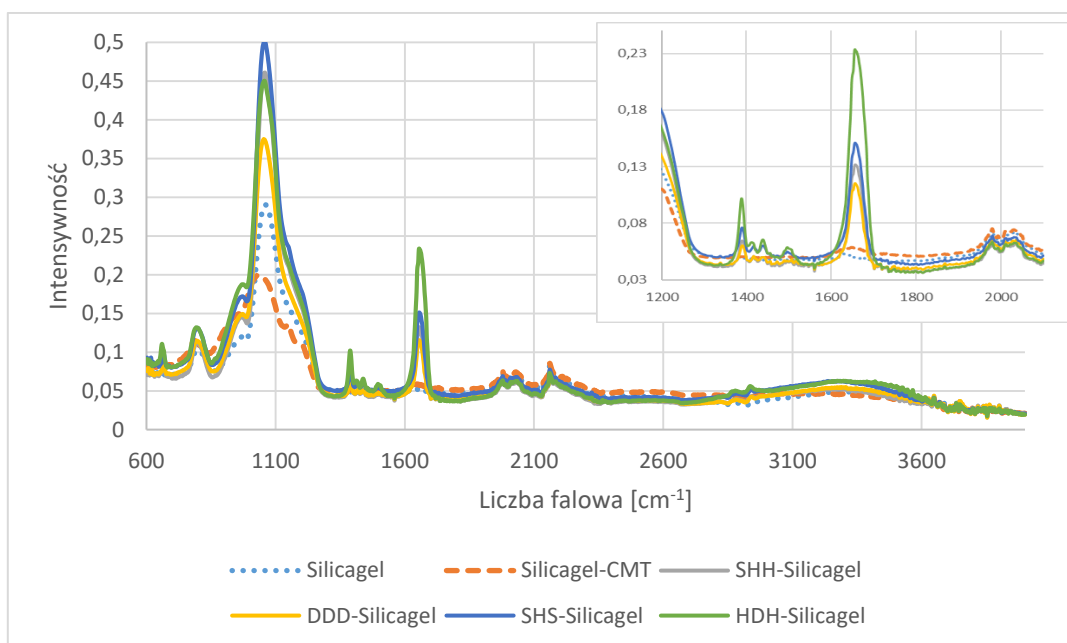


Rysunek 19. Postęp reakcji hydrolizy Z-Leu-NA przy użyciu wyselekcjonowanych synzymów monitorowany metodą chromatograficzną (HPLC).

Stwierdziłam, że w początkowej fazie hydroliza Z-Leu-NA katalizowana za pomocą {d,Glu} (bez obecności jonu metalu zachodzi szybko. Po czasie 1 godz. obserwowałam zużycie 40% substratu. W późniejszych stadiach proces transformacji uległ zwolnieniu i po 48 godz. obserwowałam ciągle obecność nieprzereagowanego substratu. Natomiast w przypadku zastosowania jako katalizatora kompleksu Cu^{2+} z {a,Ser,Glu} po czasie 1 godz. obserwowałam obniżenie stężenia substratu do 60%. Odmienne wyniki stwierdziłam dla kompleksu Zn^{2+} z {d,Ser,Glu}. W tym przypadku początkowo szybkość reakcji była niska (po 1 godz. stwierdziłam 80% substratu), jednak później nastąpiło przyspieszenie reakcji i po 48 godz. stwierdziłam niemal całkowite przereagowanie substratu (ilość nieprzereagowanego Z-Leu-NA była niższa niż 20%).

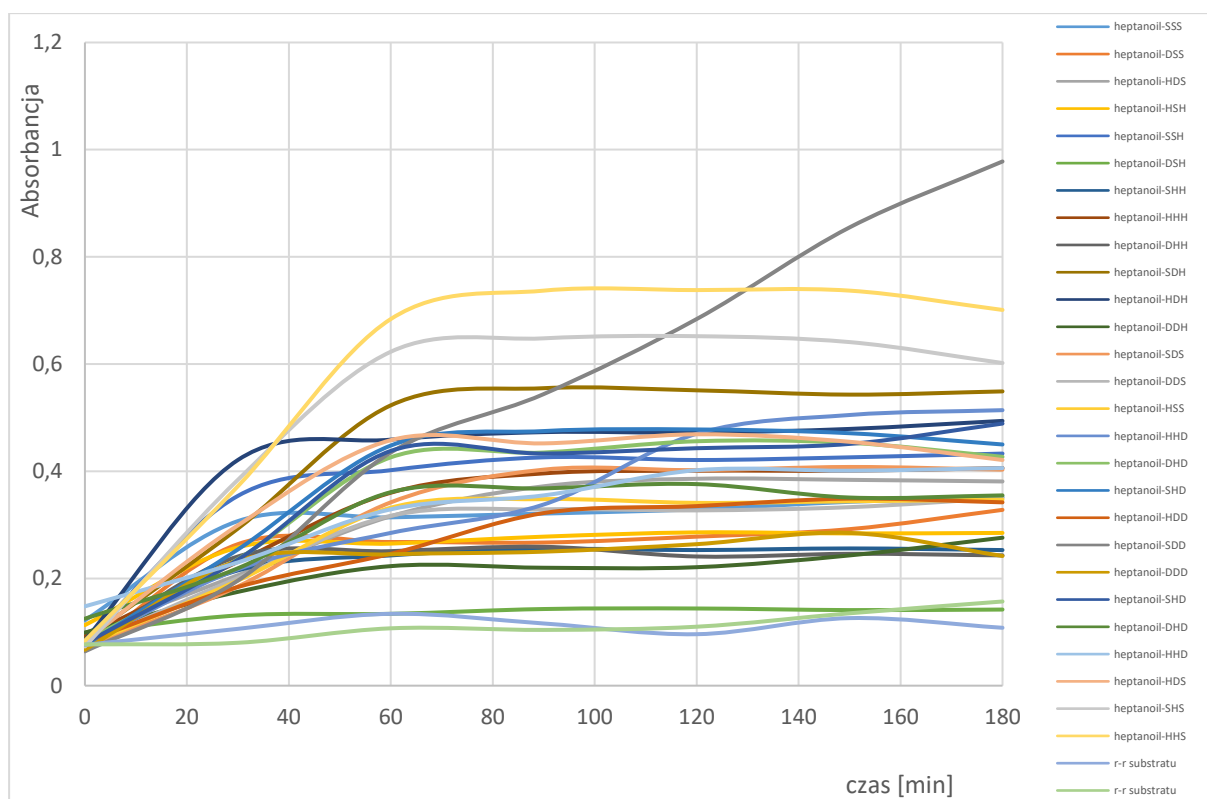
Wykorzystując procedurę funkcjonalizacji stałych podłoży (praca H12) oraz nanomateriałów (B7 i B11, nie wchodzące w skład niniejszego postępowania habilitacyjnego) podjęłam również próby otrzymania chemzymów immobilizowanych na powierzchni krzemionki. Stwierdziłam, że podobnie jak w przypadku celulozy wykorzystanej jako matryca stała, uzyskałam dane potwierdzające fakt, że *N*-lipidowane peptydy osadzone na podłożu nieorganicznym są receptorami molekularnymi, zaś wprowadzenie odpowiednio skonstruowanego peptydu pozwala na uzyskanie układów aktywnych

katalitycznie. Podobnie aktywne struktury uzyskałam w przypadku, gdy jako nośnika stałego użyłam silikażelu. Synteza obejmowała: transformację krzemionki w alkalikrzemionkę, wprowadzenie pochodnej 1,3,5-triazyny wywodzącej się z 2,4-dichloro-6-metoksy-1,3,5-triazyny, reakcję z *m*-fenylenodiaminą, co finalnie prowadziło do syntezy fragmentu analogicznego do wykorzystywanego uprzednio jako łącznik typu A osadzony na celulozie. Kolejne etapy obejmowały syntezę fragmentu peptydowego oraz finalne lipidowanie *N*-terminalnego aminokwasu. Na tym etapie syntezy jako odczynnik kondensujący stosowałam DMT/MMM/TosO⁻. Finalnie otrzymałam 27 elementową bibliotekę *N*-heptanoilowanych tripeptydów złożonych z reszt Ser, His i Glu immobilizowanych na powierzchni silikażelu. Każda ze struktur była otrzymana w odrębnym reaktorze. Postęp reakcji śledziłam stosując metodę FT-IR, co pozwoliło mi na obserwowanie pasm w zakresie 1590÷1700 cm⁻¹, charakterystycznych dla wiązania amidowego oraz pasma charakterystycznych dla drgań rozciągającym wiązania C-N w zakresach 1400÷1420 cm⁻¹ i 1200÷1300 cm⁻¹.



Rysunek 20 Zbiorczy wykres FT-IR silikażelu modyfikowanego *N*-lipidowanymi peptydami immobilizowanymi za pomocą łącznika typu A.

Uzyskane *N*-lipidowane tripeptydy immobilizowane na powierzchni krzemionki zastosowałam jako katalizatory hydrolizy wiązania estrowego. Jako substrat wykorzystałam ester *p*-nitrofenylowy dipeptydu Z-Aib-L-Ala-ONp. Podobnie jak w badaniach z wykorzystaniem celulozy funkcjonalizowanej *N*-lipidowanymi aminokwasami/peptydami zawierającymi aminokwasy triady katalitycznej, wykonałam pomiary spektrofotometryczne z zastosowaniem czytnika mikromacierzy. Stwierdziłam, że wszystkie 27 pochodnych katalizuje reakcję hydrolizy wiązania estrowego.



Rysunek 21. Przebieg reakcji hydrolizy Z-Aib-L-Ala-ONp przy zastosowaniu modyfikowanej *N*-heptanoilowanymi tripeptydami osadzonej na krzemionce za pomocą łącznika A jako katalizatorami reakcji.

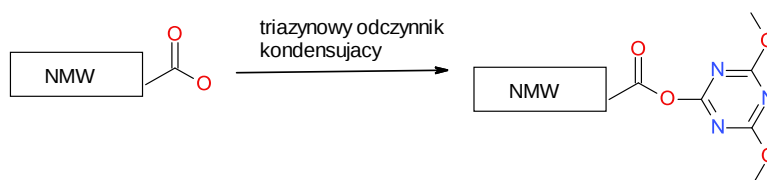
Stwierdziłam, że najefektywniejszym synzysem jest pochodna *N*-heptanoilo-Ser-Asp-Asp-immobilizowana na powierzchni krzemionki. Wartość absorbancji, skorelowana z ilością *p*-nitrofenolu, po czasie 180 minut wynosiła około 1, zaś po czasie 24 godzin stwierdziłam, że absorbancja wynosi 3.5, co wskazuje, że proces hydrolizy zachodzi aż do wyczerpania substratu. Wyniki tych badań stanowią podstawę manuskryptu przygotowywanego do zgłoszenia do *Advanced Synthesis and Catalysis* zatytułowanego „Immobilized on silica *N*-lipidated peptides with catalytic activity”, J. Frączyk, M. Walczak, Z.J. Kamiński.

Szerokie możliwości aplikacyjne (wiązanie różnorodnych strukturalnie ligandów, specyficzne wiązanie ligandów z mieszanin oraz możliwość tworzenia katalitycznych aktywnie synzymów) materiałów stałych funkcjonalizowanych za pomocą pochodnych 1,3,5-triazyn, skłoniło mnie do podjęcia prób zastosowania tych związków do modyfikowania powierzchni nanomateriałów.

VI. FUNKCJONALIZOWANIE POWIERZCHNI NANOMATERIAŁÓW ZA POMOCĄ POCHODNYCH 1,3,5-TRIAZYN

Główny nurt badań nad opracowaniem metod funkcjonalizacji powierzchni nanomateriałów przy wykorzystaniu pochodnych 1,3,5-triazyn związany był z realizacją projektu PBS2/A5/31/2013 pt. „Opracowanie technologii elektromagnetycznego nagrzewania nanozasobników ferromagnetyka dla selektywnej termoablacji komórek nowotworowych”, w którym byłam głównym wykonawcą.

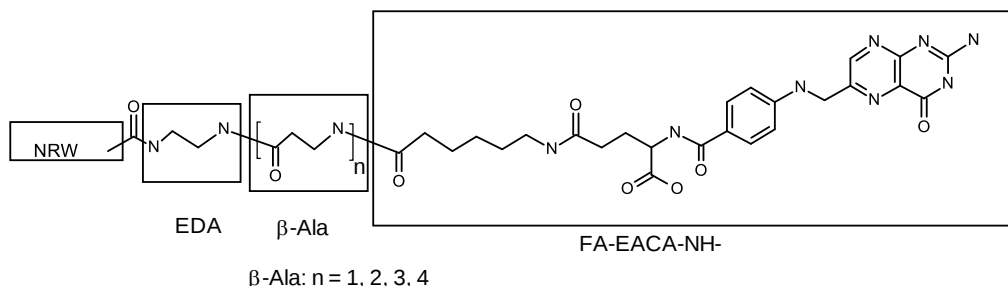
Prowadzone badania zmierzały do opracowania metod funkcjonalizacji nanomateriałów (nanorurki węglowe), które modyfikowane byłyby zarówno endo- jak i egzohedralnie. Endohedralna funkcjonalizacja związana była z wprowadzaniem ferromagnetyku, zaś egzohedralna z funkcjonalizacją pozwalającą na przyłączenie na powierzchni materiału ligandów i/lub leków użytecznych w terapii przeciwnowotworowej. Mając na uwadze fakt, że wewnątrz nanorurek węglowych wypełnione było ferromagnetykiem oraz że stosowane były otwarte nanorurki węglowe, konieczne było opracowanie metod kowalencyjnego funkcjonalizowania, warunkujących wyeliminowanie procesu wymywania (leaching) ferromagnetyka związanego z nanonośnikiem wiązaniami niekowalencyjnymi. Z obawy o wymywanie ferromagnetycznego rdzenia nanorurek pod działaniem HCl, zrezygnowałam ze stosowanego rutynowo chlorku tionylu lub chlorku oksalilu do aktywacji grup karboksylowych obecnych na powierzchni nanomateriałów. Przyjęłam, że wyeliminuję chlorki kwasowe i zastąpię je tworzonymi w wyjątkowo łagodnych warunkach estrami triazynowymi kwasów karboksylowych. Oczekiwałam, że wysoka reaktywność estrów triazynowych pozwoli mi na przyłączenie do powierzchni wstępnie utlenionych nanorurek węglowych pochodnych, warunkujących założoną aktywność biologiczną. Stwierdziłam, że zastosowanie stabilnych soli *N*-triazynyloamoniowych (DMT/NMM/TosO⁻ lub DMT/NMM/BF₄⁻) pozwala na wydajną transformację grup karboksylowych na powierzchni nanomateriałów węglowych w superaktywne estry triazynowe, które można wykorzystać do bezpośredniego przyłączania różnorodnych nukleofili (zgłoszenie patentowe B11 dokonane po uzyskaniu stopnia doktora, nie wchodzące w skład niniejszego postępowania habilitacyjnego).



Rysunek 22. Bezpośrednie otrzymywanie superaktywnego estru triazynowego na powierzchni nanomateriału węglowego.

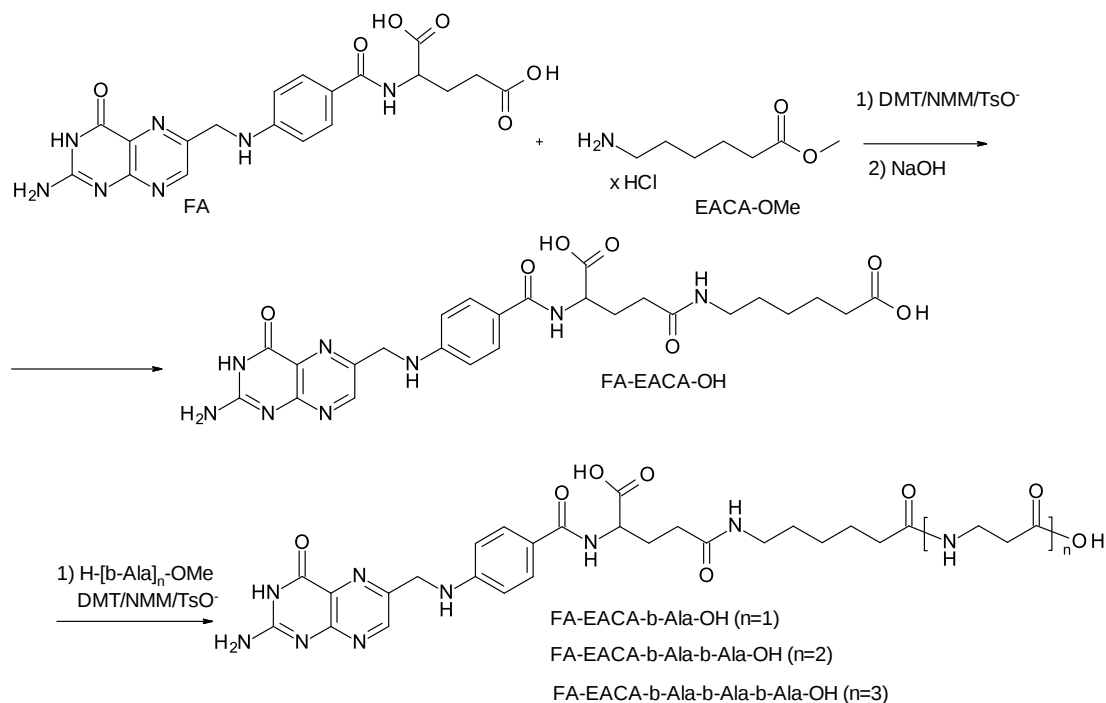
Mając na uwadze potencjalne *in vivo* wykorzystanie modyfikowanych nanomateriałów przyjęłam, że jako układy separujące nanomateriał od immobilizowanych biologicznie aktywnych związków zastosuję peptydy. W tym przypadku fragment peptydowy pełnił podwójną funkcję: z jednej strony łącznika warunkującego eksponowanie docelowego związku jak również układu, który ma „otoczyć” nanomateriał, maskując jego zazwyczaj toksyczne właściwości. Wybór łącznika peptydowego powinien również poprawiać biokompatybilność funkcjonalizowanych nanomateriałów. Przystępując do prac badawczych, przyjęłam, że łącznik peptydowy powinien charakteryzować się zwiększoną odpornością na działanie enzymów proteolitycznych w porównaniu do peptydów złożonych z kodowanych aminokwasów. W związku z tym przyjęłam, że łącznik peptydowy złożony będzie ze zmiennej liczby

reszt β -alaniny oraz kwasu 5-aminoheksanowego (praca **H6**). Poprzez zaprojektowany łącznik peptydowy zaplanowałam przyłączyć resztę kwasu foliowego (ligand receptorów folianowych występujących w nadekspresji w komórkach nowotworowych) oraz karboksyfluoresceinę zastosowaną celem potwierdzenia faktu oddziaływania nanomateriałów z komórkami.



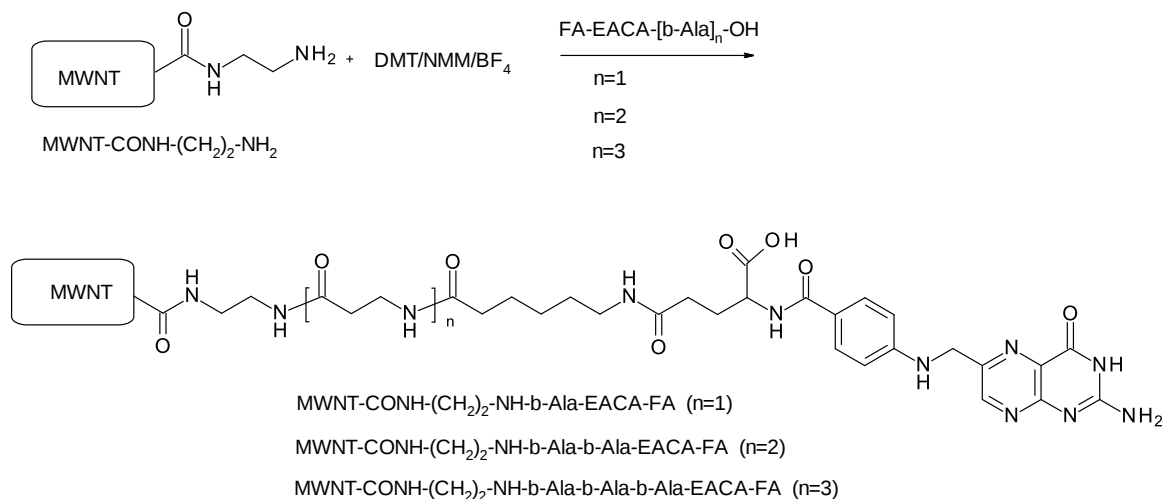
Rysunek 23. Struktura zaprojektowanych koniugatów kwasu foliowego z NRW.

Przyjęłam, że optymalne z syntetycznego punktu widzenia jest podejście wykorzystujące strategię zbieżną, która pozwala na przygotowanie bloków budulcowych w klasycznych warunkach syntezy w roztworze i następnie ich sprzęganie z nanomateriałem. Podejście takie pozwoliło mi na pełną charakterystykę syntezowanych koniugatów, wykorzystując klasyczne techniki analityczne ($^1\text{H-NMR}$, MS). Należy bowiem podkreślić, że zastosowanie modyfikacji chemicznej nanomateriałów metodą krok po kroku uniemożliwiłoby mi wykorzystanie większości technik analitycznych z uwagi na zbyt niską dyspersyjność stosowanych nanomateriałów.



Rysunek 24. Synteza koniugatów kwasu foliowego z łącznikiem peptydowym.

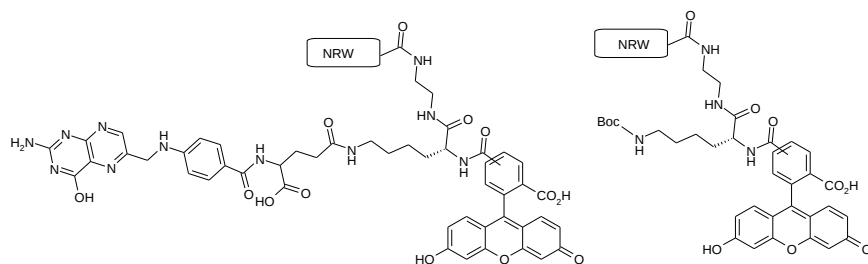
Końcowy etap syntezy polegał na sprzęganiu koniugatów kwasu foliowego z prefunkcjonalizowanymi nanorurkami węglowymi przy użyciu triazynowego odczynnika kondensującego.



Rysunek 25. Synteza modyfikowanych nanomateriałów *via* acylowanie grupy aminowej na powierzchni prefunkcjonalizowanych NRW koniugatami łącznik-FA przy użyciu DMT/MMM/BF₄ jako odczynnika kondensującego.

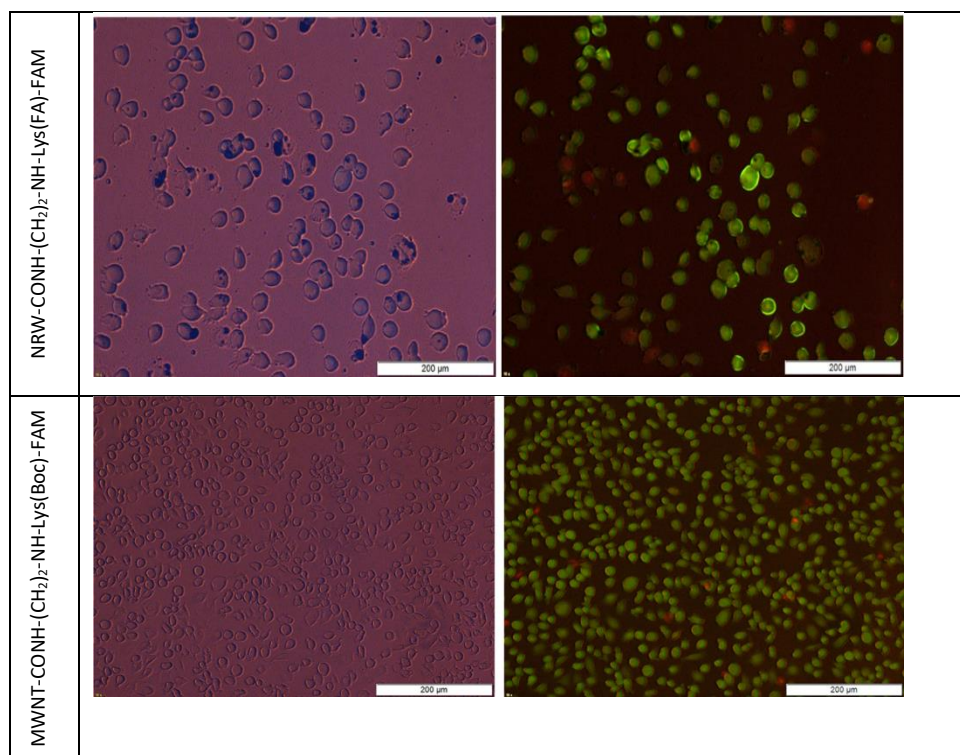
Zbadana została cytotoksyczność zsyntezowanych koniugatów wobec linii komórkowych kolonocytów CCD 841 CoN oraz wobec linii nowotworu okrężnicy HT-29. W obu przypadkach nie stwierdzono wpływu toksycznego. Stwierdziłam również, że funkcjonalizowane nanorurki węglowe nie są toksyczne względem leukocytów oraz nie powodują hemolizy erytrocytów. Wyniki te potwierdziły założenie, że odpowiednia funkcjonalizacja może zniwelować toksyczne działanie nanomateriałów, a tym samym materiały te mogą znaleźć zastosowanie w terapiach przeciwnowotworowych. Zgodnie z założeniami, zastosowanie niekodowanych aminokwasów w łączniku peptydowym pozwoliło mi na uzyskanie pochodnych odpornych na działanie enzymów proteolitycznych obecnych w plazmie krwi ludzkiej, zawierającej pulę enzymów proteolitycznych.

Wbudowanie sondy fluorescencyjnej na powierzchnię nanorurek węglowych pozwoliło mi na śledzenie oddziaływania modyfikowanego nanomateriału z komórkami. Otrzymałam nanorurki węglowe sfunkcjonalizowane na powierzchni 5(6)-karboksylfluoresceiną, wykorzystując pochodną lizyny jako łącznik pomiędzy nanorurką węglową a fluoroforem. Obecność dwóch grup aminowych w lizynie pozwoliła mi na uzyskanie nanorurek węglowych zawierających na powierzchni tylko fluorofor, jak również fluorofor i kwas foliowy jako element zwiększający selektywność oddziaływania komórka – koniugat.



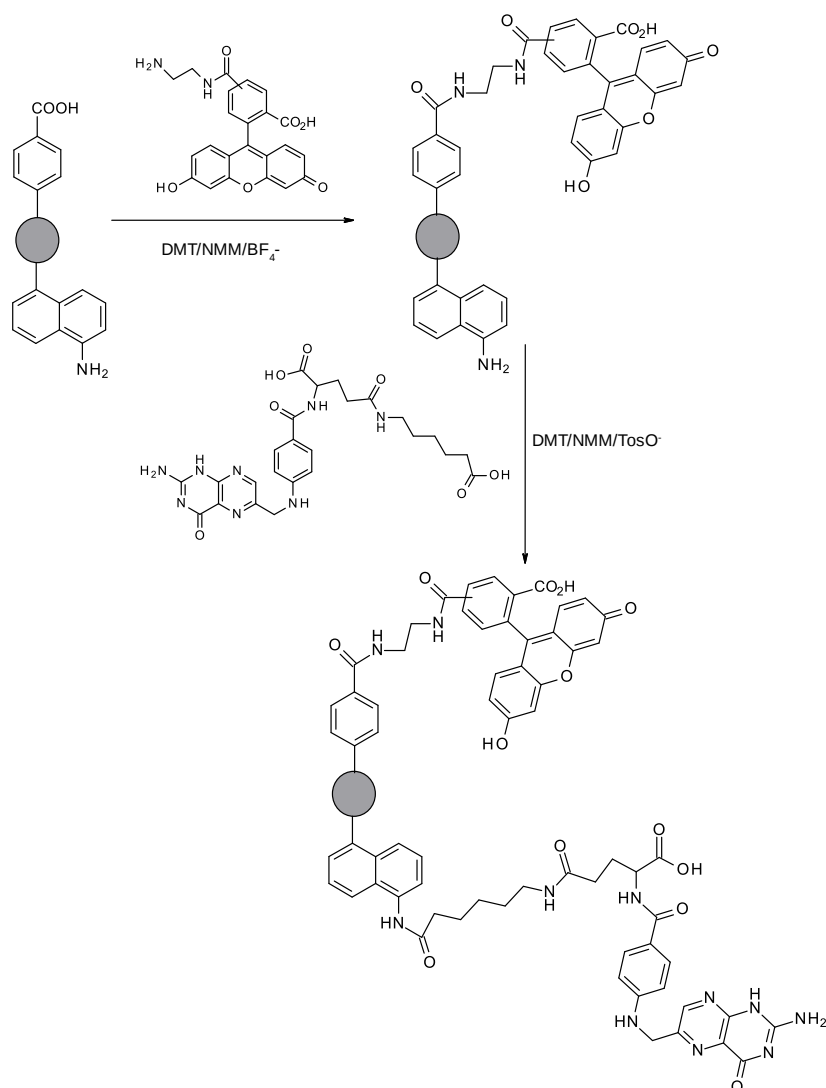
Rysunek 26. Struktura otrzymanych nanorurek węglowych z przyłączoną resztą karboksyfluoresceiny.

Syntezę pochodnych lizyny z 5(6)-karboksyfluoresceiną przeprowadziłam w warunkach syntezy na fazie stałej, wykorzystując czwartorzędowe sole *N*-triazynyloamoniowe jako odczynnik kondensujący. Również w tym przypadku zastosowana została strategia zbieżna syntezy. Pochodne lizyny z karboksyfluoresceiną i/lub karboksyfluoresceiny i kwasu foliowego otrzymałam klasyczną drogą syntezy peptydów przy użyciu DMT/NMM/TosO⁻. Ostatni etap syntezy polegał na dobudowaniu do uprzednio sfunkcjonalizowanych za pomocą 1,2-etylenodiaminy nanorurek węglowych modyfikowanych pochodnych lizyny. Badania cytotoksyczności (metoda Live/Dead) wykazały brak toksyczności. Natomiast badania techniką mikroskopii fluorescencyjnej wykazały, że koniugaty nanomateriałów węglowych modyfikowane znacznikiem fluorescencyjnym oraz kwasem foliowym wiążą się do błony komórkowej, gdzie zlokalizowane są receptory kwasu foliowego, zaś w przypadku koniugatów nie zawierających kwasu foliowego powinowactwo do komórek było znikome.



Rysunek 27. Zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego obrazujące oddziaływania koniugatów modyfikowanych NRW z komórkami (FA-kwas foliowy, FAM-pochodna karboksyfluoresceiny połączona wiązaniem amidowym).

Prace nad funkcjonalizacją nanorurek węglowych zapoczątkowały badania nad opracowaniem metody funkcjonalizacji nanomateriałów węglowych, pozwalającej na jednoczesne wprowadzanie na powierzchnię nanomateriałów węglowych zróżnicowanych pod względem właściwości grup funkcyjnych (kwas/zasada, nukleofil/elektrofil). Oczekiwałam, że podejście takie pozwoliłoby na funkcjonalizację materiałów, umożliwiającą selektywne wprowadzanie ligandów naprowadzających, środków terapeutycznych i/lub znaczników fluorescencyjnych. Dalekosiężnym celem tych prac jest opracowanie metody funkcjonalizacji nanomateriałów, pozwalającej otrzymywać układy, których działanie wykorzystywać będzie: (a) nanorozmiar pozwalający na łatwy transport w organizmie i docieranie do dowolnego miejsca, (b) obecność ligandów naprowadzających, gwarantująca selektywność działania względem nieprawidłowych komórek, (c) obecność terapeutyku (bądź bioznacznika) jako integralnej części funkcjonalizowanego nanomateriału. Stwierdziłam, że zastosowanie amin aromatycznych [34] jako metody pre-funkcjonalizacji nanomateriałów węglowych pozwala na wprowadzenie zróżnicowanych grup funkcyjnych na ich powierzchnię i zrealizowanie wymienionych powyżej zamierzeń (praca **H10**). Prace optymalizacyjne pozwoliły mi na stwierdzenie, że najwyższe wartości obsadzenia powierzchni grupami funkcyjnymi uzyskuje się stosując reakcję z wykorzystaniem soli diazoniowych generowanych *in situ* w wyniku reakcji pochodnych amin aromatycznych z azotynem izoamylu. Utworzone sole diazoniowe ulegają reakcjom sprzęgania z atomami węgla hybrydyzacji sp^2 C=C. Stwierdziłam również, że możliwe jest stosowanie bądź równomolowych ilości zróżnicowanych strukturalnie pochodnych amin aromatycznych bądź mieszanin o różnym stężeniu, co pozwala na wprowadzanie na powierzchnie nanomateriałów grup funkcyjnych o zamierzonym charakterze oraz w założonej ilości. Oprócz typowych nanomateriałów węglowych zawierających pierścienie aromatyczne, omawianą metodę zastosowałam do modyfikowania powierzchni proszku nanodiamamentowego, poddanego wcześniejszemu procesowi laserowej anelacji. Proszek nanodiamamentowy zawierający na powierzchni atomy węgla o hybrydyzacji sp^2 (obecność wiązań C=C) poddałam działaniu równomolowej mieszaniny kwasu p-aminobenzoowego oraz 1,5-diaminonaftalenu w obecności azotynu izoamylu. W oparciu o wyniki miareczkowania stwierdziłam, że ilość wprowadzonych grup wynosi odpowiednio 0.994 mmol/g grup COOH oraz 1.426 mmola/g grup NH₂. Podejście to pozwoliło mi na otrzymanie nanomateriałów, które z punktu widzenia charakteru obecnych grup funkcyjnych przypominają łańcuch peptydowy, zwiększając tym samym biokompatybilność nanomateriału. Obecność grupy aminowej i karboksylowej umożliwiła mi dalszą funkcjonalizację proszku nanodiamamentowego i wprowadzenie na powierzchnię wskaźnika fluorescencyjnego (pochodna 5(6)-karboksyfluoresceiny) oraz ligandu naprowadzającego (pochodna kwasu foliowego).



Rysunek 28. Funkcjonalizacja nanoproszku diamentowego zawierającego na powierzchni resztę kwasu benzoesowego oraz naftyloaminy.

W procesie funkcjonalizacji wykorzystałam czwartorzędowe stabilne sole *N*-triazynyloamoniowe jako odczynniki kondensujące. Opracowane rozwiązanie ma charakter ogólny i pozwala na ortogonalną funkcjonalizację powierzchni nanomateriałów węglowych przy użyciu równomolowych mieszanin amin aromatycznych. W badaniach jako nanomateriały zastosowałam, oprócz olefinowanego nanoproszku diamentowego, również wielościennie nanorurki węglowe oraz tlenek grafenu. Optymalizacja procesu pozwoliła mi na wprowadzenie na powierzchnię nanomateriałów węglowych grup o charakterze elektrofilowym oraz nukleofilowym, w niemalże równoważnych ilościach. Metoda ta pozwala na prowadzenie dalszych funkcjonalizacji i wprowadzanie na powierzchnię nanomateriałów węglowych zróżnicowanych chemicznie związków w sposób dostosowany do ich finalnego przeznaczenia.

VII. PODSUMOWANIE

Główne osiągnięcia naukowe zgłoszone jako podstawa do przewodu habilitacyjnego:

1. Optymalizacja procedury modyfikowania podłoży stałych zawierających grupy o charakterze nukleofilowym za pomocą pochodnych 1,3,5-triazyny. Opracowana procedura wbudowywania fragmentu chloro-metoksy-1,3,5-triazyny wywodzącego się z 2,4-dichloro-6-metoksy-1,3,5-triazyny gwarantuje równomierne wprowadzanie rdzenia triazynowego na podłoże stałe, co z kolei przekłada się na pełną powtarzalność wyników badań nad dalszym wykorzystaniem modyfikowanych matryc stałych.
2. Zaprojektowanie i opracowanie metody otrzymywania dwóch nowych typów łączników 1,3,5-triazynowych osadzonych na podłożu stałym: nierozszczepialnego – zawierającego fragment 1,3,5-triazyny i *m*-fenylenodiaminy (typ A), który warunkuje tworzenie receptorów molekularnych przez *N*-lipidowane peptydy oraz rozszczepialnego – zawierającego fragment izocyjanurowy oraz kwasowy/aminokwasowy (typ B) umożliwiający identyfikację struktury podandów klasycznymi metodami spektroskopowymi.
3. Opracowanie protokołów automatycznej syntezy SPOT bibliotek peptydowych oraz zawierających modyfikowane peptydy na podłożu celulozowym zawierającym oba typy łączników oraz przy użyciu triazynowych odczynników kondensujących.
4. Wykazanie, że opracowana procedura funkcjonalizacji materiałów stałych za pomocą łącznika typu A pozwala na wykorzystanie bibliotek *N*-lipidowanych peptydów jako:
 - receptorów molekularnych użytecznych w badaniu pojedynczych ligandów (badania oddziaływania z substancjami aktywnymi farmakologicznie oraz badania przesiewowe w poszukiwaniu nowych leków),
 - receptorów molekularnych pozwalających na badanie złożonych mieszanin (płyny fizjologiczne). Wyniki badań nad wykorzystaniem niskocząsteczkowych homogenatów tkankowych oraz moczu powinny pozwolić na opracowanie narzędzia, opartego na wyselekcjonowanych receptorach molekularnych, użytecznego w diagnostyce medycznej.
5. Wykazanie, że wbudowanie do fragmentu peptydowego pochodnych złożonych z reszt aminokwasowych warunkujących aktywność enzymów, pozwala na otrzymanie bibliotek synzymów, które mimikują swoim działaniem enzymy. Stwierdzono, że możliwe jest projektowanie i otrzymanie *N*-lipidowanych peptydów osadzonych na podłożu stałym, które efektywnie katalizują reakcje hydrolizy estrów *p*-nitrofenylowych, ich transestryfikację a nawet pozwalają na rozszczepienie wiązania amidowego (peptydowego) w łagodnych warunkach zbliżonych do fizjologicznych.

6. Udokumentowanie, że procedury z użyciem pochodnych 1,3,5-triazyny z powodzeniem mogą być zastosowane do funkcyjonalizowania nanomateriałów w wysoce łagodnych warunkach syntetycznych, co zmniejsza prawdopodobieństwo aglomeracji nanomateriałów oraz pozwala na wydajne wbudowywanie związków wrażliwych na drastyczne warunki reakcji (peptydy, kwas foliowy, sondy fluorescencyjne i inne).

VIII. LITERATURA

- [1] M. Mozetič, Surface Modification to Improve Properties of Materials. *Materials*, **2019**, *12*, 441;
- [2] a) D. Hetemi, J. Pinson, Surface functionalisation of polymers. *Chem. Soc. Rev.*, **2017**, *46*, 5701-5713; b) H. Ritter, Functionalized polymers: synthesis and properties. *Beilstein J. Org. Chem.*, **2010**, *6*, 55.
- [3] a) K. Dooley, J. Devalliere, B.E. Uygun, M.L. Yarmush, Functionalized Biopolymer Particles Enhance Performance of a Tissue-Protective Peptide under Proteolytic and Thermal Stress. *Biomacromolecules*, **2016**, *17*, 2073–2079; b) Surface Modification of Biopolymers, Editor(s): Vijay Kumar Thakur Amar Singh Singha, 2015, John Wiley & Sons, Inc.; c) D.S. Roosevelt, P.R.S. Bezerra, A.S.N.M. Teixeira, C.E. Teixeira, J.A. Osajima. E.C. Silva Filho (December 9th 2015). Chemical Functionalization of Cellulosic Materials — Main Reactions and Applications in the Contaminants Removal of Aqueous Medium, Cellulose - Fundamental Aspects and Current Trends, Matheus Poletto and Heitor Luiz Ornaghi Junior, IntechOpen, DOI: 10.5772/61431; d) S. Pokhrel, P.N. Yadav, Functionalization of chitosan polymer and their applications, *J. Macromol. Sci. A*, **2019**, DOI: 10.1080/10601325.2019.1581576; e) C.K. Williams, Synthesis of functionalized biodegradable polyesters. *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, *36*, 1573-1580.
- [4] a) Chemical Functionalization of Carbon Nanomaterials: Chemistry and Applications, Editors: Vijay Kumar Thakur, Manju Kumari Thakur, 2018, CRC Press; b) K.E. Sapsford, W. R. Algar, L. Berti, K. Boeneman Gemmill, B.J. Casey, E. Oh, M.H. Stewart, I.L. Medintz, Functionalizing Nanoparticles with Biological Molecules: Developing Chemistries that Facilitate Nanotechnology. *Chem. Rev.*, **2013**, *113*, 1904–2074; c) N. Bardhan, 30 years of advances in functionalization of carbon nanomaterials for biomedical applications: A practical review. *J. Mater. Res.*, **2017**, *32*, 107-127; d) N.T.K. Thanh, L.A.W. Green, Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications. *Nano Today*, **2010**, *5*, 213–230.
- [5] A. Liberman, N. Mendez, W.C. Trogler, A.C. Kummel, Synthesis and surface functionalization of silica nanoparticles for nanomedicine. *Surf. Sci. Rep.*, **2014**, *69*, 132–158; b) P.M. Visintin, R.G. Carbonell, C.K. Schauer, J.M. DeSimone, Chemical Functionalization of Silica and Alumina Particles for Dispersion in Carbon Dioxide. *Langmuir*, **2005**, *21*, 4816–4823; c) T. Asefa, Z. Tao, Mesoporous silica and organosilica materials — Review of their synthesis and organic functionalization. *Can. J. Chem.*, **2012**, *90*, 1015-1031; d) A. Mehmood, H. Ghafar, S. Yaqoob, U.F. Gohar, B. Ahmad, Mesoporous Silica Nanoparticles: A Review. *J. Develop. Drugs*, **2017**, *6*, 174.
- [6] a) M.A. Neouze, U. Schubert, Surface Modification and Functionalization of Metal and Metal Oxide Nanoparticles by Organic Ligands. *Monatsh. Chem.*, **2008**, *139*, 183; b) M. Oliverio, S. Perotto, G.C. Messina, L. Lovato, F. De Angelis, Chemical Functionalization of Plasmonic Surface Biosensors: A Tutorial Review on Issues, Strategies, and Costs. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2017**, *9*, 29394–29411; c) B. Malekian, R.L. Schoch, T. Robson, G. Ferrand-Drake del Castillo, K. Xiong, G. Emilsson, L.E. Kapinos, R.Y.H. Lim, A. Dahlin, Detecting Selective Protein Binding Inside Plasmonic Nanopores: Toward a Mimic of the Nuclear Pore Complex. *Front Chem.*, **2018**, *6*, 637; d) S. Mariani, V. Robbiano, L.M. Strambini, A. Debrassi, G. Egri, L. Dähne, G. Barillaro, Layer-by-layer biofunctionalization of nanostructured porous silicon for high-sensitivity and high-selectivity label-free affinity biosensing. *Nat. Commun.*, **2018**, *9*, 5256; e) S. Górka, A. Rydosz, E. Brzozowska, M. Drab, K. Wincza, A. Gamian, S. Gruszczyński, Effectiveness of Sensors Contact Metallization (Ti, Au, and Ru) and Biofunctionalization for Escherichia coli Detection. *Sensors*, **2018**, *18*, 2912; f) K. Mahato, P. Kumar Maurya, P. Chandra, Fundamentals and commercial aspects of nanobiosensors in point-of-care clinical diagnostics. *3 Biotech.*, **2018**, *8*, 149; g) R. Radhakrishnan, P. Poltronieri, Fluorescence-Free Biosensor Methods in Detection of Food Pathogens with a Special Focus on Listeria monocytogenes. *Biosensors*, **2017**, *7*, 63.
- [7] a) E. Gentleman, M.D. Ball, M.M. Stevens, Medical Sciences, voll II, Biomaterials, EOLSS publishers, Oxford, UK, 2009; b) S.K. Jaganathan, A. Balaji, M.V. Vellayappan, A.P. Subramanian, A.A. John, M.K. Asokan, E. Supriyanto, *J. Mater. Sci.*, **2014**, 2007–2018.
- [8] A.A. John, A.P. Subramanian, M.V. Vellayappan, A. Balaji, S.K. Jaganathan, H. Mohandas, T. Paramalinggam, E. Supriyanto, M. Yusof, Review: physico-chemical modification as a versatile strategy for the biocompatibility enhancement of biomaterials. *RSC Adv.*, **2015**, *5*, 39232–39244.
- [9] a) R. Frank, Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron*, **1992**, *48*, 9217-9232; b) Blthner, M.; Koch, J.; Mahler, M., *Springer*, Heidelberg, **2002**, 123–139.

- [10] a) Petersen, G.; eds. Koch, J.; Mahler, M., *Springer Verlag*, Berlin, **2002**, 123, 41-53; b) Gausepohl, H.; Behn, C.; eds. Koch, J.; Mahler, M., *Springer Verlag*, Berlin, **2002**, 55-68.
- [11] A. Dürauer, E. Kopecky, E. Berger, M. Seifert, R. Hahn, A. Jungbauer, Evaluation of a sensitive detection method for peptide arrays prepared by SPOT synthesis. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **2006**, *66*, 45-57.
- [12] a) D.M. Pacheco, J.R. Johnson, W.J. Koros, minosilane-Functionalized Cellulosic Polymer for Increased Carbon Dioxide Sorption. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2012**, *51*, 503-514; b) E. Robles, L. Csóka, J. Labidi, Effect of Reaction Conditions on the Surface Modification of Cellulose Nanofibrils with Aminopropyl Triethoxysilane. *Coatings*, **2018**, *8*, 139; c) K. Hanieh, M. Marcos, G. Deepu, A. Ishak, T. Sabu, Advances in cellulose nanomaterials. *Cellulose*, **2018**, *25*, 2151-2189.
- [13] A. El-Faham, F. Albericio, Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chem. Rev.*, **2011**, *111*, 6557-6602.
- [14] a) R. Volkmer-Engert, B. Hoffmann, Schneider- J. Mergener, Stable Attachment of the HMB-Linker to Continuous Cellulose Membranes for Parallel Solid Phase Spot. Synthesis *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 1029-1032; b) C. Landgraf, S. Panni, L. Montecchi-Palazzi, L. Castagnoli, J. Schneider-Mergener, R. Volkmer-Engert, G. Cesareni, Protein Interaction Networks by Proteome Peptide Scanning. *PLoS Biol.*, **2004**, *2*, 94-103; c) K. Licha, S. Bhargava, C. Rheinländer, A. Becker, J. Schneider-Mergener, R. Volkmer-Engert, Highly parallel nano-synthesis of cleavable peptide-dye conjugates on cellulose membranes. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 1711-1715; d) K. Hilpert, M. Elliott, H. Jenssen, J. Kindrachuk, C.D. Fjell, J. Körner, D.F.H. Winkler, L.L. Weaver, P. Henklein, A.S. Ulrich, S.H.Y. Chiang, S.W. Farmer, N. Pante, R. Volkmer, R.E.W. Hancock, Screening and characterization of surface-tethered cationic peptides for antimicrobial activity. *Chem. Biol.*, **2009**, *16*, 58-69; e) V. Tapia, B. Ay, J. Triebus, E. Wolter, P. Boisguerin, R. Volkmer, Evaluating the coupling efficiency of phosphorylated amino acids for SPOT synthesis. *J. Pept. Sci.*, **2008**, *14*, 1309-1314.
- [15] a) I. Cumpstey, Chemical Modification of Polysaccharides. *ISRN Organic Chemistry*, **2013**, Article ID 417672; b) K. Missoum, M.N. Belgacem, J. Bras, Nanofibrillated Cellulose Surface Modification: A Review. *Materials*, **2013**, *6*, 1745-1766; c) V.O. Cirino, A.L. Bullock, S.P. Rowland, Selective reactivities and accessibilities of the hydroxyl groups in cotton cellulose based on equilibrium data from a reversible chemical reaction. *J. Polym. Sci. A*, **1969**, *7*, 1225-1235.
- [16] Fengel, D., Characteristics of cellulose by deconvoluting of OH valency range in FTIR spectra, *Holzforschung*, **1992**, *46*, 283-288.
- [17] R. Preussmann, H. Schneider, F. Eppe, Identification of alkylating agents. II. Identification of different classes of alkylating agents by a modification of the color reaction with 4-(4-nitrobenzyl)-pyridine (NBP). *Arzneimittelforschung*. **1969**, *19*, 1059-1073.
- [18] Z.J. Kamiński, M.L. Główna, A. Olczak, D. Martynowski, Thermal isomerization of 2-acyloxy-4,6-dimethoxy 1,3,5-triazines to 3,5-dimethyl-1,3,5-triazin-2,4,6(1h,3h,5h)-triones - crystal-structure of 3,5-dimethyl-1,3,5-triazin-2,4,6(1h,3h,5h)-trione. *Pol. J. Chem.*, **1996**, *70*, 1316-1323.
- [19] a) N. Baindur, N. Chadha, B.M. Brandt, D. Asgari, R.J. Patch, C. Schalk-HiHi, T.E. Carver, I.P. Petrounia, C.A. Baumann, H. Ott, C. Manthey, B.A. Springer, M.R. Player, 2-Hydroxy-4,6-diamino-[1,3,5]-triazines: A novel class of VEGF-R2 (KDR) tyrosine kinase inhibitors. *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 1717-1720; b) S. Nozaki, M. Maeda, H. Tsuda, G.W. Sledge, Inhibition of breast cancer regrowth and pulmonary metastasis in nude mice by anti-gastric ulcer agent, Irsogladine. *Breast Cancer Res. Treat.*, **2004**, *83*, 195-199; c) R. Menicagli, S. Samaritani, G. Signore, F. Vaglini, L. Dalla Via, In Vitro Cytotoxic Activities of 2-Alkyl-4,6-diheteroalkyl-1,3,5-triazines: New Molecules in Anticancer Research. *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 4649-4652; d) T.D. Cushing, D.P. Metz, D.A. Whittington, L.R. McGee, PI3K δ and PI3K γ as targets for autoimmune and inflammatory diseases. *J. Med. Chem.*, **2012**, *55*, 8559-8581; e) S. Yaguchi, Y. Fukui, I. Koshimizu, H. Yoshimi, T. Matsuno, H. Gouda, S. Hirono, K. Yamazaki, T. Yamori, Antitumor activity of ZSTK474, a new phosphatidylinositol 3-Kinase inhibitor. *J. Natl. Cancer Inst.*, **2006**, *98*, 545-556; f) I. Paquin, S. Raepel, S. Leit, F. Gaudette, N. Zhou, O. Moradeia, O. Saavedra, N. Bernstein, F. Raepel, G. Bouchain, S. Fréchette, S.H. Woo, A. Vaisburg, M. Fournel, A. Kalita, M.F. Robert, A. Lu, M.C. Trachy-Bourget, P.T. Yan, J. Liu, J. Rahil, A.R. MacLeod, J.M. Besterman, Z. Li, D. Delorme, Design and synthesis of 4-[(s-triazin-2-ylamino)methyl]-N-(2-aminophenyl)-benzamides and their analogues as a novel class of histone deacetylase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18*, 1067-1071; h) S. Mandal, G. Bérubé, É. Asselin, I. Mohammad, V.J. Richardson, A. Gupta, S.K. Pramanik, A.L. Williams, S.K. Mandal, A novel series of potent cytotoxic agents targeting G2/M phase of the cell cycle and demonstrating cell killing by apoptosis in human breast cancer cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, *17*, 4955-4960; i) J.F. Riou, L. Guittat, P. Mailliet, A. Laoui, E. Renou, O. Petitgenet, F. Megnin-Chanet, C. Helene, J.L. Mergny, Cell senescence and telomerase shortening induced by a new series of specific G-quadruplex DNA ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, *99*, 2672-2677; j) Z. Brzozowski, F. Sączewski, M. Gdaniec, Synthesis, structural characterization and antitumor activity of novel 2,4-diamino-1,3,5-triazine derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, **2000**, *35*, 1053-1064; k) F. Sączewski, A. Bułakowska, P. Bednarski, R. Grunert, Synthesis, structure and anticancer activity of novel 2,4-diamino-1,3,5-triazine derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, **2006**, *41*, 219-225; l) F. Sączewski, A. Bułakowska, Synthesis, structure and anticancer activity of novel alkenyl-1,3,5-triazine derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, **2006**, *41*, 611-615; m) D.R. Shah, R.P. Modh, K.H. Chikhalia, Privileged s-triazines: Structure and pharmacological applications. *Future Med. Chem.*, **2014**, *6*, 463-477.
- [20] a) R. Patil, A. Kulshrestha, A. Tikoo, S. Fleetwood, G. Katara, B. Kolli, W. Seibel, A. Gilman-Sachs, S. A. Patil, K. D. Beaman, Identification of Novel Bisbenzimidazole Derivatives as Anticancer Vacuolar (H⁺)-ATPase Inhibitors. *Molecules*, **2017**, *22*, 1559; b) K. Alevizopoulos, T. Calogeropoulou, F. Lang, C. Stournaras., Na⁺/K⁺ ATPase inhibitors in cancer. *Curr. Drug Targets.*, **2014**, *15*, 988-1000; c) K. Ikemura, S. Hiramatsu, M. Okuda, Drug Repositioning of Proton Pump Inhibitors for Enhanced Efficacy and Safety of Cancer Chemotherapy. *Front. Pharmacol.*, **2017**, doi.org/10.3389/fphar.2017.00911
- [21] a) Schlicker, E.; Kathmann, N. In: The Histamine H3 Receptor. A Target For New Drugs, Leurs, R.; Timmerman, H. Ed.; Elsevier, 1998, pp. 13-26; b) Blandina, P.; Bacciottini, L.; Giovannini, M.G.; Mannaioni, P.F. In: The Histamine H3 Receptor. A Target For New Drugs, Leurs, R.; Timmerman, H. Ed.; Elsevier, 1998, pp. 27-40.

- [22] a) J.H. Park, P. Scheerer, K.P. Hofmann, H.W. Choe, O.P. Ernst, Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature*, **2008**, *454*, 183-187; b) P. Scheerer, J.H. Park, P.W. Hildebrand, Y.J. Kim, N. Krauss, H.W. Choe, K.P. Hofmann, O.P. Ernst, Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature*, **2008**, *455*, 497-502; c) S.G. Rasmussen, H.J. Choi, D.M. Rosenbaum, T.S. Kobilka, F.S. Thian, P.C. Edwards, M. Burghammer, V.R. Ratnala, R. Sanishvili, R.F. Fischetti, G.F. Schertler, W.I. Weis, B.K. Kobilka, Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, **2007**, *450*, 383-387; d) T. Mirzadegan, G. Benkö, S. Filipek, K. Palczewski, Sequence analyses of G-protein-coupled receptors: similarities to rhodopsin. *Biochemistry*, **2003**, *42*, 2759-2767; e) D.M. Rosenbaum, V. Cherezov, M.A. Hanson, S.G. Rasmussen, F.S. Thian, T.S. Kobilka, H.J. Choi, X.J. Yao, W.I. Weis, R.C. Stevens, B.K. Kobilka, GPCR engineering yields high-resolution structural insights into b2-adrenergic receptor function. *Science*, **2007**, *318*, 1266-1273; f) V.P. Jaakola, M.T. Griffith, M.A. Hanson, V. Cherezov, E.Y. Chien, J.R. Lane, A.P. Ijzerman, R.C. Stevens, The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science*, **2008**, *322*, 1211-1217; g) A.A. Spasov, M.V. Chernikov, Histamine: Receptors and Histaminergic Substances (A Review). *Pharm. Chem. J.*, **2000**, *34*, 395-407.
- [23] a) C.B. Clish, Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine. *Cold Spring Harb. Mol. Case Stud.*, **2015**, *1*, a000588; b) V. Tolstikov, V.R. Akmaev, R. Sarangarajan, N.R. Narain, M.A. Kiebish, Clinical metabolomics: a pivotal tool for companion diagnostic development and precision medicine. *Exp. Rev. Mol. Diagn.*, **2017**, *17*, 411-413; c) J.P. Posti, A.M. Dickens, M. Orešič, T. Hyötyläinen, O. Tenovuori, Metabolomics Profiling As a Diagnostic Tool in Severe Traumatic Brain Injury. *Front. Neurol.*, **2017**, *8*, 398; d) Ż. Smoleńska, Z. Zdrojewski, Metabolomics and its potential in diagnosis, prognosis and treatment of rheumatic diseases. *Reumatologia*, **2015**, *53*, 152-156.
- [24] M. Muluneh, D. Issadore, Microchip-based detection of magnetically labeled cancer biomarkers. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2014**, *66*, 101-109.
- [25] a) D. Verdegem, S. Moens, P. Stapor, P. Carmeliet, Endothelial cell metabolism: parallels and divergences with cancer cell metabolism. *Cancer Metab.*, **2014**, *2*, 19; b) V. Ribas, C. García-Ruiz, J.C., Fernández-Checa, Mitochondria, cholesterol and cancer cell metabolism. *Clin. Transl. Med.*, **2016**, *5*, 22; c) P. Sancho, D. Barneda, C. Heeschen, Hallmarks of cancer stem cell metabolism. *Br. J. Cancer*, **2016**, *114*, 1305-1312; d) Beloribi-Djefaflija S., Vasseur S., Guillaumond F.: Oncogenesis 5, e189 (2016); e) M. Yang, P. Liu, P. Huang, Cancer stem cells, metabolism, and therapeutic significance. *Tumour Biol.*, **2016**, *37*, 5735-5742; f) C.R. Justus, E.J. Sanderlin, L.V. Yang, Molecular Connections between Cancer Cell Metabolism and the Tumor Microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.*, **2015**, *16*, 11055-11086; g) E. Villa, J.E. Ricci, How does metabolism affect cell death in cancer? *FEBS J.*, **2016**, *283*, 2653-2660; h) L.K. Borouh, R.J. DeBerardinis, Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nat. Cell Biol.*, **2015**, *17*, 351-359; i) K. Yizhak, E. Gaude, S. Le Dévédec, Y.Y. Waldman, G.Y. Stein, B. van de Water, C. Frezza, E. Ruppini, Phenotype-based cell-specific metabolic modeling reveals metabolic liabilities of cancer. *eLife*, **2014**, *3*, e03641.
- [26] T. Matsuo, S. Hirota, Artificial enzymes with protein scaffolds: Structural design and modification. *Bioorg. Med. Chem.*, **2014**, *22*, 5638-5656.
- [27] M. Raynal, P. Ballester, A. Vidal-Ferran, P.W.N.M. van Leeuwen, Supramolecular catalysis. Part 2: Artificial enzyme mimics. *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, *43*, 1734-1787.
- [28] F. Schwizer, Y. Okamoto, T. Heinisch, Y. Gu, M.M. Pellizzoni, V. Lebrun, R. Reuter, V. Kohler, J.C. Lewis, T.R. Ward, Artificial Metalloenzymes: Reaction Scope and Optimization Strategies. *Chem. Rev.*, **2018**, *118*, 142-231.
- [29] a) Y. Lin, J. Ren, X. Qu, Catalytically active nanomaterials: A promising candidate for artificial enzymes. *Acc. Chem. Res.*, **2014**, *47*, 1097-1105; b) H. Wei, E. Wang, Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): Next-generation artificial enzymes. *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 6060-6093.
- [30] S.A. Lynch, J.P. Gallivan, A flow cytometry-based screen for synthetic riboswitches. *Nucleic Acids Res.*, **2009**, *37*, 184-192.
- [31] Mathew, D.; Thomas, B.; Devaky, K.S. Biomimetic recognition and peptidase activities of transition state analogue imprinted chymotrypsin mimics. *React. Funct. Polym.* **2018**, *124*, 121-128.
- [32] a) Z. Dong, Q. Luo, J. Liu, Artificial enzymes based on supramolecular scaffolds. *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 7890-7908; b) J.T. MacDonald, P.S. Freemont, Computational protein design with backbone plasticity. *Biochem. Soc. Trans.*, **2016**, *44*, 1523-1529; c) J. Suh, Artificial Peptidases and Nucleases Using Macromolecular Catalytic System. *Acc. Chem. Res.*, **2003**, *36*, 562-570; d) J. Suh, Synthesis of polymeric enzyme-like catalysts. *Synlett*, **2001**, *9*, 1343-1363; e) J. Suh, S.S. Hah, Organic artificial proteinase with active site comprising three salicylate residues. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 10088-10093; f) S. Oh, W. Chang, J. Suh, An aspartic protease analogue: Intermolecular catalysis of peptide hydrolysis by carboxyl groups. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, *11*, 1469-1472; g) J. Suh, S. Oh, Remarkable proteolytic activity of imidazoles attached to cross-linked polystyrene. *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 7534-7540; h) Y.-M. Wong, Y. Hoshino, K. Sudesh, Y. Miura, K. Numata, Optimization of Poly(N-isopropylacrylamide) as an Artificial Amidase. *Biomacromolecules*, **2015**, *16*, 411-421; i) L. Zhu, N.M. Kostic, Toward artificial metallopeptidases: mechanisms by which platinum(II) and palladium(II) complexes promote selective, fast hydrolysis of unactivated amide bonds in peptides. *Inorg. Chem.*, **1992**, *31*, 3994-4001.
- [33] a) O. Zozulia, M.A. Dolan, I.V. Korendovych, Catalytic peptide assemblies. *Chem. Soc. Rev.*, **2018**, *47*, 3621-3639; b) N. Singh, M. Tena-Solsona, J.F. Miravet, B. Escuder, Towards Supramolecular Catalysis with Small Self-Assembled Peptides. *Isr. J. Chem.*, **2015**, *55*, 711-723; c) K.L. Duncan, R.V. Ulijn, Short Peptides in Minimalistic Biocatalyst Design. *Biocatalysis*, **2015**, *1*, 67-81; d) D.B. Rasale, A.K. Das, Chemical Reactions Directed Peptide Self-Assembly. *Int. J. Mol. Sci.*, **2015**, *16*, 10797-10820; e) D.J. Mikolajczak, J.L. Heier, B. Schade, B. Koksche, Catalytic Activity of Peptide-Nanoparticle Conjugates Regulated by a Conformational Change. *Biomacromolecules*, **2017**, *18*, 3557-3562.
- [34] a) A. Krueger, D. Lang, Functionality is Key: Recent Progress in the Surface Modification of Nanodiamond. *Adv. Funct. Mater.*, **2012**, *22*, 890-906; b) Y. Liang, M. Ozawa, A. Krueger, A General Procedure to Functionalize Agglomerating

Nanoparticles Demonstrated on Nanodiamond. *ACS Nano*, **2009**, 3, 2288-2296; c) A. Krueger The structure and reactivity of nanoscale diamond. *J. Mater. Chem.*, **2008**, 18, 1485-1492; d) T. Meinhardt, D. Lang, H. Dill, A. Krueger, Pushing the Functionality of Diamond Nanoparticles to New Horizons: Orthogonally Functionalized Nanodiamond Using Click Chemistry. *Adv. Funct. Mater.*, **2011**, 21, 494–500.

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO – BADAWCZYCH

Zarówno przed doktoratem, jak i po uzyskaniu stopnia doktora, brałam udział w wielokierunkowych pracach dotyczących 1,3,5-triazyn. Badania opisane w pracach A1, A4, A6-A9 oraz C12, C15 i C20-C22 dotyczą otrzymywania oraz badania użyteczności *N*-lipidowanych aminokwasów/peptydów immobilizowanych na celulozie, co pozwoliło na stwierdzenie, które elementy *N*-lipidowanych peptydów odpowiedzialne są za oddziaływanie z ligandami, a tym samym postawienie hipotezy badawczej zawartej w pracy doktorskiej, że *N*-lipidowane peptydy osadzone na powierzchni celulozy tworzą w wyniku samoorganizacji struktury sztucznych receptorów.

Pochodne 1,3,5-triazyny zostały również wykorzystane jako rdzenie w syntezie pochodnych zawierających ugrupowanie 2-chloroetyloaminowe warunkujące aktywność przeciwnowotworową. Wyniki tych badań są przedmiotem publikacji A14 oraz A21.

Podjęcie prac nad syntezą peptydów, *N*-lipidowanych peptydów immobilizowanych na celulozie nie byłoby możliwe bez badań nad opracowaniem nowej generacji, stabilnych odczynników kondensujących. W pracach tych brałam aktywny udział, zaś ich wyniki badań są przedmiotem publikacji (prace A2, A5, A11, A12, A13, A16), patentów i zgłoszeń patentowych (B1-B6, B9, B10) oraz prac C6-C11, C19. W ramach tych prac badawczych, oprócz opracowania metod otrzymywania stabilnych soli *N*-triazynyloamoniowych, przeprowadzone zostały testy ich aplikacyjności pozwalające na stwierdzenie, że umożliwiają one efektywną syntezę amidów, peptydów, depsi-peptydów oraz estrów zarówno w roztworze jak i na fazie stałej.

Doświadczenie z szeroko zakrojonych badań nad zakresem użyteczności triazynowych odczynników kondensujących pozwoliło mi na podjęcie badań nad funkcjonalizowaniem powierzchni różnorodnych ciał stałych, poczynawszy od typowych nośników polimerowych stosowanych w syntezach organicznych (żywice polimerowe) poprzez wielkocząsteczkowe polimery naturalne (celuloza, alginiany, chitozan), aż po tlenek krzemu oraz inne nieorganiczne materiały stałe. Wyniki tych badań są przedmiotem prac A3, B7, B11 oraz C20. Powodzenie tych badań możliwe było dzięki wykorzystaniu modułowej budowy triazynowych odczynników kondensujących (zróżnicowanie strukturalne anionu i fragmentu amoniowego), co pozwoliło na zastosowanie najbardziej optymalnego odczynnika kondensującego dla danego celu syntetycznego. Możliwe jest bowiem modulowanie zarówno reaktywności triazynowych odczynników kondensujących, jak i ich polarności/lipofilowości, rozpuszczalności w rozpuszczalnikach organicznych czy roztworach wodnych w zależności od warunków reakcji.

Wysoka efektywność triazynowych odczynników kondensujących umożliwiła rozpoczęcie prac nad badaniem właściwości peptydów ulegających agregacji i tworzących włókna typu amyloidowego, których właściwości zostały wykorzystane w poszukiwaniu materiałów peptydowych użytecznych w medycynie regeneracyjnej (prace A18 i A20), jak również w badaniach nad racjonalnym

projektowaniem inhibitorów procesu agregacji, co wymaga poznania struktur i właściwości minimalnych fragmentów warunkujących proces agregacji (prace A15, C14 i C18).

Opracowany przeze mnie rozszczepialny łącznik typu B, będący immobilizowaną na powierzchni celulozy pochodną izocyjanurową aminokwasów, został wykorzystany w badaniach nad poszukiwaniem fragmentów białek bakteryjnych, które w wyniku błędnego rozpoznawania przez przeciwciała mogą prowadzić do rozwoju chorób o podłożu autoimmunologicznym. Wyniki tych badań są przedmiotem prac: A10, A17, A22, C13 oraz C15÷C17. Opracowana metoda z powodzeniem została wykorzystywana w poszukiwaniu biologicznie aktywnych białek macierzy pozakomórkowej i ich aplikacji w medycynie regeneracyjnej. Badania te prowadzone są w ramach projektu badawczego UMO-2015/19/B/ST8/02594 pt. „Innowacyjne materiały hybrydowe do regeneracji tkanek wywodzące się wyłącznie ze związków naturalnych”, w którym jestem głównym wykonawcą.

Ponadto jestem współautorem pracy przeglądowej dotyczącej otrzymywania biobutanolu (A19), brałam udział w badaniach nad transformacjami chemicznymi kwasu mlekowego (B8) oraz jestem współautorem pięciu rozdziałów w książkach o zasięgu krajowym (C1÷C5).

5.1. Wykaz innych (nie wchodzących w skład tematyki habilitacyjnej) opublikowanych prac naukowych

A) Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR)

Przed uzyskaniem stopnia doktora:

- A1.** Synthesis of Library of Lipopeptides and Lipoamides of Amino Acids Immobilized on the Cellulose Membrane.
Kamiński, Z.J.; **Kolesińska, J.**; Kolesińska, B., *Acta Pol. Pharm.*, **61**, 48-51, (2004). IF₂₀₁₃ = 0.693.
- A2.** *N*-Triazinylammonium tetrafluoroborates. A New Generation of Efficient Coupling Reagents Useful for Peptide Synthesis.
Kamiński, Z.J.; Kolesińska, B.; **Kolesińska, J.**; Sabatino, G.; Chelli, M.; Rovero, P.; Błaszczuk, M.; Głowska, M. L.; Papini, A. M. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**(48), 16912-16920 (2005). IF₂₀₁₃ = 11.444.
- A3.** Synthesis and Microtribological Studies of New Silica-Triazine Hybrids.
Kamiński, Z.J.; Mizerski, M.; **Kolesińska, J.**; Psarski, M.; Kuberski, M.; Płaza, S. *Tribology Lett.*, **22**(1) 119-125 (2006). IF₂₀₁₃ = 2.151.
- A4.** Preliminary approach towards construction of peptide libraries as potential tools for diagnosis of malignant thyroid tumors.
Balcerzak, W.; Bednarz, W.; Domosławski, P.; Olewiński, R.; **Kolesińska, J.**; Kamiński, Z.J.; Dziarkowska, K.; Wieczorek, P. *Endokrynologia Polska (Polish J. Endocrin.)*, **57**(4), 308-313 (2006). IF₂₀₁₃ = 1.208.
- A5.** Sulfonates of *N*-triazinylammonium salts as highly efficient, inexpensive and environmentally friendly coupling reagents for peptide synthesis in solution.
Kolesińska, B.; **Frączyk, J.**; Papini, A.M.; Kamiński, Z.J. *Chemistry Today (Chimica Oggi)* **25**(1), 26-29 (2007). IF₂₀₁₃ = 0.405.
- A6.** Rate of binding of host molecules to artificial receptors formed by self-organisation of lipidated oligopeptides.

Majchrzak, J.; **Fraczyk, J.**; Kamiński, Z.J. *Acta Poloniae Pharm.* **65**(6), 703-708 (2008). IF₂₀₁₃ = 0.693.

- A7.** Designing, synthesis and application of a library of supramolecular structures formed by *N*-lipidated peptides immobilized on cellulose. Artificial receptors.
Fraczyk, J.; Kamiński, Z.J. *J. Comb. Chem.* **10**(6), 934-940 (2008). IF₂₀₁₂ = 4.933.
- A8.** The application of a library of artificial receptors formed by the self-organization of *N*-lipidated peptides immobilized on cellulose in studying the effects of the incorporation of a fluorine atom.
Fraczyk, J.; Malawska, B.; Kamiński, Z. *J. Comb. Chem.*, **11**, 446-451 (2009). IF₂₀₁₂ = 4.933.
- A9.** The application of a library of artificial receptors formed by the self-organization of *N*-lipidated peptides immobilized on cellulose for preliminary studies of binding of *N*-phenylpiperazines.
Fraczyk, J.; Kolesinska, B.; Czarnecka, A.; Malawska, B.; Wieckowska, A.; Bajda, M.; Kamiński, Z.J. *QSAR & Comb. Sci.* **28**, 728-736 (2009). IF₂₀₀₉ = 3.027.

Po uzyskaniu stopnia doktora:

- A10.** Bacterial Urease and its Role in Long-Lasting Human Diseases.
Konieczna, I.; Zarnowiec, P.; Kwinkowski, M.; Kolesinska, B.; **Fraczyk, J.**; Kamiński, Z.J. *Kaca, W. Curr. Prot. Peptide Sci.* **13**(8) 789-806, 2012. IF₂₀₁₂ = 2.326
- A11.** Enantioselective Solid Phase Peptide Synthesis Using Traceless Chiral Coupling Reagents and Racemic Amino Acids.
Kolesinska, B.; Kasperowicz-Frankowska, K.; **Fraczyk, J.**; Kamiński, Z. *J. Helv. Chim. Acta*, **95**, 2084-2098 (2012). IF₂₀₁₂ = 1.383.
- A12.** *P*-Triazinylphosphonium chlorides as a new group of coupling reagents.
Kolesinska, B.; Mrozek, A.; **Fraczyk, J.**; Kamiński, Z.J. *Cent. Eur. J. Chem.* **11**(4), 569-583 (2013). IF₂₀₁₃ = 1.329
- A13.** The Effect of Counterion and Tertiary Amine on the Efficiency of *N*-Triazinylammonium Sulfonates in Solution and Solid-Phase Peptide Synthesis.
Kolesinska, B.; Rozniakowski, K.K.; **Fraczyk, J.**; Relich, I.; Papini, A.M.; Kamiński, Z. *J. EurJOC*, 401-408 (2015). IF₂₀₁₅ = 3.065.
- A14.** Synthesis of arylamino-1,3,5-triazines functionalized with alkylating 2-chloroethylamine fragment and studies of their cytotoxicity on the breast cancer MCF-7 cell line.
Fraczyk, J.; Kolesinska, B.; Swiontek, M.; Lipinski, W.; Drozdowska D.; Kamiński, Z.J. *Anticancer Agents Med Chem.* **16**(11), 1435 – 1444, (2016). IF₂₀₁₆ = 2.974.
- A15.** The quest for the shortest fragments of A (13–19) and B (12–17) responsible for the aggregation of human insulin.
Swiontek, M.; Rozniakowski, K. **Fraczyk, J.**; Lipinski, W.; Galecki, K.; Wysocki, S.; Dupont, B.G.R.; Kamiński, Z.J.; Kolesinska, B. *Nanomedicine*, **11**(16), 2083–2101 (2016). IF₂₀₁₆ = 4.727.
- A16.** 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium Toluene-4-sulfonate (DMT/NMM/TsO-) Universal Coupling Reagent for Synthesis in Solution.
Fraczyk, J.; Kamiński, Z. J.; Katarzynska, J.; Kolesinska, B. *Helv. Chim. Acta*, **100**, e1700187 (2017). IF₂₀₁₇ = 1.081
- A17.** Novel tool in rheumatoid arthritis diagnosis -The usage of urease flap region peptidomimetics.
Konieczna, I.; Relich, I.; Durajski, M.; Lechowicz, L.; Chrapek, M.; Gaweda, J.; **Fraczyk, J.**; Kamiński, Z.J. *J. Pep. Sci.*, **24**, e3084 (2018). IF₂₀₁₈ = 1.969

- A18.** Search for Fibrous Aggregates Potentially Useful in Regenerative Medicine Formed under Physiological Conditions by Self-Assembling Short Peptides Containing Two Identical Aromatic Amino Acid Residues.
Frączyk, J.; Lipiński, W.; Chaberska, A.; Waśko, J.; Roźniakowski, K.; Kamiński, Z.J.; Boguń, M.; Draczyński, Z.; Menaszek, E.; Stodolak-Zych, E.; Kamińska, M.; Kolesińska B., *Molecules*, **23**, 568 (2018). IF₂₀₁₈ = 3.098.
- A19.** Butanol Synthesis Routes for Biofuel Production: Trends and Perspectives.
Kolesinska, B.; **Frączyk, J.**; Binczarski, M.; Modelska, M.; Berłowska, J.; Dziugan, P.; Antolak, H.; Kaminski, Z.J.; Witonska, I.A.; Kregiel, D. *Materials*, **12**, 350 (2019). IF₂₀₁₈ = 2.467.
- A20.** Study on the Materials Formed by Self-Assembling Hydrophobic, Aromatic Peptides Dedicated to Be Use for Regenerative Medicine.
Chaberska, A.; Frączyk, J.; Wasko, J.; Rosiak, P.; Kaminski, Z.J.; Solecka, A.; Stodolak-Zych, E.; Strzempek, W.; Menaszek, E.; Dudek, M.; Niemiec, W.; Kolesinska, B. *Chem. Biodiversity*, 10.1002/cbdv.201800543 (2019), doi.org/10.1002/cbdv.201800543. IF₂₀₁₉ = 1.617.
- A21.** The cellular effects of novel triazine nitrogen mustards in glioblastoma LBC3, LN-18 and LN-229 cell lines.
Krętowski, R.; Drozdowska, D.; Kolesińska, B.; Kamiński, Z.J.; **Frączyk, J.**; Cechowska-Pasko, M. *Investigational New Drugs*, (2019), doi.org/10.1007/s10637-018-0712-8. IF₂₀₁₇ = 3.502.
- A.22.** Synthesis of Bacterial Urease Flap Region Peptide Equivalents and Detection of Rheumatoid Arthritis Antibodies Using Two Methods.
Konieczna, I.; Kolesińska, B.; Gleńska-Olender, J.; Czerwonka, G.; Relich, I.; **Frączyk, J.**; Kamiński, Z.J.; Kaca, W. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, (2019), doi.org/10.1007/s10989-019-09815-5. IF₂₀₁₉ = 1.132

B) Wynalazki oraz wzory użytkowe i przemysłowe, które uzyskały ochronę i zostały wystawione na międzynarodowych lub krajowych wystawach lub targach

Przed uzyskaniem stopnia doktora:

- B1.** Kamiński Z.J., Kolesińska B., Kinas R., Jastrząbek K., **Kolesińska J.** „Sposób wytwarzania tripodstawionych pochodnych 1,3,5-triazyny”
Zgłoszenie patentowe z dnia 16.06.2003, nr P-360728.
Patent udzielony w dniu 09.05.2011.
- B2.** Kamiński Z.J., Kolesińska B., **Kolesińska J.**, Jastrząbek K. „Sposób wytwarzania tetrafluoroboranów *N*-(2,4,6-triazynylo-1)amoniowych”
Zgłoszenie patentowe z dnia 02.04.2004, nr P-366879.
Patent nr P-197559 udzielony w dniu 20.05.2008.
- B3.** Kamiński Z.J., Kolesińska B., **Kolesińska J.**, Jastrząbek K. „Czwartorzędowe sole *N*-(3,5-dipodstawionych-2,4,6-triazynylo-1)amoniowych kwasów sulfonowych i ich zastosowanie”
Zgłoszenie patentowe z dnia 29.03.2004, nr. P-366673.
Patent udzielony w dniu 25.08.2011.
- B4.** Kamiński Z.J., Kolesińska B., Papini A.M., **Kolesińska J.**, Jastrząbek K. „Sposób wytwarzania soli *N*-(2,4,6-triazynylo-1) amoniowych”
Zgłoszenie patentowe z dnia 10. 05. 2004 nr P-367852.
Patent nr PL-211516 przyznany 31.05.2012.
- B5.** Kamiński Z.J., Kolesińska B., **Kolesińska J.**, Jastrząbek K. „*p*-Toluenosulfonate salt of *N*-Methyl-*N*-(3,5-dimethoxy-2,4,6-triazinyl-1-yl)-morpholine and related compounds for use as condensing reagent in peptide synthesis”

Patent EP-05006473.2-2117 PCT, C07D 251/45 z dnia 18.08.2005

- B6.** Kamiński Z.J., Kolesińska B., **Kolesińska J.**, Jastrzębek K., Papini A.M., Bianchini R., Sabatino G. „Process for the preparation of *N*-triazinylammonium salts” PCT/EP2005/055793 (2005), data zgłoszenia przez firmę Italtelluti S.p.a. z Włoch, 07/11/2005. Patent WO/2007/051496 przyznany 10.05.2007.
- B7.** Kamiński Z.J., Kolesińska B., **Kolesińska J.**, Rovero P., Kaca W., Grabowski S., Konieczna I. „Sposób funkcjonalizowania powierzchni ciał stałych” Zgłoszenie patentowe nr P-380339 z dnia 31. 07. 2006. Patent PL 214990 B1 udzielony 31.10.2013 (ogłoszenie WUP10/13).

Po uzyskaniu stopnia doktora:

- B8.** Kamiński Z.J., Kolesińska B., **Frączyk J.**, Łazicka B., Kasperowicz-Frankowska K., Walczak P., Rygała A., Ołtuszek-Walczak E., Czyżowska A., Otlewska A., Dybka K., Pietraszek P. „Sposób wytwarzania estrów kwasu mlekowego z soli kwasu mlekowego”. Zgłoszenie do UP. RP w dniu 07.11.2014 za nr P. 410091. Patent udzielony w dniu 14.12.2016.
- B9.** Kamiński Z.J., Kolesińska B., **Frączyk J.**, Olejnik J., Zawadzki S., Karska A., Gzik A., Chaberska A. „Sposób otrzymywania (1R,2S,5S)-3-[*N*-(*N*-tert-butylokarbamoylo)-3-metylo-L-walilo]-*N*-(2-cyklobutylo-1-oksamoyloetylo)-6,8-dimetylo-3-azabicyklo[3.1.0]heksan-2-karboksamidu (Boceprevir)” Zgłoszenie do UP RP wniesione w dniu 05.07.2016 za nr P.417850.
- B10.** Kamiński Z. J., Kolesińska B., **Frączyk J.**, Gzik A., Walczak M., Świontek M., Lipiński W., Kościuk J., Chaberska A. „Sposób otrzymywania czwartorzędowych soli *N*-(4,6-dipodstawionych-1,3,5-triazyn-2-ylo)-amoniowych kwasów sulfonowych” Zgłoszenie do UP RP w dniu 21.03.2016 za nr P.416560.
- B11.** **Frączyk J.**, Kolesińska B., Kamiński Z.J., Szymański Ł., Kołaciński Z., Dudek M., Mitura K., Walczak M., Staniszeńska D., Szkudlarek P. „Sposób modyfikowania nanomateriałów węglowych zawierających na powierzchni grupy karboksylowe” Zgłoszenie do UP RP wniesione w dniu 03.11.2016 za nr P.419358.

C) Monografie, publikacje naukowe w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujące się w bazie Journal Citation Reports (JCR):

Wykaz autorskich monografii (przed uzyskaniem stopnia doktora):

- C1.** Kolesińska B., **Frączyk J.**, Kamiński Z.J., „Receptory wdrukowane w polimer” str. 161-198, rozdział w: „Syntetyczne receptory molekularne, Strategie syntezy, Metody badawcze” praca zbiorowa pod redakcją prof. G. Schroedera, Betagraf PUH, Poznań, 2007.

Wykaz autorskich monografii (po uzyskaniu stopnia doktora):

- C2.** Gonciarz W., Konieczna I., Relich I., Kolesińska B., **Frączyk J.**, Kwinkowski M., Kamiński Z.J., Kaca W., „Analysis of Anti-CCRL1 Antibodies in Human Sera Using Quantitative Dot Blot Method” Biotechnology Progress - The Polish students' scientific interests, Cracow 2014, 7-17.
- C3.** Świontek M., Pawlaczyk M., **Frączyk J.**, Kamiński Z.J., Kolesińska B., „Nowe rdzenie amyloidogenne insuliny. Poszukiwanie inhibitorów procesu agregacji insuliny - nowe inhibitory procesu agregacji insuliny” Na pograniczu chemii i biologii, Wydawnictwo Naukowe UAM, 2016, Tom XXXVI, ISBN: 978-83-232-3155-4, rozdział 2, strony 161-171.

- C4.** Walczak M.E., Kamiński Z.J., **Frączyk J.**, Próby wykorzystania macierzy N-lipidowanych peptydów immobilizowanych na celulozie jako modeli receptorów histaminowych – nowa platforma do testowania związków aktywnych farmakologicznie” Na pograniczu chemii i biologii, Wydawnictwo Naukowe UAM, 2016, Tom XXXVI, ISBN: 978-83-232-3155-4, rozdział 3, strony 241-251.
- C5.** Chaberska A., Lipiński W., **Frączyk J.**, Stodolak-Zych E., Menaszek E., Kamiński Z.J., Kolesińska B., „Peptydy jako biokompatybilne i biodegradowalne komponenty rusztowań użytecznych w medycynie regeneracyjnej” Na pograniczu chemii i biologii, Wydawnictwo Naukowe UAM, 2017, Tom XXXVII, ISBN: 978-83-232-3287-2, rozdział 1, strony 63-73.

Prace opublikowane w recenzowanych czasopismach (bez IF) (przed uzyskaniem stopnia doktora):

- C6.** Papini A.M., Kolesińska B., **Kolesińska J.**, Sabatino G., Kamiński Z.J., „Triazine-based Coupling Reagents Useful Tools for SPPS” *Peptides 2004. Proceedings of the 28th European Peptide Symposium*, Ed. Flegl. M., Fridkin M., Gilon C., Slaninowa J., Kenes Int., Praga, 2004, 252-253 (2005).
- C7.** **Kolesińska J.**, Sabatino G., Kolesińska B., Papini A.M., Kamiński Z.J., „Tetrafluoroborates of *N*-triazinylammonium Salts as New, Highly Efficient Coupling Reagents for Peptide Synthesis in Solution” *Peptides 2004. Proceedings of the 28th European Peptide Symposium*, Ed. Flegl. M., Fridkin M., Gilon C., Slaninowa J., Kenes Int., Praga, 2004, 337-338 (2005).
- C8.** Kolesińska B., Sabatino G., **Kolesińska J.**, Chelli M., Rovero P., Kamiński Z.J., Papini A.M., „ACP Solid Phase Synthesis by New Efficient TBCRs” *Peptides 2004. Proceedings of the 28th European Peptide Symposium*, Ed. Flegl. M., Fridkin M., Gilon C., Slaninowa J., Kenes Int., Praga, 2004, 232-233 (2005).
- C9.** Kolesińska B., **Kolesińska J.**, Frymarkiewicz A., Wąsikowska K.K., Piątkowska N., Jastrzębek K.G., Sabatino G., Rizzolo F., Papini A.M., Kamiński Z.J., „Synthesis of Building Blocks for Peptide Synthesis by Using 4-(4,6-dimethoxy-[1,3,5]triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium toluene-4-sulfonate” *Peptides 2006. Proceedings of the 29th European Peptide Symposium*, Ed. Rolka K., Rekowski P., Silberring J., Kenes Int., Gdańsk, 2006, 518-519 (2007).
- C10.** Kamiński Z.J., Kolesińska B., **Kolesińska J.**, Wąsikowska K.K., Piątkowska N., „*N*-Triazinylammonium Salts Immobilized on Solid Support as Coupling Reagents” *Peptides 2006. Proceedings of the 29th European Peptide Symposium*, Ed. Rolka K., Rekowski P., Silberring J., Kenes Int., Gdańsk, 2006, 590-591 (2007).
- C11.** Kolesińska B., **Kolesińska J.**, Frymarkiewicz A., Roźniakowski K.K., Sabatino G., Rizzolo F., Papini A.M., Kamiński Z.J., „Sulfonates of *N*-triazinylammonium Salts as Highly Efficient, Inexpensive and Environmentally Friendly Coupling Reagents for Peptide Synthesis in Solution” *Peptides 2006. Proceedings of the 29th European Peptide Symposium*, Ed. Rolka K., Rekowski P., Silberring J., Kenes Int., Gdańsk, 2006, 604-605 (2007).
- C12.** **Kolesińska J.**, Kolesińska B., Wysocki S., Kamiński Z.J., „Nanostructures Formed from Lipidated Oligopeptides Immobilized on cellulose as Artificial Receptors” *Peptides 2006. Proceedings of the 29th European Peptide Symposium*, Ed. Rolka K., Rekowski P., Silberring J., Kenes Int., Gdańsk, 2006, 774-775 (2007).

Prace opublikowane w recenzowanych czasopismach (bez IF) (po uzyskaniu stopnia doktora):

- C13.** Kolesińska B., **Frączyk J.**, Relich I., Konieczna I., Kwinkowski M., Kaca W., Kamiński Z.J., „Detection of Antibodies Against Synthetic Peptides Mimicking Ureases Fragments in Atherosclerotic Patients Sera” *Peptides 2012. Proceedings of the 32nd European Peptide Symposium*, Ed. Kokotos G., Constantinou-Kokotou V. Matsoukas J., Ateny, 2012, 234-235 (2013).
- C14.** Świontek M., Kolesińska B., **Frączyk J.**, Kamiński Z.J., „Synthesis and Studies on Aggregation of Insulin Fragments under Physiological Conditions” *Peptides 2014. Proceedings of the 33rd*

- European Peptide Symposium*, Ed. Naydenova E., Pajpanova T., Danalev D., Sofia, 2014, 120-121 (2014).
- C15.** **Frączyk J.**, Kamiński Z.J., Kolesińska B., Walczak M., Relich I., „Application of Isocyanuric Derivatives as a New Linker Useful for Synthesis of Molecular Receptors on Cellulose Surface” *Peptides 2014. Proceedings of the 33rd European Peptide Symposium*, Ed. Naydenova E., Pajpanova T., Danalev D., Sofia, 2014, 233-234 (2014).
- C16.** Relich I., Kolesińska B., **Frączyk J.**, Konieczna I., Kwinkowski M., Kaczmarek A., Timler D., Kaca W., Kamiński Z.J., „Attempts to Application of *Helicobacter Pylori* Urease Epitopes Sets as a Useful Tool in the Diagnosis of Rheumatoid Arthritis” *Peptides 2014. Proceedings of the 33rd European Peptide Symposium*, Ed. Naydenova E., Pajpanova T., Danalev D., Sofia, 2014, 238-239 (2014).
- C17.** Kolesińska B., Relich I., **Frączyk J.**, Konieczna I., Kaca W., Kaczmarek A., Timler D., Kamiński Z.J., “Fragments of Human Protein NEDD4L as a New Epitopes for the Diagnosis of Rheumatoid Arthritis” *Peptides 2016, Proceedings of the 34th European Peptide Symposium*, Ed. Beck-Sickinger A.G., Diederichsen U., Leipzig, 2016, 103-104 (2016).
- C18.** Świontek M., Król P., Pawlaczyk M., **Frączyk J.**, Kamiński Z.J., Kolesińska B., „Analogues of Insulin Hot Spots Containing Aib Residues as a Potential Inhibitors of Insulin Aggregation Process” *Peptides 2016, Proceedings of the 34th European Peptide Symposium*, Ed. Beck-Sickinger A.G., Diederichsen U., Leipzig, 2016, 168-169 (2016).
- C19.** Kamiński Z.J., Kasperowicz-Frankowska K., **Frączyk J.**, Kolesińska B., “Design, Synthesis and Application of Predictive Enantioselective Coupling Reagents for Synthesis of Optically Pure Peptides Directly from Racemic *N*-Protected Amino Acids” *Peptides 2016, Proceedings of the 34th European Peptide Symposium*, Ed. Beck-Sickinger A.G., Diederichsen U., Leipzig, 2016, 179-180 (2016).
- C20.** Walczak M., Wojtczak K., Frączyk J., Kaminski Z.J., “An array of molecular receptors as a platform for probing molecular fingerprints of cytostatic compounds” *Peptides 2016, Proceedings of the 34th European Peptide Symposium*, Ed. Beck-Sickinger A.G., Diederichsen U., Leipzig, 2016, 183-184 (2016).
- C21.** Mitura K., Wilczek P., Niemiec-Cyganek A., Morenc M., Dudek M., Sobczyk-Guzenda A., **Frączyk J.**, Kolesińska B., „Detonation Nanodiamond Particles Modified by Non-Steroidal Antiinflammatory drugs *in vitro* Examination” *Engineering of Biomaterials*, **140**, 12-20 (2017).
- C22.** Walczak M.E., **Frączyk J.**, Kamiński Z.J., Kolesińska B., „Functionalized Cellulose as a Matrix for the Synthesis of Library of Molecular Receptors Useful for Screening of Compounds with Anti-Histamine Activity” *Engineering of Biomaterials*, **142**, 2-6 (2017).

Sumaryczny impact factor: 87.982

Frączyk