

AUTOREFERAT

dr Tomasz Goszczyński



Laboratorium Chemii Biomedycznej
Zakład Onkologii Doświadczalnej
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk

Wrocław, 15 stycznia 2019

1. Imię i nazwisko:

Tomasz Goszczyński (ORCID: 0000-0002-9995-3260)

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

13.12.2012 Doktor nauk biologicznych w zakresie biologii
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN.
Tytuł rozprawy doktorskiej: *Koniugaty metotreksatu z poli-(O-2-hydroksyetylo)skrobią. Synteza oraz badanie właściwości chemicznych i biologicznych*. Promotor: Prof. dr hab. inż. Janusz Boratyński, rozprawa doktorska wyróżniona uchwałą Rady Naukowej IITD PAN we Wrocławiu

30.06.2004 Magister chemii
Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego
Tytuł pracy: *Synteza i badanie analogów skonwertowanego cyklolinopeptydu X – CLX*
Promotor: dr Bolesław Picur

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

03.09.2013 – obecnie adiunkt, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN, Laboratorium Chemii Biomedycznej, Zakład Onkologii Doświadczalnej

01.09.2011-02.09.2013 specjalista, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN, Laboratorium Chemii Biomedycznej, Zakład Onkologii Doświadczalnej

4. Opis osiągnięcia wynikającego a 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. nr 65, poz. 595 ze zm.)

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego:

Osiągnięciem w myśl ww. ustawy jest wskazany poniżej jednotematyczny cykl publikacji, dołączony do dokumentacji jako Załącznik nr 6, objęty wspólnym tytułem:

Modyfikacje biocząsteczek klasterami boru

4.2. Lista publikacji wchodzących w skład cyklu habilitacyjnego

H1. Goszczyński, T. M., Fink, K., Kowalski, K., Leśnikowski, Z. J., and Boratyński, J. (2017) Interactions of Boron Clusters and their Derivatives with Serum Albumin, Sci. Rep. 7, 9800.IF₂₀₁₇=4.12

Indywidualny wkład w autorstwo szacuję na 65 %:

autor korespondencyjny, współautor ogólnej koncepcji badań, pomysłodawca całości przeprowadzonych doświadczeń, wiodący udział w planowaniu doświadczeń i analizie wyników, wykonanie pomiarów DLS, CD oraz MALDI MS, wiodący udział w przygotowaniu manuskryptu, polemice z recenzentami oraz przygotowaniu pracy do druku.

- H2.** Kowalski, K., Goszczyński, T., Leśnikowski, Z. J., and Boratyński, J. (2015) Synthesis of lysozyme-metallacarborane conjugates and the effect of boron cluster modification on protein structure and function, *ChemBioChem* 16, 424-431. IF₂₀₁₅=2.85

Indywidualny wkład w autorstwo szacuję na 65 %:

współautor ogólnej koncepcji badań, wiodący udział w planowaniu doświadczeń i analizie wyników, wykonanie większości pomiarów DLS oraz CD udział w przygotowaniu manuskryptu jego edycji, polemika z recenzentami.

- H3.** Goszczyński, T. M., Kowalski, K., Leśnikowski, Z. J., and Boratyński, J. (2015) Solid state, thermal synthesis of site-specific protein-boron cluster conjugates and their physicochemical and biochemical properties, *Biochim. Biophys. Acta* 1850, 411-418. IF₂₀₁₅=5.08

Indywidualny wkład w autorstwo szacuję na 70 %:

autor korespondencyjny, współautor ogólnej koncepcji badań, pomysłodawca całości przeprowadzonych doświadczeń, wiodący udział w planowaniu doświadczeń i analizie wyników, opracowanie i optymalizacja reakcji termicznych w fazie stałej, wykonanie większości pomiarów DLS, CD oraz identyfikacja miejsc modyfikacji techniką MS/MS, przygotowanie manuskryptu jego edycja, polemika z recenzentami, przygotowanie pracy do druku.

- H4.** Fink, K., Kobak, K., Kasztura, M., Boratyński, J., and Goszczyński, T. M. (2018) Synthesis and Biological Activity of Thymosin β 4-Anionic Boron Cluster Conjugates, *Bioconjugate Chem* 29, 3509-3515. IF₂₀₁₇=4.48

Indywidualny wkład w autorstwo szacuję na 60 %:

autor korespondencyjny, współautor ogólnej koncepcji badań, pomysłodawca całości przeprowadzonych doświadczeń, wiodący udział w planowaniu doświadczeń i analizie wyników, udział w przygotowaniu manuskryptu, polemice z recenzentami oraz przygotowaniu pracy do druku.

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

Proponowana rozprawa habilitacyjna stanowi jednotematyczny cykl czterech prac oryginalnych. Przedstawiony cykl publikacji przygotowany został w ramach mojej pracy realizowanej w Laboratorium Chemii Biomedycznej w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu.

Biocząsteczki, ze szczególnym uwzględnieniem białek i peptydów, są kluczowym komponentem środowiska biologicznego zaangażowanym we wszystkie procesy życiowe. Istotnym etapem, decydującym o ich ostatecznej aktywności biologicznej, są modyfikacje posttranslacyjne podczas których bardzo często drobne zmiany strukturalne kształtują przyszłą funkcję biologiczną danej cząsteczki. Z praktycznego punktu widzenia, rozwój chemicznych metod modyfikacji cząsteczek biologicznych daje szansę analizy wpływu modyfikacji na

badany proces biologiczny oraz ingerencję w ten proces. Dodatkowo, ingerencja w procesy patologiczne, ich kontrolowanie za pomocą zmodyfikowanych cząsteczek aktywnych może przekładać się na nowe farmaceutyki i strategie terapeutyczne wielu chorób. W związku z tym, badania prowadzone w kierunku wykorzystania nowych struktur do modyfikacji dających nowe możliwości interakcji ze środowiskiem biologicznym, opracowywanie nowych metod syntetycznych zapewniających wydajność i selektywność modyfikacji w połączeniu z weryfikacją aktywności biologicznej produktów, stanowią ważne wyzwania zarówno w sferze naukowej jak i aplikacyjnej.

Obecnie, dzięki wielu interdyscyplinarnym badaniom łączącym osiągnięcia biologii, biochemii, medycyny i chemii nieorganicznej obserwuje się nowy obszar badawczy, który może zaowocować zupełnie nowymi substancjami bioaktywnymi i terapeutycznymi w niedalekiej przyszłości^{1,2}. Klastery boru jako cząsteczki nieorganiczne wykazują wiele charakterystycznych właściwości, nieobecnych w ich organicznych, węglowych odpowiednikach. Węgiel i bor łączy zjawisko katenacji dzięki któremu oba pierwiastki tworzą liczne grupy różnorodnych strukturalnie związków lecz w przypadku węgla dominują struktury o budowie łańcuchowej i pierścieniowej natomiast w przypadku boru obserwujemy bogatą i zróżnicowaną rodzinę przestrzennych struktur klatkowych. Charakterystyka elektronowa, fizyczna oraz chemiczno-biologiczna związków węgla i boru jest diametralnie różna ale w niektórych aspektach komplementarna względem siebie i w związku z tym synteza cząsteczek hybrydowych, zawierających oba typy struktur – organiczne biocząsteczki i nieorganiczne klastery boru – może prowadzić do otrzymania nowych, niespotykanych wcześniej właściwości i potencjalnych zastosowań w biologii i medycynie^{1,3}.

Badania nad związkami boru zostały zapoczątkowane pionierskimi pracami Alfreda Stocka w 1912 roku ale istotny rozwój chemii boru rozpoczął się pod koniec lat 40-tych XX-wieku, w czasach zimnej wojny a inspirowany był potencjalnym wykorzystaniem borowodorów jako paliw do zastosowań militarnych. Paradoksalnie badania te doprowadziły do odkrycia wysoce stabilnych, przestrzennych struktur w tym dwudziestościennych boranów, karboranów i

¹ Lesnikowski, Z. J., Challenges and Opportunities for the Application of Boron Clusters in Drug Design. *J. Med. Chem.*, 2016, 59 (17), 7738.

² Vinas, C., The uniqueness of boron as a novel challenging element for drugs in pharmacology, medicine and for smart biomaterials. *Future Med. Chem.* 2013, 5 (6), 617.

³ Lesnikowski, Z. J., Recent developments with boron as a platform for novel drug design. *Expert Opin. Drug Discov.* 2016, 11 (6), 569-78.

metalokarboranów^{4,5,6} (Rysunek 1). Podstawową jednostką budulcową klasterów boru jest trójkąt jako bezpośrednia konsekwencja zdolności boru do tworzenia elektronodeficytowych wiązań 3-centrowych, 2-elektronowych. Za strukturę wyjściową całej grupy klasterów boru będących głównym obiektem moich zainteresowań naukowych oraz tematem wiodącym przedmiotowego cyklu habilitacyjnego jest dodekaboran $[B_{12}H_{12}]^{2-}$, dunastowierzchołkowy dianion o symetrii dwudziestościennej składający się jedynie z atomów boru i wodoru. W formie soli sodowej jest doskonale rozpuszczalny w wodzie. Posiada zdolność tworzenia kompleksów inkluzyjnych z cyklodekstrynami na skutek efektów chaotropowych a nie oddziaływań hydrofobowych⁷. Ze względów strukturalnych (duża liczba atomów boru związanych w stosunkowo małej przestrzeni) pochodne anionu dodekaboranowego wykorzystywane są jako źródło boru ^{10}B w eksperymentalnej terapii nowotworów metodą wychwytu neutronów przez bor - BNCT (Boron Neutron Capture Therapy)⁸.

Zastąpienie jednego lub większej liczby wierzchołków BH w strukturze dodekaboranu izoelektronową grupą CH^+ daje początek nowej grupie hydrofobowych związków – *closo*-karboranów. Ze względu na zbliżoną objętość klasterów karboranowych względem rotującej grupy fenylowej, jednym z głównych zastosowań tych związków w biologii i medycynie jest ich wykorzystanie jako hydrofobowych, przestrzennych mimetyków grupy fenylowej przy projektowaniu nowych leków i substancji aktywnych biologicznie, których mechanizm działania uzależniony jest z oddziaływań hydrofobowych^{9,10}. Usunięcie jednego wierzchołka BH ze struktury karboranu skutkuje powstaniem kolejnej, stabilnej grupy związków – *nido*-karboranów, które charakteryzuje wyższa hydrofilowość w stosunku do ich odpowiedników *closo*. Dodatkowo dikarborany w formie *nido* wykazują zdolność kompleksowania jonów metali przejściowych, dając w rezultacie nieorganiczne izoelektronowe analogi metalocenów.

⁴ Pitochelli, A. R.; Hawthorne, M. F., The Isolation of the Icosahedral $[B_{12}H_{12}]^{2-}$ Ion. *J. Am. Chem. Soc.* 1960, 82 (12), 3228.

⁵ Heying, T. L.; Ager, J. W.; Clark, S. L.; et al., A New Series of Organoboranes .1. Carboranes from Reaction of Decaborane with Acetylenic Compounds. *Inorg. Chem.* 1963, 2 (6), 1089

⁶ Fein, M. M.; Mayes, N.; Cohen, M. S. et al., Carboranes .2. Preparation of 1- and 1,2-Substituted Carboranes. *Inorg. Chem.* 1963, 2 (6), 1115

⁷ Assaf, K. I.; Ural, M. S.; Pan, F. et al., Water Structure Recovery in Chaotropic Anion Recognition: High-Affinity Binding of Dodecaborate Clusters to gamma-Cyclodextrin. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2015, 54 (23), 6852

⁸ Hatanaka, H.; Nakagawa, Y., Clinical results of long-surviving brain tumor patients who underwent boron neutron capture therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1994, 28 (5), 1061

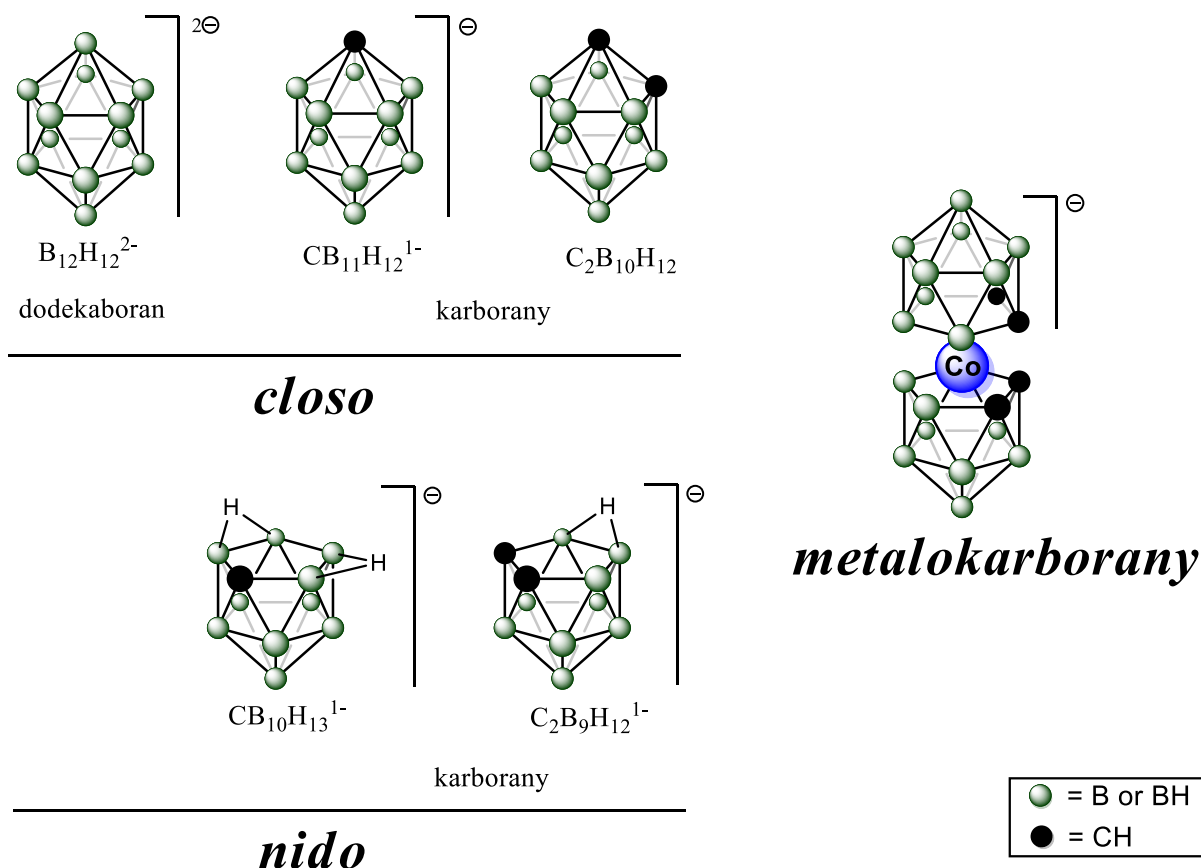
⁹ Julius, R. L.; Farha, O. K.; Chiang, J. et al., Synthesis and evaluation of transthyretin amyloidosis inhibitors containing carborane pharmacophores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2007, 104 (12), 4808.

¹⁰ Nakamura, H.; Yasui, Y.; Maruyama, M. et al., Development of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha inhibitors: effect of ortho-carborane substituents on HIF transcriptional activity under hypoxia. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2013, 23 (3), 806

Odkrycie tego zjawiska¹¹ zaowocowało powstaniem kolejnej grupy związków – metalokarboranów. Tworzyć je mogą różnego typu karborany jako ligandy oraz jony wielu metali. Kompleksowanie jonu Co(III) przez dwie klatki *nido*-karboranu [1,2-C₂B₉H₁₁]²⁻ daje najobszerniej opisany w literaturze naukowej metalokarboran – bis(1,2-dikarba-undekaborano)-commo-3,3'-kobaltan (III) [Co(1,2-C₂B₉H₁₁)₂]⁻ często zapisywany jako COSAN (od CObalt SANDwich). Metalokarborany posiadają częściowo zbliżone właściwości do karboranów, ale wykazują niezwykle potencjał związany z interakcjami z cząsteczkami biologicznym co czyni je interesującym obiektem do badań biologicznych i medycznych. Neutralne karborany charakteryzują się wysoką hydrofobowością lecz anionowe metalokarborany wykazują właściwości wyraźnie amfifilowe¹². Na uwagę zasługuje fakt, że opisywane klatki borowe wykazują aromatyczność (3D-aromatyczność) a ich ładunek ujemny jest zdelokalizowany (w przypadku metalokarboranu COSAN ładunek ujemny jest rozmyty na 45 atomów i wiąże się to ze stosunkowo niewielką średnią gęstością ładunku na powierzchni cząsteczki). Dodatkowo klaster boru posiadają w swej strukturze, nie występujące naturalnie w środowisku biologicznym, jednostki B-H. W związku z tym, w przeciwieństwie do cząsteczek organicznych uczestniczących w procesach życiowych, dla których oddziaływanie wodorowe są kluczowe, klaster boru nie są zdolne do tworzenia klasycznych wiązań wodorowych ale przejawiają zdolność do tworzenia wiązań diwodorowych. Jest to jedna z cech diametralnie odróżniających klaster boru od biologicznych cząsteczek organicznych powodująca, że klatki borowe nie są w stanie, na równych zasadach, konkurować z analogami organicznym o ten sam cel biologiczny.

¹¹ Hawthorne, M. F.; Young, D. C.; Wegner, P. A., Carbametallic Boron Hydride Derivatives .I. Apparent Analogs of Ferrocene and Ferricinium Ion. *J. Am. Chem. Soc.* 1965, 87 (8), 1818

¹² Uchman, M.; Dordovic, V.; Tosner, Z.; Matejcek, P., Classical Amphiphilic Behavior of Nonclassical Amphiphiles: A Comparison of Metallacarborane Self-Assembly with SDS Micellization. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015, 54 (47), 14113-7



Rysunek 1. Struktury wybranych klasterów boru o symetrii dwudziestościennej.

Odkrycie klasterów boru zainicjowało nowy nurt poszukiwań nośników boru dla terapii nowotworów metodą BNCT i równocześnie stworzyło nowe możliwości zastosowań boru w chemii medycznej¹³. Należy podkreślić, iż badania nad nośnikami boru dla BNCT są obecnie tylko jednym z wielu aspektów chemii boru a główny nacisk koncentrowany jest na poszukiwaniach innowacyjnych związków aktywnych biologicznie i potencjalnych leków³. Pośród wielu związków niskocząsteczkowych, zawierających klaster boru, otrzymanych na potrzeby badań biologicznych opisano min. pochodne aminokwasów, lipidów, węglowodanów, porfiryn, zasad nukleinowych, nukleozydów i interkalatorów DNA, jak również biopolimerów takich jak peptydy i białka, oligofosforany czy też krótkie fragmenty kwasów nukleinowych (DNA- i RNA-oligonukleotydy)¹⁴. Dodatkowo, w badaniach biologicznych wykazano, że niewielkie różnice w budowie chemicznej klasterów boru mogą powodować znaczne różnice

¹³ Issa, F.; Kassiou, M.; Rendina, L. M., Boron in drug discovery: carboranes as unique pharmacophores in biologically active compounds. *Chem. Rev.* 2011, 111 (9), 5701

¹⁴ Lesnikowski, Z. J., Challenges and Opportunities for the Application of Boron Clusters in Drug Design. *J. Med. Chem.* 2016, 59 (17), 7738

w ich aktywności biologicznej^{15,16}. Ponadto klaster boru są strukturami abiotycznymi – w organizmach żywych brak jest enzymów mogących metabolizować te struktury. W konsekwencji można spodziewać się, że oporność na działanie związków biologicznie aktywnych zawierających w swojej strukturze klaster boru jako farmakofor lub element modyfikujący może pojawiać się później w trakcie terapii niż dla związków wyłącznie organicznych.

Wybierając jako przedmiot modyfikacji biologicznie aktywne cząsteczki o znanej, dobrze udokumentowanej aktywności biologicznej i mechanizmie działania można będzie śledzić wpływ klastera na aktywność tych cząsteczek oraz ich mechanizm działania co pozwoli na formułowanie ogólnych wniosków dotyczących wpływu wybranej struktury borowej na określone systemy biologiczne. Dodatkowo, cząsteczka biologicznie aktywna o charakterze leku sprzężona z klasterem boru może w wyniku tego połączenia uzyskać nowe, właściwości terapeutyczne. Zmianie może ulec także metabolizm koniugatu, klirens, mechanizm deponowania w tkankach, wnikania do komórek itp. Chemia biologiczna i medyczna klasterów boru rozwinęła się po części w odpowiedzi na zapotrzebowanie terapii BNCT na nowe, bardziej efektywne i skuteczne nośniki boru. Badania w tym obszarze zainicjowały gromadzenie wiedzy na temat toksyczności, farmakokinetyki i innych właściwości wielu typów biocząsteczek modyfikowanych klasterami boru co stymulowało rozwój prac nad innymi niż BNCT zastosowaniami terapeutycznymi tych połączeń. Obecnie najciekawszym nurtem w obszarze chemii medycznej klasterów boru jest wykorzystanie ich w projektowaniu nowych układów bioaktywnych jako narzędzi molekularnych i potencjalnych leków.

Jedną z głównych przyczyn dlaczego klaster bory do tej pory nie znalazły szerokiego zastosowania w biologii do modyfikowania biocząsteczek był brak dogodnych metod ich funkcjonalizacji. Opisanie reakcji nukleofilowego otwierania pierścienia cyklicznych oksoniowych pochodnych klasterów boru stworzyło nowe możliwości otrzymywania wielu funkcjonalizowanych pochodnych w tym pochodnych metalokarboranów^{17,18}. Procedura ta jest

¹⁵ Cigler, P.; Kozisek, M.; Rezacova, et al., From nonpeptide toward noncarbon protease inhibitors: Metallocarboranes as specific and potent inhibitors of HIV protease. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2005, 102 (43), 15394.

¹⁶ Brynda, J.; Mader, P.; Sicha, V. et al., Carborane-based carbonic anhydrase inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2013, 52 (51), 13760

¹⁷ Semioshkin, A. A.; Sivaev, I. B.; Bregadze, V. I., Cyclic oxonium derivatives of polyhedral boron hydrides and their synthetic applications. *Dalton Trans* 2008, (8), 977

¹⁸ Sivaev, I. B.; Semioshkin, A. A.; Brellochs, et al., Synthesis of oxonium derivatives of the dodecahydro-*closo*-dodecaborate anion [B₁₂H₁₂](2-). Tetramethylene oxonium derivative of [B₁₂H₁₂](2-) as a convenient precursor for the synthesis of functional compounds for boron neutron capture therapy. *Polyhedron* 2000, 19 (6), 627

obecnie z powodzeniem stosowana do reakcji z grupami aminowymi, hydroksylowymi oraz tiolowymi wielu drobnocząsteczkowych związków w warunkach bezwodnych^{19,20} ale jest całkowicie nieskuteczna w stosunku do białek/peptydów a warunkach wodnych lub wodno-organicznych. W związku tym faktem zaistniała potrzeba opracowania nowej, oryginalnej procedury syntetycznej.

Pierwsze doniesienia dotyczące reakcji termicznych w fazie stałej z udziałem białek i redukujących cukrów pojawiły się pod koniec lat 40-tych XX wieku²¹. Koncepcja ta została następnie rozwinięta przez Prof. Boratyńskiego²² zarówno pod kątem naukowym jak i aplikacyjnym jako metoda otrzymywania aktywnych biologicznie neoglikokoniugatów^{22,23}.

Nadrzędnym celem badań składających się na niniejszy cykl habilitacyjny było określenie perspektyw wykorzystania klasterów boru o symetrii dwudziestościennej jako nowych, nieorganicznych elementów do modyfikacji cząsteczek aktywnych biologicznie. Prace obejmowały określenie interakcji wybranych typów klasterów ze środowiskiem biologicznym, opracowania metod syntezy koniugatów klasterów boru z białkami/peptydami oraz ostatecznie określenia wpływu modyfikacji klasterem boru biologicznie aktywnego peptydu na jego właściwości i funkcje biologiczne.

Podsumowanie wyników opisanych w publikacjach wchodzących w skład cyklu habilitacyjnego

- 4.3.1. Goszczyński, T. M., Fink, K., Kowalski, K., Leśnikowski, Z. J., and Boratyński, J. (2017) Interactions of Boron Clusters and their Derivatives with Serum Albumin, Sci. Rep. 7, 9800.IF₂₀₁₇=4.12

Dwudziestościenne klasterory boru oraz metalokarborany znane są od blisko 60 lat, opisane zostały ich właściwości fizyczne oraz chemiczne, niektóre z opisywanych klasterów znalazły zastosowanie w różnych obszarach nauki i przemysłu, między innymi w katalizie,

¹⁹ Wojtczak, B. A.; Andrysiak, A.; Gruner, B.; Lesnikowski, Z. J., "Chemical ligation": a versatile method for nucleoside modification with boron clusters. *Chemistry* 2008, 14 (34), 10675

²⁰ Semioshkin, A.; Laskova, J.; Ilinova, et al., Reactions of oxonium derivatives of [B₁₂H₁₂](2-) with sulphur nucleophiles. Synthesis of novel B-12-based mercaptanes, sulfides and nucleosides. *J. Organomet. Chem.* 2011, 696 (2), 539.

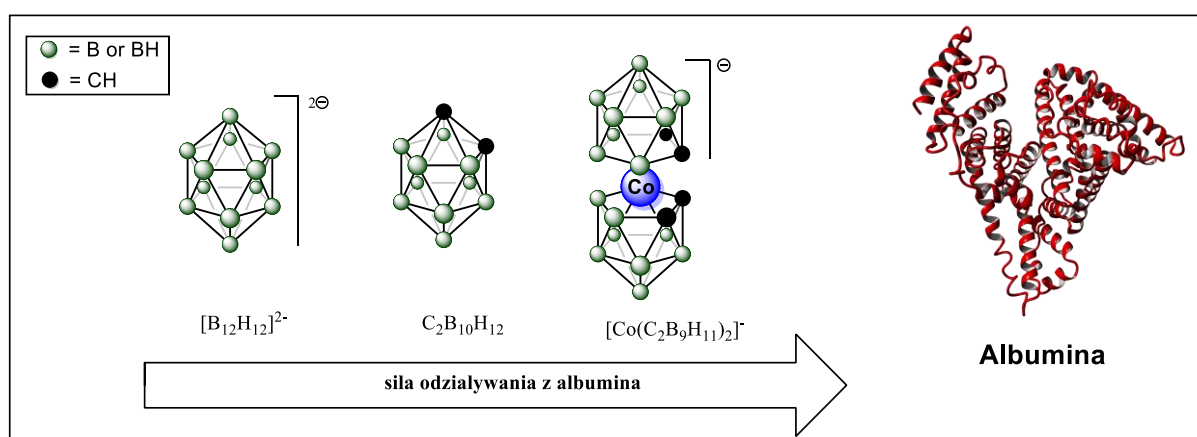
²¹ Lea, C. H.; Hannan, R. S., Studies of the Reaction between Proteins and Reducing Sugars in the Dry State .1. The Effect of Activity of Water, of Ph and of Temperature on the Primary Reaction between Casein and Glucose. *Biochim. Biophys. Acta* 1949, 3 (3), 313

²² Boratynski, J.; Roy, R., High temperature conjugation of proteins with carbohydrates. *Glycoconj. J.* 1998, 15 (2), 131.

²³ Kanska, U.; Boratynski, J., Thermal glycation of proteins by D-glucose and D-fructose. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2002, 50 (1), 61

produkcji materiałów do optyki nieliniowej, chemii ciekłych kryształów, ekstrakcjach śladowych ilości metali (szczególnie przy utylizacji radioaktywnych odpadów z elektrowni jądrowych), syntezy polimerów przewodzących i innych²⁴. Paradoksalnie właściwości biologiczne tej bardzo licznej grupy związków są niezwykle słabo poznane. Fakt ten może zdumiewać zwłaszcza gdy weźmiemy pod uwagę plany wykorzystania niektórych klastrów boru lub cząsteczek hybrydowych zawierających klaster boru w biologii a zwłaszcza w medycynie. Niniejsza praca stanowi próbę częściowego uzupełnienia tej luki o podstawowe informacje dotyczące oddziaływania różnych typów klastrów boru oraz borowych cząsteczek organiczno-nieorganicznych z albuminą podstawowym białkiem transportowym krwi ssaków. Badania zostały wykonane z wykorzystaniem technik fluorescencyjnych, absorpcyjnych (UV-VIS), dichroizmu kołowego, dynamicznego oraz statycznego rozpraszania światła (DLS, SLS) oraz spektrometrii mas (MALDI-TOF-MS).

Opisywane w pracy badania jednoznacznie wskazują, że z pośród testowanych klastrów boru i ich pochodnych największą siłą oddziaływania z albuminą wykazują metalokarborany i rodzaj związanego jonu metalu nie ma istotnego znaczenia na siłę oddziaływania. Powinowactwo względem albuminy maleje zgodnie z szeregiem: metalokarborany $[M(C_2B_9H_{11})_2]^-$ > karborany ($C_2B_{10}H_{12}$) >> dodekaboran $[B_{12}H_{12}]^{2-}$ (Rysunek 2). Dodatkowo wykazaliśmy, że metalokarborany przy niskich stężeniach (do stosunku molowego 1:1 względem albuminy) oddziałują specyficjnie z kieszenią hydrofobową białka a następnie przy wzrastającym stężeniu klastru mogą oddziaływać niespecyficjnie z powierzchnią albuminy.



Rysunek 2. Oddziaływanie wybranych klastrów boru z albuminą. Kolejność według wzrastającej siły oddziaływania.

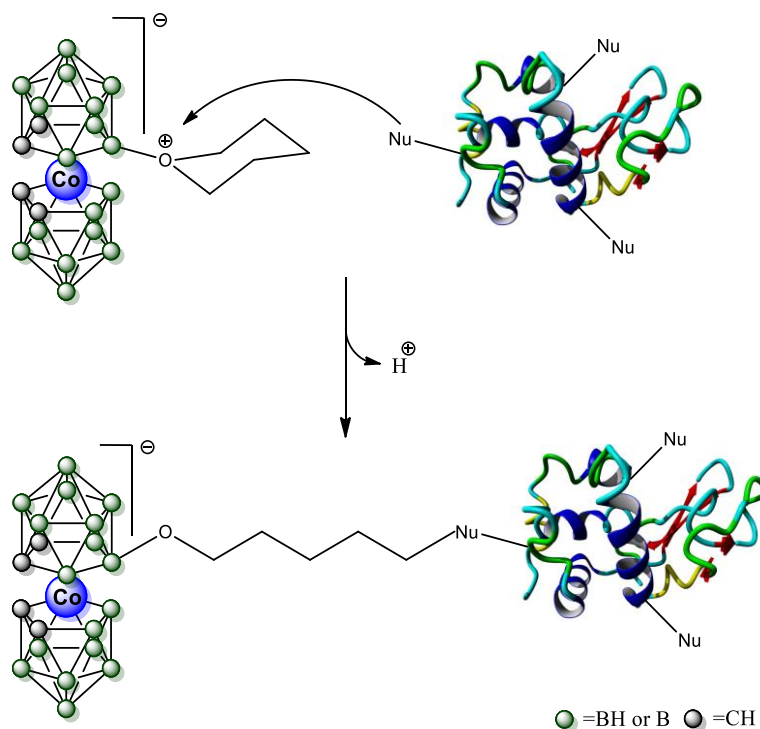
²⁴ Nunez, R.; Tarres, M.; Ferrer-Ugalde, A.; Electrochemistry and Photoluminescence of Icosahedral Carboranes, Boranes, Metallacarboranes, and Their Derivatives. *Chem. Rev.* 2016, 116 (23), 14307.

W pracy oprócz niemodyfikowanych klastrów boru analizowane były także klasterzy zawierające kowalencyjnie przyłączone drobne fragmenty organiczne oraz koniugaty klastrów z adenozyzną. Analiza wyników oddziaływania tych związków z albuminą pokazuje że przyłączony kowalencyjnie organiczny fragment do klastra boru nie wpływa znacząco na siłę oddziaływania klatki borowej z białkiem i ten fakt prowadzi do najistotniejszego wniosku omawianej pracy: klasterzy boru a szczególnie metalokarborany mogą pełnić funkcję kotwicy zapewniającej cząsteczkom bioaktywnym wiązanie z albuminą dając obiecujące możliwości wpływania na parametry farmakodynamiczne oraz farmakokinetyczne projektowanych struktur.

- 4.3.2. Kowalski, K., Goszczyński, T., Lesnikowski, Z. J., and Boratynski, J. (2015) Synthesis of lysozyme-metallacarborane conjugates and the effect of boron cluster modification on protein structure and function, *ChemBioChem* 16, 424-431. IF₂₀₁₅=2.85

Celem niniejszej pracy było określenie perspektyw wykorzystania pochodnych oksoniowych metalokarboranów do modyfikacji białek w środowisku wodnym lub wodno-organicznym. Jako białko modelowe zaproponowany został lizozym jaja kurzego, reakcję optymalizowano zarówno w roztworach jak i w fazie stałej (po usunięciu rozpuszczalnika) natomiast jako donory metalokarboranów posłużyły ich pochodne oksoniowe z cyklicznymi eterami (tetrahydropiraniem oraz 1,4-dioksanem).

W pracy wykazano, że w zaproponowanych warunkach możliwe jest kowalencyjne przyłączenie cząsteczki metalokarboranu do białka modelowego według schematu:



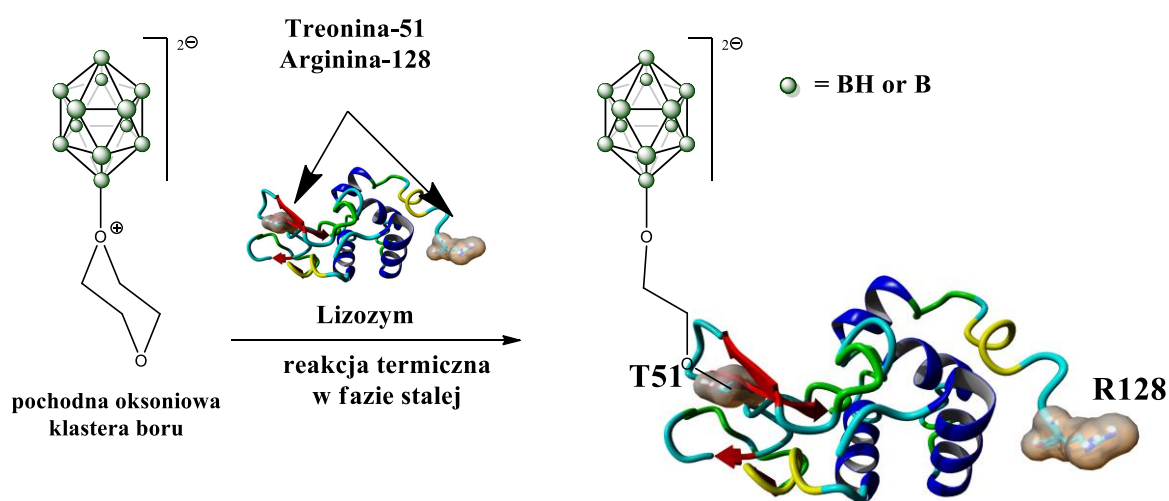
Rysunek 3. Schemat reakcji między centrami nukleofilowymi białka a pochodną oksoniową metalokarboranu.

Było to pierwsze doniesienie (równoległe z pracą H3, omówioną w pkt. 4.3.3 poniżej) dotyczące wykorzystania pochodnych oksoniowych klastrow boru do reakcji z białkami w środowisku wodnym. Dodatkowo w ramach opisywanych badań zostały wyizolowane koniugaty metalokarboran-lizozym i zbadano ich właściwości. Analizowano wpływ modyfikacji lizozymu klastrem boru na strukturę przestrzenną białka (spektroskopia CD, DLS, MS) oraz jego aktywność enzymatyczną względem *M. lysodeikticus*. Wykazano, że przyłączenie klatki metalokarboranowej do lizozymu nie powoduje istotnych zmian strukturalnych, powoduje natomiast zmiany parametrów hydrodynamicznych białka prowadząc do jego stopniowej oligomeryzacji. Niniejsza praca jest pierwszym doniesieniem opisującym wpływ przyłączenia pojedynczej cząsteczki metalokarboranu do białka na jego strukturę i właściwości biologiczne.

- 4.3.3. Goszczyński, T. M., Kowalski, K., Lesnikowski, Z. J., and Boratynski, J. (2015)
 Solid state, thermal synthesis of site-specific protein-boron cluster conjugates and their physicochemical and biochemical properties, *Biochim. Biophys. Acta* 1850, 411-418. IF₂₀₁₅=5.08

Celem niniejszej pracy było opracowanie termicznej metody modyfikacji białek w fazie stałej jako najbardziej obiecującej i zapewniającej optymalną wydajność. Dodatkowo ważnym elementem pracy była analiza wpływu podstawienia wybranymi klastremi boru na

właściwości fizykochemiczne i biologiczne lizozymu, który ponownie został wybrany jako białko modelowe. W reakcjach wykorzystano pochodne oksoniowe dodekaboranu - $[B_{12}H_{11}O(CH_2CH_2)_2O]^-$ oraz dikarboranu w formie *nido* - $[10-O(CH_2CH_2)_2O-7,8-C_2B_9H_{11}]$. Bardzo istotnym elementem omawianej pracy było scharakteryzowanie reszt aminokwasowych ulegających modyfikacji podczas reakcji termicznej w fazie stałej. Za pomocą wykonanej przez mnie kompleksowej analizie LC-MS/MS wykazano, że w zadanych warunkach modyfikacji ulegają głównie reszty argininy-128 oraz treoniny-51 w sekwencji lizozymu (Rysunek 4). Wynik ten był niezwykle istotny z punktu widzenia uniwersalności metody termicznej w fazie stałej. Wykazano, że reakcje nie przebiegają w sposób całkowicie statystyczny z centrami nukleofilowymi białka lecz mamy do czynienia z szeregiem czynników umożliwiających kontrolowanie przebiegu reakcji pod kątem miejsc modyfikacji. Wykazanie, że reakcja może zachodzić, z wykazującą niezwykle słabe właściwości nukleofilowe, grupą hydroksylową treoniny podczas gdy na powierzchni cząsteczki lizozymu są dostępne o wiele silniejsze grupy nukleofilowe (na przykład grupy ϵ -aminowe lizyny) stworzyło nadzieję na perspektywiczne możliwości dostosowania reakcji termicznej w fazie stałej do ukierunkowanych, celowanych modyfikacji biocząsteczek.



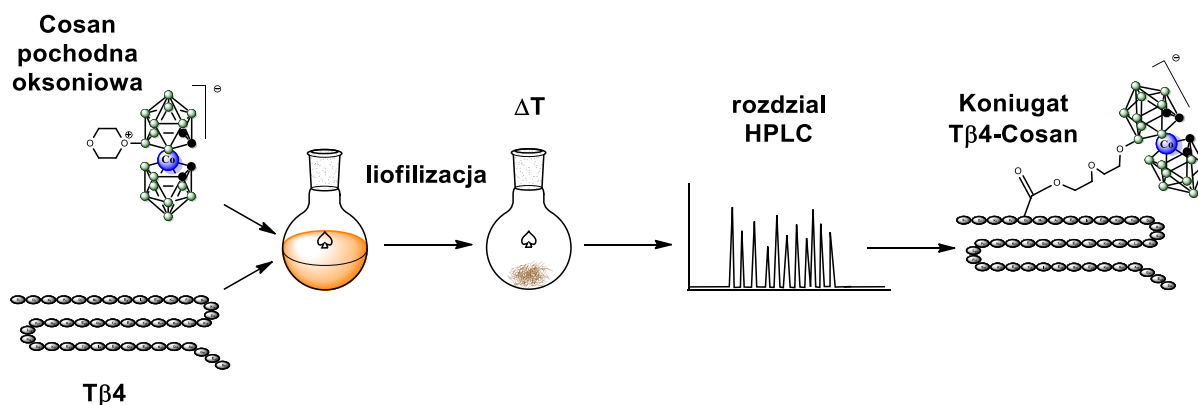
Rysunek 4. Schemat reakcji termicznej w fazie stałej pochodnej oksoniowej dodekaboranu z lizozymem.

W pracy wykazano także, że przyłączenie przedmiotowych klatrów boru, podobnie jak metalokarboranu opisywanego w poprzedniej pracy (pkt. 4.3.2) wywiera zanedbywalny wpływ na strukturę drugo i trzeciorzędową lizozymu oraz powoduje, kontrolowane termicznie, zmiany w parametrach hydrodynamicznych otrzymanych konigatów.

Niniejsza praca jest pierwszym doniesieniem opisującym wykorzystanie termicznej reakcji w fazie stałej do modyfikacji specyficznych reszt aminokwasowych w strukturze białka klasterami boru.

4.3.4. Fink, K., Kobak, K., Kasztura, M., Boratyński, J., and Goszczyński, T. M. (2018) Synthesis and Biological Activity of Thymosin β 4-Anionic Boron Cluster Conjugates, *Bioconjugate Chem* 29, 3509-3515. IF₂₀₁₇=4.48

Powstanie niniejszej publikacji miało bezpośredni związek z wynikami przedstawionymi w poprzednich trzech pracach cyklu habilitacyjnego i stanowi pewnego rodzaju zwieńczenie prac związanych wykorzystaniem klasterów boru do modyfikacji biocząsteczek w celu uzyskania nowej jakości biologicznej. Jako obiekt modyfikacji wybrana została Tymozyna β 4 (T β 4) - peptyd o szerokiej aktywności biologicznej, biorący udział w procesach regeneracji wielu tkanek. T β 4 odgrywa znaczącą rolę w rozwijającym się sercu²⁵, poprawia pracę serca i zmniejszyła obszar blizny poprzez zwiększenie przeżycia kardiomiocytów w eksperymentach *in vivo* z udziałem myszy z indukowanym zawałem serca²⁶. Synteza koniugatów T β 4-matalokarboran zoptymalizowana została tak by modyfikacji ulegały jedynie grupy karboksylowe peptydu.



Rysunek 5. Schemat syntezy koniugatów T β 4-COSAN z wykorzystaniem reakcji termicznej w fazie stałej.

Przyłączenie anionowego metalokarboranu do kwaśnych grup karboksylowych za pomocą wiązania estrowego zapewniło zachowanie sumarycznego ładunku peptydu. Dodatkowo wykazaliśmy uniwersalność termicznej metody modyfikacji w fazie stałej oraz fakt, że precyzyjny dobór środowiska reakcyjnego pozwala na otrzymywanie koniugatów o zadanej

²⁵ Smart, N.; Risebro, C. A.; Melville, et al., Thymosin beta 4 induces adult epicardial progenitor mobilization and neovascularization. *Nature* 2007, 445 (7124), 177

²⁶ Bock-Marquette, I.; Saxena, A.; White, M. D.; et al., Thymosin beta 4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair. *Nature* 2004, 432 (7016), 466

strukturze. Dodatkowo wytworzone wiązania estrowe charakteryzowały się ograniczoną stabilnością, silnie zróżnicowaną w zależności od lokalizacji w łańcuchu peptydowym, co stworzyło dodatkową możliwość kontrolowanej hydrolizy tego wiązania np. w miejscach docelowych, wyniku której odtwarzana zostawała niezmodyfikowana T β 4.

W doświadczeniach biologicznych z wykorzystaniem linii H9C2 (szczurze kardiomiocyty) wykazaliśmy, że wszystkie otrzymane koniugaty przejawiały co najmniej aktywność natywnego peptydu T β 4. Najistotniejsze rezultaty dotyczyły wpływu otrzymanych koniugatów T β 4 z metalokarboranem (COSAN) na kardiomiocyty hodowane w warunkach stresowych ponieważ takie warunki bardzo często towarzyszą różnym stanom patologicznym. Zastosowano, w warunkach hipoksji, warunki niedoboru żelaza indukowane deferoksaminą oraz warunki stresu oksydacyjnego indukowanego nadtlaniem wodoru. W stosunku do natywnej T β 4 zaobserwowano istotny statystycznie, pozytywny wpływ na przeżywalność kardiomiocytów pod wpływem opisywanych koniugatów, szczególnie gdy cząsteczka metalokarboranu przyłączona był w obrębie C-końca peptydu.

W szerszym aspekcie przedmiotowa praca stanowi nasz oryginalny wkład do nowej wiedzy na temat oddziaływań klasterów boru ze środowiskiem biologicznym co ma istotne znaczenie dla projektowania nowego typu związków o potencjale terapeutycznym.

Podsumowując badania opisane w publikacjach stanowiących cykl należy zwrócić uwagę na: 1) opracowanie metod umożliwiających otrzymywanie niedostępnych wcześniej koniugatów klasterów boru i białek/peptydów oraz 2) wykrycie przez nas aktywności biologicznych tego rodzaju pochodnych. Oba osiągnięcia uzasadniają (i umożliwiają) badania molekularnych aspektów aktywności biologicznych nowej klasy koniugatów, ze szczególnym uwzględnieniem roli klasterów boru oraz ich oddziaływań z partnerami biologicznymi.

Cechą wspólną przedłożonych publikacji jest pionierskie, wieloaspektowe podejście do przestrzennych, nieorganicznych struktur jakimi są klaster boru wyznaczając nową, biologiczną platformę ich wykorzystania.

Za najważniejsze osiągnięte rezultaty uważam:

1. Opisanie interakcji wybranych klasterów boru i ich pochodnych z albuminą, podstawowym białkiem transportowym krwi ssaków.
2. Zaproponowanie klasyfikacji klasterów boru pod kątem wzrastającego powinowactwa do albuminy: metalokarborany $[M(C_2B_9H_{11})_2]^-$ > karborany $(C_2B_{10}H_{12}) >>$ dodekaboran $[B_{12}H_{12}]^{2-}$.

3. Zaproponowanie nowej metody syntezy aktywnych biologicznie koniugatów klasterów boru z białkami/peptydami
4. Wykazanie skuteczności biologicznej, modyfikowanej za pomocą metalokarboranu tymozyny β_4 , w stosunku kardiomiocytów.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

5.1. Podsumowanie

Mój dorobek naukowy wraz z jednotematycznym cyklem publikacji obejmuje współautorstwo w 16 artykułach oryginalnych i przeglądowych:

15 pracach opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (jako pierwszy autor – 5 prac, autor korespondencyjny – 5 prac), współautorstwo w 1 pracy spoza bazy JCR, 19 komunikatach zjazdowych oraz 5 referatach wygłoszonych na międzynarodowych i krajowych konferencjach (w tym jeden wykład plenarny), 4 patenty krajowe, 2 krajowe zgłoszenia patentowe oraz 1 międzynarodowe zgłoszenia patentowe.

Sumaryczny współczynnik wpływu (IF, impact factor) wszystkich prac wynosi **42.81**.

Do dnia 15 stycznia 2019 roku, według bazy Web Of Science (WOS, All database), prace były cytowane **60** razy, indeks Hirscha wynosi **5**.

Łączny IF czterech prac objętych rozprawą habilitacyjną wynosi **16,54** przy ilości cytowań **21** (15.01.2019)

W ramach działalności naukowej, jestem kierownikiem realizowanego w konsorcjum z Wydziałem Biotechnologii Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego, projektu badawczego SONATA, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki oraz wykonawcą w trzech innych projektach badawczych finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki (zał. 4 pkt. 1.8). Dodatkowo uczestniczę w realizacji projektu TANGO 2 (Wspólne przedsięwzięcie Narodowego Centrum Nauki i Narodowego Centrum Badań i Rozwoju). Brałem także udział w projekcie NeoLek którego źródłem finansowania były środki UE w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka oraz brałem aktywny udział w dwóch projektach naukowych realizowanych przez przedsiębiorstwo Adamed. Łącznie uczestniczyłem lub uczestniczę w realizacji 9 projektów badawczych finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki oraz Narodowe Centrum Badań i Rozwoju.

W ramach działalności dydaktycznej byłem promotorem 3 prac inżynierskich, 5 prac magisterskich oraz promotorem pomocniczym w dwóch przewodach doktorskich (jeden zakończony z wyróżnieniem, drugi w trakcie realizacji). Realizowałem także zadania dotyczące organizacji szkoleń naukowych oraz popularyzacji nauki, szczególnie związanej z

przybliżaniem biologicznych zastosowań klasterów boru zarówno wśród pracowników nauki, studentów jak i młodzieży (zał. 4, pkt. 2.13)

Najważniejsze uzyskane przeze mnie wyniki zostały zawarte w ramach proponowanego cyklu habilitacyjnego, szczegółowo opisanego w punkcie 4.3 niniejszego autoreferatu. Poniżej przedstawione zostały najważniejsze zagadnienia wykraczające poza ten cykl, w tym częściowo niepublikowane.

5.2. Przebieg pracy naukowej przed uzyskaniem stopnia doktora

W latach 1999-2004 studiowałem na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, specjalność Chemia Środowiska. W 2002 roku rozpocząłem pracę badawczą w Zakładzie Chemii i Stereochemii Peptydów i Białek pod kierunkiem dra Bolesława Picura (Kierownik Prof. dr hab. Zbigniew Szewczuk), której tematem była chemiczna synteza analogów cyklolinopeptydów. Następnie temat ten stał się tematem mojej pracy magisterskiej zatytułowanej „Synteza i badanie analogów skonwertowanego cyklolinopeptydu X – CLX” a wyniki uzyskane podczas jej realizacji stały się przedmiotem komunikatów zjazdowych^{27,28}. Podczas realizacji tych badań, współpracowałem z zespołem Prof. dr hab. Michała Zimeckiego kierownika Zakładu Terapii Doświadczalnej w Instytucie Hirszfelda, gdzie badane były związki przeze mnie zsyntezowane pod kątem aktywności immunosupresyjnej.

W tym okresie sprecyzowaniu uległy moje zainteresowania naukowe i przyszły profil badawczy, czyli synteza i modyfikacje makrocząsteczek w celu poszukiwania nowych aktywności biologicznych.

W 2008 roku rozpocząłem pracę w Instytucie Hirszfelda w Laboratorium Chemii Biomedycznej pod kierunkiem Prof. dr hab. inż. Janusza Boratyńskiego a głównym tematem badań były koniugaty leków przeciwnowotworowych z makrocząsteczkami. Realizowałem badania dotyczące wykorzystania fibrynogenu i jego pochodnych jako nośnika metotreksatu (leku przeciwnowotworowego z grupy antyfolianów) w ramach grantu „Perspektywy zastosowań nowych pochodnych metotreksatu” (N302 098434, 2007-2012). Wyniki tych badań zostały opublikowane w czasopiśmie *BBA General Subjects*²⁹(załącznik 4. Pkt. 1.1.14). Równolegle testowałem możliwości zastosowania pochodnych skrobi (hydroksyetyloskrobi o

²⁷ Picur, B.; Ruchala, P.; Lisowski, M.; Cebrat, M.; Pasternak, A.; Pacamaj, R. Z.; Stefanowicz, P.; Goszczyński, T.; Tarnawski, L., Cyclic peptides from plants of genus *linum*. *Biopolymers* 2003, 71 (3), 369.

²⁸ Picur, B.; Goszczyński, T.; Tarnawski, L.; et al., synthesis and investigations of new active peptides containing converted sequences of natural cyclolinopeptide x: nmr, cd, and biological studies. *J. Pept. Sci.* 2004, 10, 274

²⁹ Goszczyński, T.; Nevozhay, D.; Wietrzyk, J.; Omar, M. S.; Boratyński, J., The antileukemic activity of modified fibrinogen-methotrexate conjugate. *Biochim. Biophys. Acta* 2013, 1830 (3), 2526

zróżnicowanych masach cząsteczkowych) jako nośników metotreksatu. Wyniki tych badań stały się przedmiotem mojej rozprawy doktorskiej.

W latach 2009-2014 brałem intensywny udział w realizacji projektu inwestycyjnego „Utworzenie Zintegrowanego Laboratorium NeoLek - Doświadczalnej Onkologii i Innowacyjnych Technologii”, POIG.02.01.00-02-073/09 (załącznik 4. Pkt. 1.9.1). Celem projektu było utworzenie certyfikowanego laboratorium badawczego NeoLek na bazie dwóch laboratoriów działających w Instytucie Hirszfelda: Laboratorium Chemii Biomedycznej oraz Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej. W ten sposób powstało interdyscyplinarne laboratorium, w którym prowadzone są kompleksowe badania potencjalnych preparatów przeciwnowotworowych, a także opracowywane są nowe preparaty i technologie wykorzystujące wybiórcze, makrocząsteczkowe nośniki substancji terapeutycznych. W ramach tego projektu uczestniczyłem w przebudowie i wyposażaniu Laboratorium Chemii Biomedycznej w sprzęt zapewniający nowoczesne możliwości badawcze zarówno związków niskocząsteczkowych (synteza i analiza drobnocząsteczkowych substancji aktywnych biologicznie) jak i makrocząstek biologicznych w tym koniugatów tych substancji. Do najistotniejszych technik zaliczam spektrometrię mas, dichroizm kołowy oraz metody chromatograficzne, techniki których podstawy teoretyczne i umiejętności praktyczne zdobyłem już na etapie wykonywania projektu magisterskiego na Uniwersytecie Wrocławskim a w ramach opisywanego przedsięwzięcia mogłem doskonalić i rozwijać ich wykorzystanie do moich wiodących zainteresowań naukowych.

Podczas realizacji wyżej wymienionego projektu uczestniczyłem w szeregu warsztatach oraz szkoleniach naukowych co zaowocowało biegłą praktyczną umiejętnością wykorzystywania także innych technik badawczych, którymi dysponowało stworzone laboratorium NeoLek (Załącznik 4, pkt. 2.10)

5.3. Przebieg pracy naukowej po uzyskaniu stopnia doktora

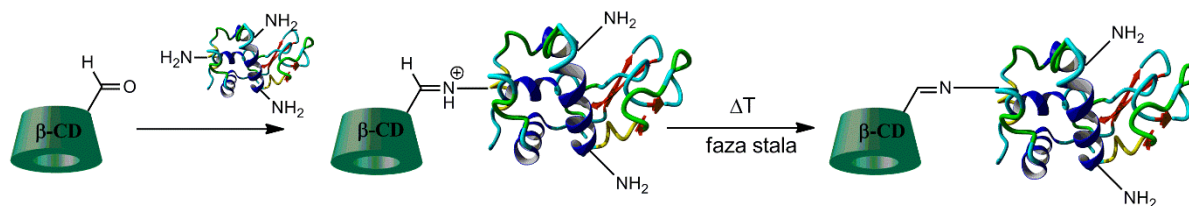
Po obronie pracy doktorskiej w 2012 roku kontynuowałem pracę w Instytucie Hirszfelda we Wrocławiu na stanowisku specjalisty, a od 2013 roku adiunkta. W tym czasie rozwijałem i rozwijam nadal swoje zainteresowania naukowe dotyczące modyfikacji chemicznych makrocząstek w stworzonych nowoczesnych warunkach zarówno lokalowych jak i sprzętowych laboratorium NeoLek. 4 marca 2016 r. zwieńczeniu uległy prace związane z utworzeniem Laboratorium i Biuro do Spraw Substancji Chemicznych podjęło decyzję o przyznaniu Certyfikatu Dobrej Praktyki Laboratoryjnej w zakresie badań *in vitro* cytotoksyczności podstawowej oraz analiz chemicznych.

Realizowane przeze mnie badania, przez cały czas skoncentrowane były wokół zagadnień dotyczących modyfikacji chemicznych makrocząsteczek jako drogi do poszukiwania nowych aktywności biologicznych. Tematy badawcze realizowane były we współpracy z pracownikami Instytutu Hirszfelda oraz innych ośrodków naukowych krajowych i zagranicznych. Mój wkład w realizację poszczególnych tematów badawczych, które zaowocowały opublikowaniem wyników lub ich prezentacją na konferencjach naukowych, został szczegółowo opisany w Załączniku 4, a niektóre z tych tematów były przedmiotem prac inżynierskich i magisterskich, w przypadku których pełniłem funkcję promotora (Zał. 4, pkt. 2.4) oraz promotora pomocniczego w przypadku przewodów doktorskich (zał. 4, pkt. 2.5). Obszar tych badań można podzielić na następujące zagadnienia:

5.3.1. Opracowanie metod syntezy koniugatów cyklodekstryna-białko

W ramach współpracy Instytutu Hirszfelda z Instytutem Chemii, Ochrony Środowiska i Biotechnologii Uniwersytetu Humanistyczno-Przyrodniczego im. Jana Długosza w Częstochowie, odbyłem staż badawczy w ramach którego zajmowałem się opracowywaniem nowych metod syntezy koniugatów cyklodekstryn z białkami. Cyklodekstryny (CD) są cyklicznymi oligosacharydami, zbudowanymi z jednostek glukopiranozowych połączonych wiązaniami α -1,4-glikozydowymi. Przyjmują strukturę ściętego stożka, w którym grupy hydroksylowe są skierowane na zewnątrz, w wyniku czego wewnątrz cyklodekstryn jest hydrofobowe, natomiast powierzchnia zewnętrzna pozostaje hydrofilowa. Fakt ten powoduje, że cyklodekstryny mają zdolność tworzenia kompleksów inkluzyjnych ze związkami hydrofobowymi. Właściwości te stwarzają możliwości wykorzystania tych związków w wielu dziedzinach chemii, szczególnie w chemii białek, gdzie mogą pełnić rolę specyficznego farmakofora oraz mogą stanowić elementy molekularnych systemów dostarczania leków, transportując aktywne biologicznie związki do komórek docelowych³⁰. W ramach prowadzonych badań opracowano oryginalną, wysokotemperaturową metodę syntezy koniugatów białko-cyklodekstryna w fazie stałej oraz testowano właściwości chemiczne i biologiczne otrzymanych koniugatów. Główną reakcją prowadzącą w efekcie do otrzymania kowalencyjnych koniugatów jest reakcja zachodząca między wolnymi grupami aminowymi obecnymi w strukturze białka a grupą aldehydową pochodnej CD, przebiegająca według schematu:

³⁰ Loftsson, T.; Jarho, P.; Masson, M.; Jarvinen, T., Cyclodextrins in drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2005, 2 (2), 335



Zsyntezowane koniugaty Lizozym-CD zostały oczyszczone za pomocą chromatografii oddziaływań hydrofobowych oraz scharakteryzowane za pomocą spektrometrii mas, techniki dynamicznego rozpraszania światła oraz spektrometrii dichroizmu kołowego. Wyznaczono aktywność biologiczną koniugatów względem natywnego lizozymu oraz wykazano zdolność tworzenia kompleksów inkluzyjnych przez koniugaty za pomocą spektrofotometrii UV-VIS wykorzystując modelowy związek – fiolet krystaliczny. Wykazano, że opisywana metoda syntezy jest wydajna, nie wpływa w znaczący sposób na strukturę białka modelowego, które zachowało aktywność biologiczną a kowalencyjnie przyłączona β -cyklodekstryna zachowała zdolność tworzenia kompleksów inkluzyjnych.

Realizowane przeze mnie badania, otworzyły nowe możliwości syntezy związków bioaktywnych zawierających, jako element składowy, cyklodekstryny oraz stały się kolejnym przykładem uniwersalności termicznych metod syntezy w fazie stałej jako drogi do poszukiwania nowych aktywnych biologicznie związków.

5.3.2. Opracowanie metod chemicznych modyfikacji białek terapeutycznych

W ramach współpracy Instytutu Hirszfelda z firmą Adamed brałem udział w realizacji dwóch projektów badawczych (zał 4. Pkt 2.2.1 i 2.2.2): “Biokoniugaty przeciwnowotworowe nowej generacji” (INNOMED/I/8/NCBR/2014) oraz 3 CLA - biotechnologiczny, kierowany lek przeciwnowotworowy (POIG.01.04.00-00-002/08), których beneficjentem była firma Adamed. W obszarze tego współdziałania zajmowałem się modyfikacją drobnocząsteczkowych substancji aktywnych pod kątem ich koniugacji z docelowymi białkami, optymalizacją reakcji z grupami aminowymi oraz tiolowymi białek, selektywnym utlenianiem białek oraz badaniami analitycznymi i strukturalnymi otrzymanych koniugatów wykorzystując techniki spektrometrii mas oraz dynamicznego rozpraszania światła.

5.3.3. Opracowanie formulacji oraz metod analitycznych nowych związków o właściwościach przeciwnowotworowych.

W ramach współpracy z Prof. Waldemarem Priebe z MD Anderson Cancer Center, University of Texas zajmowałem się opracowywaniem formulacji związków o selektywnych właściwościach przeciwnowotworowych oraz opracowaniem nowych metod ilościowej analizy

tych związków w złożonych matrycach biologicznych. Uzyskane wyniki zostały wykorzystane do złożenia dwóch aplikacji grantowych w programach Strateged.

5.3.4. Wykorzystanie klastrów boru do modyfikacji biocząsteczek

W realizowanym przeze mnie obszarze, dotyczącym modyfikacji cząsteczek w poszukiwaniu nowych aktywności biologicznych, z udziałem Prof. Janusza Boratyńskiego oraz Prof. Zbigniewa Leśnikowskiego, zrodził się pomysł wykorzystania klastrów boru i ich niecodziennych właściwości fizykochemicznych, do modyfikacji białek/peptydów. Wcześniejsze doświadczenia Pracowni Wirusologii Molekularnej i Chemii Biologicznej Instytutu Biologii Medycznej PAN w zakresie chemii klastrów boru a następnie prace zainicjowane w Laboratorium Chemii Biomedycznej Instytutu Hirszfelda i realizowane bezpośrednio przeze mnie, przerodziły się w wieloletnią współpracę w tej dziedzinie. W ramach tego współdziałania, którego efekty oraz perspektywy zostały szerzej opisane w pkt 4.3 powstały dwa patenty krajowe, jedno zgłoszenie patentowe, trzy opublikowane prace oraz liczne komunikaty zjazdowe.

5.3.5. Klaster boru i ich pochodne jako inhibitory kinazy CK2

W związku z sukcesem wykorzystania pochodnych oksoniowych klastrów boru do syntezy nowych organiczno-nieorganicznych cząsteczek oraz z rozwojem nowych zastosowań reakcji termicznych w fazie stałej, został wykreowany olbrzymi, niezagospodarowany obszar badawczy. Prowadzone równoległe badania właściwości biologicznych klastrów boru oraz wykorzystanie już poznanych ich cech do syntezy nowych struktur aktywnych jest nie tylko ciekawe z naukowego punktu widzenia ale także stwarza obszerne pole zastosowań praktycznych. Klaster boru, ze względu na swój abiotyczny charakter stanowi innowacyjny komponent w projektowaniu związków aktywnych biologicznie. Można przyjąć, że ze względu na swoje właściwości strukturalne i elektronowe ich oddziaływanie z biocząsteczkami takimi jak białka (enzymatyczne, receptorowe, inne) mogą odbywać się na nieco innych zasadach niż przyjęte dla ligandów całkowicie organicznych. Nieoczekiwane odkrycie właściwości inhibitorowych matalokarboranu $[\text{Co}(\text{C}_2\text{B}_9\text{H}_{11})_2]^-$ w stosunku do kinazy białkowej CK2 dało początek współpracy Instytutu Hirszfelda z Katolickim Uniwersytetem Lubelskim Jana Pawła II (Wydział Biotechnologii i Nauk o Środowisku) w zakresie syntezy nowych borowych inhibitorów kinazy CK2, która jest zaliczana do obiecujących celów terapeutycznych w onkologii ze względu na silną nadekspresję tego enzymu w wielu typach nowotworów³¹. Z

³¹ Martins, L. R.; Lucio, P.; Melao, et al., Activity of the clinical-stage CK2-specific inhibitor CX-4945 against chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2014, 28 (1), 179

uwagi na fakt, że zastosowanie klasterów boru stwarza potencjalne możliwości syntezy zupełnie nowych, nieorganicznych lub hybrydowych inhibitorów CK2 temat jest jednym z podstawowych zadań w kierowanym przeze mnie projekcie Sonata realizowanym w konsorcjum z Katolickim Uniwersytetem Lubelskim.

5.4. Plany naukowo-badawcze na przyszłość.

Uzyskane i opublikowane do tej pory wyniki jednoznacznie wskazują na duży potencjał związany z modyfikacjami biocząsteczek za pomocą klasterów boru. Moim zamiarem jest dynamiczne rozwijanie tej tematyki zarówno w celach poznawczych jak i utylitarnych. Rozwinięcie omawianych zagadnień badawczych wymaga szerokiej współpracy z grupami naukowymi zarówno w macierzystym Instytucie, jak i poza nim. Poza obecnymi partnerami zamierzam dalej rozwijać interdyscyplinarne współpracy mając na uwadze następujące zagadnienia oczekujące na realizację:

- 5.4.1. Wykorzystanie silnego powinowactwa metalokarboranów do albuminy surowicy w połączeniu ze skutecznością termicznej metody modyfikacji białek/peptydów w fazie stałej w kierunku syntezy terapeutycznych koniugatów o przedłużonym czasie półtrwania we krwi i wzmocnionej aktywności biologicznej.
- 5.4.2. Wykorzystanie abiotycznego charakteru klasterów boru przy projektowaniu substancji o właściwościach przeciwnowotworowych w tym inhibitorów specyficznych enzymów
- 5.4.3. Wykorzystanie abiotycznego charakteru klasterów boru przy projektowaniu struktur o właściwościach przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych – ponieważ w organizmach żywych brak jest enzymów mogących metabolizować klatki borowe można spodziewać się, że oporność na działanie związków biologicznie aktywnych zawierających w swojej strukturze klaster boru może pojawiać się później w trakcie terapii niż dla związków wyłącznie organicznych.

15.01.2019 Tomasz Goszczyński