



PODPIS ZAUFANY

Karolina

KOPROWSKA

03.02.2026 17:52:26 GMT+1

Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym



**SZKOŁA DOKTORSKA
BioMedChem**

Uniwersytetu Łódzkiego
i Instytutów Polskiej
Akademii Nauk w Łodzi



mgr Karolina Koprowska

**Nowe metody znakowania związków
o znaczeniu biologicznym
znanymi fluorescencyjnymi
i metalokarbonyłowymi**

New methods for labelling biologically relevant
compounds with fluorescent and
metallocarbonyl tags

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem

Promotor

dr hab. Bogny Rudolf, prof. UŁ

Wydział Chemii, Uniwersytet Łódzki

Promotor pomocniczej

dr hab. Anny Wrona-Piotrowicz, prof. UŁ

Wydział Chemii, Uniwersytet Łódzki

Łódź, 2026

Pragnę serdecznie podziękować

*Pani Promotor **dr hab. Bognie Rudolf, prof. UŁ** za życzliwość, wsparcie, motywację oraz ofiarowaną szansę i możliwość realizacji rozprawy doktorskiej.*

Serdecznie dziękuję za opiekę naukową, wszystkie wskazówki i rady, które były dla mnie niezwykle cenne w trakcie tworzenia tej pracy.

*Szczególne podziękowania kieruję do Pani Promotor Pomocniczej **dr hab. Anny Wrona-Piotrowicz, prof. UŁ** za nieocenione wsparcie oraz opiekę naukową, nie tylko w trakcie realizacji rozprawy doktorskiej, ale podczas całej mojej ścieżki naukowej.*

Dziękuję za wiarę, zaufanie, cierpliwość i wszelką pomoc, na którą zawsze mogłam liczyć.

*Pragnę serdecznie podziękować **dr Anecie Kosińskiej-Zaid, dr Michałowi Piotrowiczowi** oraz **mgr Julii Kurasik** za ogrom wsparcia, życzliwości, każdą dyskusję naukową oraz stworzenie niepowtarzalnej, przyjaznej atmosfery.*

*Chciałabym również podziękować zewnętrznym Jednostkom za współpracę w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej. Serdeczne podziękowania kieruję do **prof. Michèle Salmain, dr Nathalie Fischer-Durand, prof. Rémiego Métivier** oraz **dr Clémence Allain** za opiekę naukową podczas staży badawczych oraz możliwość ich odbycia.*

*Zespołowi **dr hab. Anny Makal, prof. UW** za wykonanie badań rentgenostrukturalnych oraz Zespołowi **dr hab. Sylwii Michlewskiej** za przeprowadzenie badań biologicznych oraz analizę konfokalną.*

*A przede wszystkim dziękuję moim **Rodzicom, Rodzinie** oraz **Przyjaciółom** za motywację, wiarę i wsparcie, które były dla mnie nieocenione w trudnych chwilach.*

Wykaz skrótów:

Ac- acetyl

ACQ - ang. *aggregation-caused quenching*, wygaszanie emisji wywołane agregacją

AIE, ang. *aggregation-induced-emission*, emisja indukowana agregacją

AZT - 3'-azydo-3'-deoksytymidyna

BCN - bicyklo[6.1.0]non

BM - 2-bromomaleimid

Boc - *tert*-butyloksykarbonyl

CMIA - ang. *Carbonyl Metallo Immuno Assays*, testy immunologiczno-metalokarbonylowe

CORMs - ang. *Carbon Monoxide Releasing Molecules*, cząsteczki uwalniające tlenek węgla

Cp - cyclopentadienyl

CT - ang. *Computed Tomography*, tomografia komputerowa

CuAAC - ang. *Copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition*, cykloaddycja azydków i alkinów katalizowana miedzią(I)

Cys - cysteina

DBCO - *aza*-dibenzocyklooktyn

DBM - 2,3-dibromomaleimid

DCC - *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimid

DCM - dichlorometan

DCU - *N,N'*-dicykloheksylomocznika

DDSs - ang. *drug delivery systems*, systemy dostarczania leków

DIAD - azodikarboksylan diizopropylowy

DIBO - 4-dibenzenocyklooktynol

DMAP - 4-dimetyloaminopirydyna

DMF - *N,N*-dimetyloformamid

DMSO - dimetylosulfotlenek

DNA - kwas deoksyrybonukleinowy

EGFR - ang. *Epidermal Growth Factor Receptor*, receptor nabłonkowego czynnika wzrostu

ESR - ang. *Electron Spin Resonance Spectroscopy*, spektroskopia elektronowego rezonansu spinowego

FpDBM - CpFe(CO)₂(η¹-2,3-dibromomaleimidato)

FpM - CpFe(CO)₂(η¹-2-bromomaleimidato)

GalNAc - *N*-acetylogalaktozamina

GSH - glutation

Hcys - homocysteina

HeLa - linia komórkowa wywodząca się z komórek raka szyjki macicy, nazwa od pierwszych liter imienia i nazwiska dawcy Henrietty Lacks

HL-60 - linia komórkowej ludzkiej białaczki promielocytowej

HPLC - ang. *High-performance liquid chromatography*, wysokosprawna chromatografia cieczowa

HRMS - ang. *High-resolution mass spectrometry*, spektrometria mas wysokiej rozdzielczości

iEDDA - ang. *inverse electron demand Diels–Alder reaction*, reakcja Dielsa–Aldera z odwróconym zapotrzebowaniem elektronowym

Ins - insulina

IR - ang. *Infrared*, promieniowanie podczerwone

Liz - lizozym

MCF-7 - akronim od ang. Michigan Cancer Foundation-7, dotyczy linii komórkowej raka piersi

MCPBA - meta-chloronadbenzoesowy

MDA-MB-231 - ang. *MD Anderson - Metastatic Breast – 231*, linia komórek ludzkiego raka piersi wyizolowana w MD Anderson Cancer Center

Me - metyl

MRI - ang. *Magnetic Resonance Imaging*, obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego

ODIBO - okso-dibenzocyclooktyn

OFETs - ang. *Organic field-effect transistors*, organiczne tranzystory polowe

OLEDs - ang. *Organic light-emitting diodes*, energooszczędne organiczne diody emitujące światło

OPVs - ang. *Organic photovoltaics*, organiczne ogniwa fotowoltaiczne

PET - ang. *Positron Emission Tomography*, pozytonowa tomografia emisyjna

Py - piren-1-yl

RNA - kwas rybonukleinowy

RNR - reduktaza rybonukleotydowa

SPAAC - ang. *strain promoted azide-alkyne cycloaddition*, cykloaddycja azydek-alkin promowana naprężeniem

TCEP - chlorowodorek tris(2-karboksyetylo)fosfiny

TFAA - bezwodnik kwasu trifluorooctowego

THF - tetrahydrofuran

TLC - ang. *Thin Layer Chromatography*, cienkowarstwowa chromatografia cieczowa

Spis treści

Streszczenie	7
Abstract	8
1. Cel pracy	9
CZEŚĆ LITERATUROWA	11
2. Wybrane metody znakowania biocząsteczek	11
2.1. Biokoniugacja	13
2.2 Reakcje bioortogonalne	18
3. Bioobrazowanie	24
4. Wybrane znaczniki cząsteczek biologicznie aktywnych	28
4.1. Pochodne maleimidu	28
4.2. Kompleksy metaloorganiczne oraz chemia biometaloorganiczna	36
4.2.1. Żelazowe kompleksy metalokarbonylowe	44
4.3. Pochodne pirenu	50
4.3.1. Zjawisko fluorescencji - informacje ogólne	52
4.3.2. Właściwości fluorescencyjne i zastosowanie pochodnych pirenu	56
CZEŚĆ BADAWCZA	65
5. Omówienie wyników	65
5.1. Synteza <i>N</i> -niepodstawionych oraz metalokarbonylowych pochodnych maleimidu i sukcyimidu	65
5.2. Zastosowanie <i>N</i> -niepodstawionych bromomaleimidów oraz ich metalokarbonylowych pochodnych w reakcjach modyfikacji biomolekuł	88
5.3. Badania aktywności biologicznej bromomaleimidów oraz ich metalokarbonylowych pochodnych	95
5.4. Synteza nowych pochodnych pirenu zawierających fragment cyklooktynu	101
5.5. Badania fotofizyczne - właściwości absorpcyjne oraz emisyjne zsyntezowanych znaczników fluorescencyjnych	117
5.6. Zastosowanie pochodnej Py-ester-BCN w reakcjach z cząsteczkami biologicznie aktywnymi	127
5.7. Badania fotofizyczne koniugatów uzyskanych w reakcjach Py-ester-BCN z cząsteczkami o znaczeniu biologicznym	134
5.10. Synteza nowych pochodnych maleimidu zawierających fragment pirenowy	142
PODSUMOWANIE	153
CZEŚĆ EKSPERYMENTALNA	156
6. Część eksperymentalna	156
6.1. Stosowane metody analityczne	156
6.2. Synteza <i>N</i> -niepodstawionych oraz metalokarbonylowych pochodnych maleimidu i sukcyimidu	158

6.2.1.	Synteza FpI.....	158
6.2.2.	Synteza BM.....	158
6.2.3.	Synteza Fp-BM.....	159
6.2.4.	Synteza Fp-DBM.....	159
6.2.5.	Synteza TM-Cys.....	160
6.2.6.	Synteza DTM-Cys.....	160
6.2.7.	Synteza Fp-TM-Cys.....	161
6.2.8.	Synteza Fp-DTS-Cys.....	162
6.2.9.	Synteza Fp-DTM-Cys.....	163
6.2.10.	Synteza DTM-Gluc.....	164
6.2.11.	Synteza Fp-DTM-Gluc.....	164
6.3.	Synteza nowych pochodnych pirenu zawierających fragment cyklooktynu.....	165
6.3.1.	Synteza Py-ester-BCN.....	165
6.3.2.	Synteza 1-hydroksypirenu.....	166
6.3.3.	Synteza Py-eter-BCN.....	166
6.3.4.	Synteza tioamidu <i>N</i> -etoksykarbonylowego.....	167
6.3.5.	Synteza Py- <i>S</i> -BCN.....	168
6.3.6.	Synteza amidu <i>N</i> -etoksykarbonylowego.....	169
6.3.7.	Synteza Py- <i>N</i> -BCN.....	169
6.4.	Reakcje pochodnej Py-ester-BCN z cząsteczkami biologicznie aktywnymi.....	170
6.4.1.	Synteza Py-ester-di <i>N</i> -Boc-Cys-tetrazyna.....	170
6.4.2.	Synteza Py-ester- <i>N</i> -Boc-Cys.....	171
6.4.3.	Synteza Py-ester-AZT.....	172
6.5.	Synteza nowych pochodnych maleimidu zawierających fragment pirenowy.....	173
6.5.1.	Synteza chlorku pireno-1-sulfonowego.....	173
6.5.2.	Synteza Mal-Py.....	173
6.5.3.	Synteza 1-merkaptopirenu.....	174
6.5.4.	Synteza Mal- <i>S</i> -Py.....	174
6.5.5.	Synteza MalBr- <i>S</i> -Py.....	175
6.5.6.	Synteza Mal- <i>S</i> -diPy.....	176
	BIBLIOGRAFIA:.....	177
	DOROBEK NAUKOWY:.....	187

Streszczenie

Wraz ze wzrostem rozwoju i szybkim tempem życia wzrasta zachorowalność na choroby cywilizacyjne, w tym na choroby nowotworowe. Przekłada się to na poszukiwanie nowych rozwiązań w leczeniu jak i monitorowaniu procesów zachodzących w żywych organizmach. Wiąże się to z poszukiwaniem szybkich, tanich i nieinwazyjnych metod diagnostycznych. W ramach doktoratu przeprowadzone zostały badania nad nowymi znacznikami, które w przyszłości mogą znaleźć zastosowanie zarówno w znakowaniu biomolekuł i leków jak również w diagnostyce medycznej oraz bioobrazowaniu.

W pierwszej kolejności zbadano znaczniki metalokarbonylowe, łatwe do detekcji w spektroskopii IR. Związki te zawierały w cząsteczce fragmenty (di)bromomaleimidu, które łatwo reagują z biomolekułami, w których strukturze występują grupy -SH. W pracy zastosowano jedną z metod modyfikacji protein, gdzie w mostek dwusiarczkowy wbudowana została pochodna maleimidu (rebridging). Otrzymane w ten sposób metalokarbonylowe pochodne ditiomaleimidu, pod wpływem naświetlania światłem widzialnym, tracą fragment metalokarbonylowy i przekształcają się w *N*-niepodstawione pochodne ditiomaleimidu, które wykazują fluorescencję. Z badań biologicznych wynika, że pochodne metalokarbonylowe, wykazują aktywność cytotoksyczną w stosunku do komórek nowotworowych, natomiast ich analogi, nie zawierające fragmentu metalokarbonylowego, nie były toksyczne. Badania z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego, sugerują, że metalokarbonylowe pochodne łatwiej przedostają się do wnętrza komórki niż ich organiczne odpowiedniki.

Opracowane metody syntetyczne pozwoliły również na otrzymanie znaczników fluorescencyjnych zawierających fluorofor pirenowy oraz aktywny w reakcjach typu „click” układ cyklooktynowy. Ze względu na ciekawe właściwości fotofizyczne w roztworach, jak i w ciele stałym, związki te mogą zostać zastosowane jako znaczniki fluorescencyjne. Obecność fragmentu cyklooktynowego w cząsteczce sprawia, że związki te ulegają reakcjom bioortogonalnym, co zostało wykorzystane do bezpośredniej modyfikacji biocząsteczek, a otrzymane koniugaty wykazywały silną fluorescencję. Ponadto, z przeprowadzonych badań biologicznych wynika, że związki te, nie są toksyczne zarówno dla komórek prawidłowych, jak i nowotworowych, mogą zatem stanowić bezpieczną alternatywę dla znaczników izotopowych.

Została podjęta również próba modyfikacji układu maleimidowego za pomocą pirenu i jego tiopochodnej. Otrzymane pochodne (di)tiomaleimidu z pirenem nie wykazywały właściwości luminescencyjnych.

Abstract

As modern life becomes increasingly fast-paced, the number of civilization-related diseases, including cancer, continues to rise. This situation drives the search for new solutions to treat diseases, but also to monitor biological processes occurring in living organisms. As a result, scientists are particularly interested in developing diagnostic methods that are fast, affordable, and non-invasive. The main aim of this doctoral research focused on the development of new markers that may find applications both in the labeling of biomolecules and drugs, as well as in medical diagnostics and bioimaging.

The first part of the research focused on the investigation of metal carbonyl markers, which can be easily detected using infrared (IR) spectroscopy. These compounds contain (di)bromomaleimide fragments which readily react with biomolecules possessing thiol groups. One of the protein modification strategies which was applied in this work involves the incorporation of a maleimide derivative into a disulfide bridge – a process known as rebridging. Metal carbonyl dithiomaleimide compounds undergo an interesting transformation during irradiation with visible light - they lose the metal carbonyl part and turn into non-substituted dithiomaleimide derivatives which emit fluorescence. Biological studies showed that the metal carbonyl compounds are toxic to cancer cells, while their organic analogues are not cytotoxic. Confocal microscopy studies suggest that compounds containing the metal carbonyl unit enter/penetrate cells more easily than their purely organic analogues.

The synthetic methods developed in this work also enabled to obtain fluorescent markers containing a pyrene fluorophore and a cyclooctyne group capable of participating in so-called “click” reactions. These compounds show attractive photophysical properties both in solution and in the solid state, making them promising fluorescent probes. Due to the presence of the cyclooctyne fragment, these markers can undergo bioorthogonal reactions - highly selective chemical reactions that take place inside biological systems without disturbing them. This property was successfully used for the direct labeling of biomolecules, producing strongly fluorescent conjugates. Moreover, biological studies indicate that these compounds are non-toxic to both normal and cancer cells, and thus may represent a safe alternative to isotopic labels.

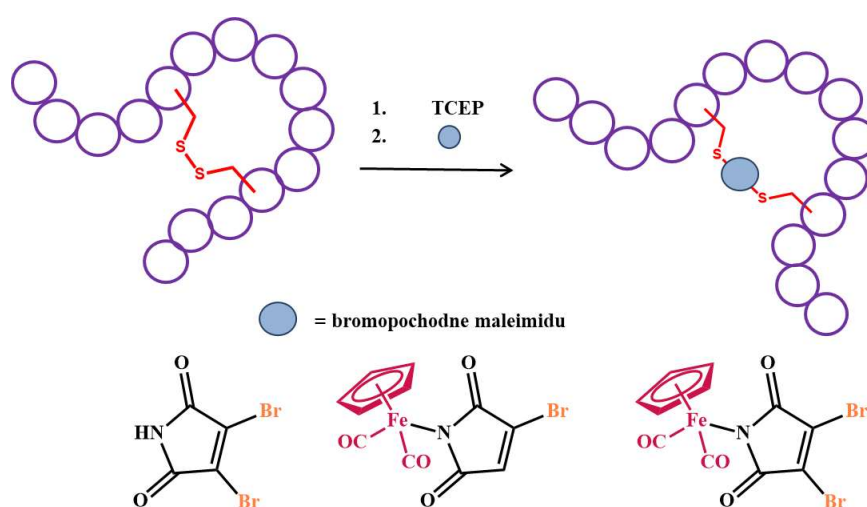
Finally, the study also included modifications of the maleimide ring using pyrene and its sulfur/thiol derivative. However, the resulting pyrene-substituted (di)thiomaleimide derivatives did not exhibit luminescent properties.

1. Cel pracy

Wraz z rozwojem nowych technologii, przemysłu oraz medycyny wzrosło zainteresowanie technikami detekcji oraz wizualizacji, które ułatwiają m.in., badanie żywności oraz wody, kontrolę procesów metabolicznych zachodzących w żywych komórkach czy precyzyjną diagnozę zdrowotną. Ponadto, istotnym jest poszukiwanie skutecznych metod detekcji i monitorowania biocząsteczek, w celu dokładniejszej interpretacji procesów i przemian zachodzących na poziomie komórkowym. Możliwość śledzenia zmian na poziomie molekularnym przekłada się na opracowywanie nowych ścieżek terapii celowanej oraz monitorowania jej skuteczności np. podczas leczenia chorób nowotworowych.

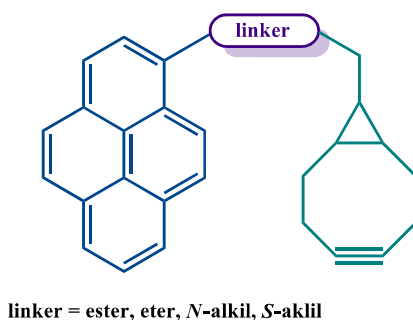
Niniejsza praca doktorska wpisuje się we wspomniany powyżej obszar badań, a jej cel obejmował:

- 1) Modyfikację cząsteczek wykazujących aktywność biologiczną oraz biomolekuł przy pomocy pochodnych bromo- i dibromomaleimidu, a następnie zbadanie ich właściwości fizykochemicznych. Przeprowadzenie modyfikacji miało na celu opracowanie nowych strategii znakowania biocząsteczek przy użyciu bromo- oraz dibromopochodnych maleimidu (*N*-niepodstawionych oraz zawierających fragment metalokarbonylowy) w celu otrzymania biokoniugatów łatwych do detekcji metodami spektroskopowymi. Moje badania oparłam na metodzie „mostkowania” białka (rebridging), która polega na wbudowaniu fragmentu maleimidu bądź sukcyimidu w mostek dwusiarczkowy (Schemat 1).



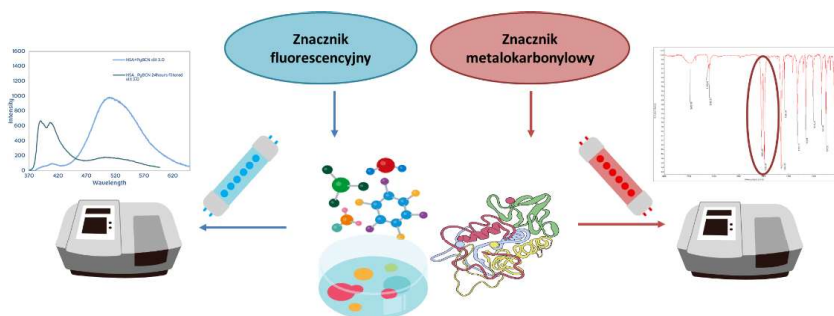
Schemat 1. Poglądowe przedstawienie strategii modyfikacji biomolekuł przy użyciu pochodnych maleimidu

- 2) Próbę zaprojektowania oraz syntezy nowych znaczników fluorescencyjnych, które w swej strukturze zawierają pierścień pirenu (fluorofor odpowiedzialny za właściwości fotofizyczne) połączony łącznikiem (linkerem) z układem cyklooktynowym (Rysunek 1). Obecność wiązania potrójnego w cząsteczce cyklooktynu umożliwia przeprowadzenie reakcji typu „click” wykorzystywanych w chemii bioortogonalnej, których celem jest otrzymanie biokoniugatów. Przyłączenie do cząsteczki o znaczeniu biologicznym znacznika zawierającego fluorofor - w tym przypadku piren, miało prowadzić do otrzymania fluorescencyjnych biokoniugatów łatwych do detekcji metodami spektroskopii emisyjnej.



Rysunek 1. Znaczniki oparte na układzie piren-linker-cyklooktyn

- 3) Syntezę pochodnych maleimidu zawierających pierścień pirenu, które również mogłyby posłużyć do znakowania biocząsteczek na drodze addycji tioli do wiązania podwójnego maleimidu, lub substytucji atomu bromu we fragmencie bromomaleimidu przez grupę tiolową.
- 4) Próbę detekcji otrzymanych biokoniugatów przy pomocy nieinwazyjnych metod spektroskopowych: spektroskopii IR (znaczniki metalokarbonylowe) oraz spektroskopii emisyjnej (znaczniki fluorescencyjne) do detekcji otrzymanych biokoniugatów - Rysunek 2.



Rysunek 2. Poglądowe przedstawienie detekcji zmodyfikowanych biocząsteczek za pomocą metod spektroskopowych

CZEŚĆ LITERATUROWA

2. Wybrane metody znakowania biocząsteczek

Wraz z szybkim tempem życia obserwowany jest ciągły wzrost zachorowań na choroby cywilizacyjne, w tym nowotworowe. Przekłada się to na szybki rozwój medycyny oraz zwiększone zapotrzebowanie na pozyskiwanie nowych bezpiecznych metod terapii, obrazowania postępów leczenia, a także pozyskiwania nowych leków. Wszystko to ma wpływ na duże zainteresowanie wśród naukowców strategią znakowania biomolekuł. Selektywna funkcjonalizacja biocząsteczek, takich jak białka, kwasy nukleinowe, lipidy lub węglowodany, jest przedmiotem stałego zainteresowania ze względu na ich powszechne zastosowanie, od podstawowych badań na poziomie biochemicznym - w celu uzyskania wglądu w procesy biologiczne, po bardziej zaawansowane zastosowania biomedyczne - rozwój diagnostyki czy nowe metody terapii celowanych.¹ W ciągu ostatnich dwóch dekad reakcje typu „click” oraz metody chemii bioortogonalnej, które mogą być wykorzystywane do znakowania biocząsteczek, bez zakłócania ich procesów biologicznych, zrewolucjonizowały dziedzinę inżynierii biomedycznej.

Chemia bioortogonalna łączy chemię syntetyczną z biologią, co przyczynia się do szerokiej aplikacyjności tego typu reakcji. Reakcje bioortogonalne otwierają nowe kierunki badań, a co najistotniejsze zwiększają możliwości modyfikacji biomolekuł zarówno *in vitro* jak i *in vivo*.² Istnieje kilka strategii znakowania biomolekuł. Szeroką stosowalnością cieszą się ligacje chemiczne, które dzieli się na dwie odrębne klasy reakcji - biokoniugacje oraz reakcje bioortogonalne.¹

Biokoniugacja to proces wiązania biocząsteczki z inną biocząsteczką, bądź cząsteczką organiczną w celu utworzenia biokoniugatów. W zależności od stosowanych cząsteczek organicznych (markerów, fluoroforów czy polimerów) modyfikacje te prowadzą do otrzymania różnych koniugatów, np. koniugatu lek-białko, białko-barwnik, białko-polimer. Wyróżniamy dwie strategie biokoniugacji - strategię kowalencyjną (tworzenie stabilnego wiązania kowalencyjnego między dwiema cząsteczkami, z których co najmniej jedna jest biocząsteczką) oraz niekowalencyjną (tworzenie odwracalnych połączeń między dwiema cząsteczkami,

¹ Sabot, C.; Kele, P., *Novel Approaches in Biomolecule Labeling*, *Biomolecules*, **2021**, 11, 1809

² Vianney Delplace, *Rethinking Click and Bioorthogonal Chemistry for Biomedical Applications*, *ACS Materials Lett.*, **2024**, 6, 153–158

z których co najmniej jedna jest biocząsteczką - wiązania wodorowe, siły elektrostatyczne, czy hydrofobowe).³

Pojęcie chemii bioortogonalnej zostało zdefiniowane przez Carolyn Bertozzi, która w 2022 roku otrzymała Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii wraz z Mortenem Meldalem i Barrym Sharplessem za rozwój chemii „click” oraz chemii bioortogonalnej. Najistotniejszą cechą reakcji bioortogonalnych jest fakt, iż zachodzą one szybko i selektywnie oraz nie zakłócają reakcji biologicznych zachodzących w organizmie.⁴

Biokoniugacja polega na bezpośredniej modyfikacji natywnych biocząsteczek, takich jak aminokwasowe łańcuchy białek, które są z natury nukleofilowe (głównie Cys, Lys), natomiast reakcje bioortogonalne, wymagają wcześniejszego wprowadzenia/wbudowania biologicznie obojętnej grupy funkcyjnej do biocząsteczki. Grupa ta może następnie reagować z cząsteczką zawierającą fragment fluoroforowy odpowiedzialny za fluorescencję lub inne ugrupowanie będące łatwe do identyfikacji za pomocą metod bioobrazowania. Ogromną zaletą chemii bioortogonalnej jest możliwość bezpiecznego przeprowadzania reakcji wewnątrz układów żywych, podczas gdy reakcje biokoniugacji są w większości ograniczone do zastosowań *in vitro*.¹

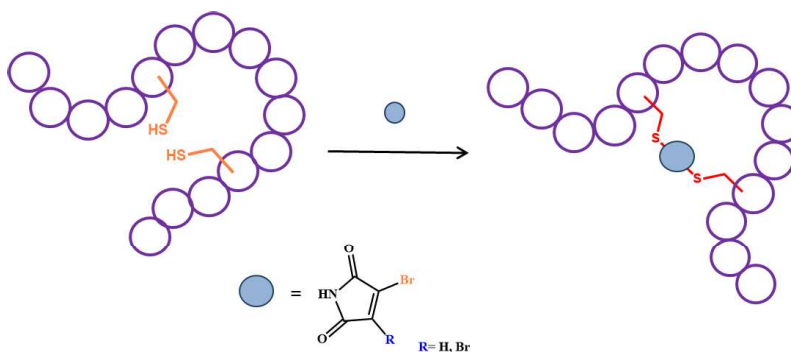
³ R. Narain, (Ed.). *Chemistry of Bioconjugates: Synthesis, Characterization, and Biomedical Applications*, 2014, John Wiley & Sons

⁴ E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48, 6974–6998

2.1. Biokoniugacja

Metody chemicznej modyfikacji stanowią jeden z najprostszych i najbardziej bezpośrednich sposobów identyfikacji reszt aminokwasowych istotnych dla funkcji białka. Prężnie rozwijające się w ostatnim czasie strategie „sztucznego zszywania” (stapling⁵ czy też rebridging⁶) łańcuchów peptydowych poprzez niewielkie molekuly, których obecność ma na celu zastąpienie różnego typu wiązań w proteinach, umożliwiając zmianę struktury modyfikowanego łańcucha, a co za tym idzie zmianę jego funkcji.

Stapling jest chemiczną modyfikacją peptydu, polegająca na tworzeniu kowalencyjnego „spinacza” pomiędzy dwiema resztami łańcucha bocznego aminokwasów. Modyfikacje te skupiają się na grupach tiolowych (Schemat 2), aminowych oraz metyloliolowych.^{7, 8}



Schemat 2. Poglądowe przedstawienie staplingu

Rebridging to strategia chemiczna polegająca na ponownym połączeniu dwóch wolnych grup tiolowych (najczęściej reszt cysteiny), które uprzednio tworzyły mostek dwusiarczkowy, który został zredukowany (Schemat 3). W procesie rebridgingu mostek dwusiarczkowy zostaje otwarty i zastąpiony nowym, syntetycznym łącznikiem (najczęściej małe cząsteczki organiczne), co przywraca spójność strukturalną peptydu/proteiny, często równocześnie wprowadzając nowe właściwości. Rebridging jest szczególną techniką staplingu ukierunkowaną na rozszywanie mostków dwusiarczkowych, do redukcji wiązania -S-S- stosuje się powszechnie chlorowoderek tris(2-karboksyetylo)fosfiny (TCEP). Strategia ta jest

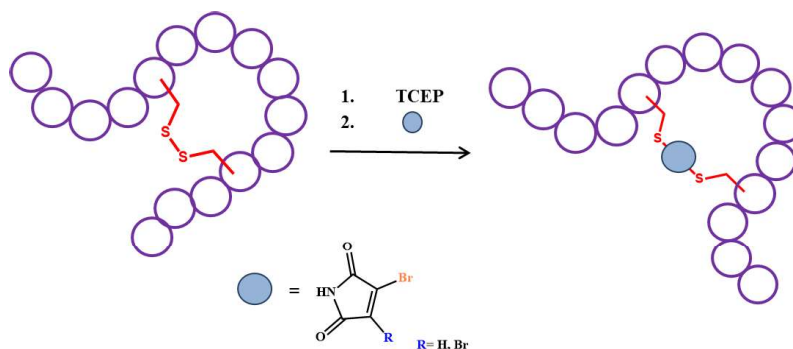
⁵ A. M. Ali, J. Atmaj, N. Van Oosterwijk, M. R. Groves, A. Dömling, *Stapled Peptides Inhibitors: A New Window for Target Drug Discovery*, Computational and Structural Biotechnology Journal, **2019**, 17, 263

⁶ S. L. Kuan, T. Wang, T. Weil, *Site-Selective Disulfide Modification of Proteins: Expanding Diversity beyond the Proteome*, Chem. Eur. J., **2016**, 22, 17112

⁷ Y. Chen, C. Dai, J. Han, Y. Xing, F. Yin, Z. Li, *Recent Chemical Biology Insights Towards Reversible Stapled Peptides*, ChemBioChem, **2025**, 5, 26(9)

⁸ Lau *et al.*, *Peptide stapling techniques based on different macrocyclisation chemistries*, Chem. Soc. Rev., **2015**, 44, 91-102

narzędziem wykorzystywanym do selektywnych (site-selective) modyfikacji, ponieważ ukierunkowana jest na wiązania dwusiarczkowe obecne w łańcuchach peptydowych.^{9, 7}



Schemat 3. Poglądowe przedstawienie rebridgingu

Warto podkreślić, że zastosowanie peptydów terapeutycznych gwałtownie wzrosło w ciągu ostatnich trzech dekad obejmując obszary takie jak choroby metaboliczne, onkologiczne i choroby układu krążenia. Z danych zebranych w 2018 roku, na podstawie wcześniej opublikowanego raportu Peptide Therapeutics Foundation, wynika iż spośród 484 zgłoszonych peptydów terapeutycznych 60 zostało zatwierdzonych w Stanach Zjednoczonych, Europie i/ lub Japonii, a 155 peptydów znajduje się w fazie badań klinicznych, z czego 50% jest obecnie w badaniach II fazy.¹⁰

Wprowadzenie znaczników do struktury białka wpływa dodatkowo na zwiększenie możliwości obrazowania i wykrywania poprzez sprzężanie ze środkami obrazującymi. Nowe podejście do modyfikacji peptydów ukierunkowane jest na aminokwasy, takie jak lizyna i cysteina. Cysteina w swej cząsteczce zawiera grupę -SH, która uczestniczy w tworzeniu mostków dwusiarczkowych, które mają wpływ na strukturę białek. Niesparowana, wolna cysteina, wykazująca wysoką nukleofilowość, stosunkowo rzadko występuje w białkach przez co jest idealnym miejscem ich chemoselektywnej modyfikacji - tworzenie pochodnych łańcuchów cysteiny to jedne z najbardziej istotnych technik modyfikacji i koniugacji białek. Specyficzną modyfikację cysteiny zazwyczaj osiąga się na drodze reakcji grupy tiolowej z elektrofilami, takimi jak maleimidy.

⁹ M. T. W. Lee, A. Maruani, J. R. Baker, S. Caddick, V. Chudasama, *Next-generation disulfide stapling: reduction and functional re-bridging all in one*, Chem. Sci., **2016**, 7, 799-802

¹⁰ J. L. Lau, M. K. Dunn, *Therapeutic peptides: historical perspectives, current development trends, and future directions.*, Bioorg. Med. Chem., **2018**, 26, 2700

Tego typu strategie dostarczają naukowcom potężne narzędzie umożliwiające selektywną modyfikację peptydów i białek zawierających w swej budowie mostki dwusiarczkowe przez co zyskują bezpośredni wpływ na programowanie ich właściwości w zależności od potrzeb terapeutycznych. Co więcej znakowanie białek znacznikami fluorescencyjnymi charakteryzuje się większym bezpieczeństwem oraz przystępnością w użyciu niż znakowanie znacznikami izotopowymi.

Chemiczne metody modyfikacji białek polegające na funkcjonalizacji reszt aminokwasowych są nieocenionym narzędziem w syntezie nowych biokoniugatów. Tego typu reakcje prowadzone są na natywnych strukturach białek, przy jednoczesnym zachowaniu integralności i funkcjonalności białka. Chemiczne modyfikacje białek powinny spełniać szereg wymagań takich jak:¹¹

- zachowanie zgodności z funkcjonalnymi grupami występującymi w białkach,
- selektywność reakcji,
- możliwość prowadzenia reakcji w środowisku wodnym, w neutralnym bądź zbliżony do neutralnego pH,
- temperatura reakcji nie powinna przekraczać temperatury pokojowej (do 40 °C),
- reakcje powinny cechować się szybką kinetyką,
- do modyfikacji stosowane powinny być nietoksyczne reagenty w niskich stężeniach.

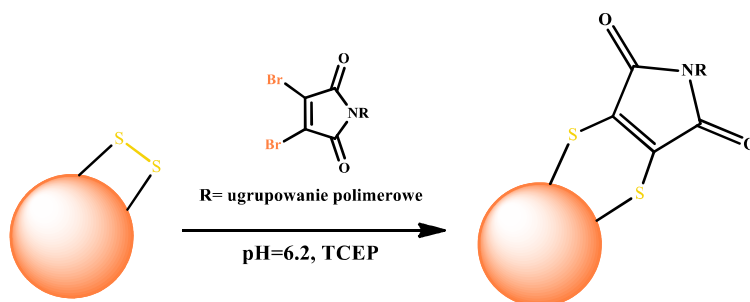
Wszystkie te kryteria mają na celu zapewnić wysoką wydajność modyfikacji. Ponadto, istotnym elementem są łatwe procedury charakterystyki oraz oczyszczania otrzymanych biokoniugatów, co bezpośrednio przekłada się na stosowalność metod w badaniach *in vivo*, ponieważ nie zakłócają normalnych procesów życiowych komórki.

Biokoniugacja syntetycznych polimerów z białkami oraz łańcuchami peptydowymi jest jedną z dobrze poznanych metod zmiany właściwości natywnych biomolekuł. Tego typu biokoniugaty otrzymywane są w celu wprowadzania terapii opartych na lekach polimerowych. Pierwotnie badania skupiały się głównie na koniugacji do reszt lizyny. Z czasem przeprowadzone zostały badania skupiające się na resztach cysteiny, które

¹¹ O. Boutureira, G. J. L. Bernardes, *Advances in Chemical Protein Modification*, Chem. Rev., 2015, 115, 5, 2174–2195

przyczyniły się do opracowania szeregu odczynników selektywnie wiążących się z aminokwasami zawierającym grupy tiolowe. Do koniugacji cysteiny wykorzystywane są m.in. *N*-podstawione maleimidy, pirydylowe dwusiarczki oraz polimery z grupami akrylowymi.¹²

W literaturze znajduje się wiele prac dotyczących modyfikacji reszt cysteiny. Jednym z ciekawszych przykładów koniugacji są opublikowane w 2012 roku badania skupiające się na modyfikacji mostka dwusiarczkowego w kalcytoninie łososia przy użyciu polimerów funkcyjnych przyłączonych do ugrupowania dibromomaleimidowego. Polimery zostały skutecznie sprzęgnięte z kalcytoniną łososia poprzez modyfikację mostka dwusiarczkowego przy użyciu równomolowych ilości peptydu i polimeru (Schemat 4). Modyfikacja ta jest przykładem koniugacji typu rebridging polegającym na pierwotnej redukcji wiązania dwusiarczkowego w celu otrzymania wolnych reszt -SH, a następnie ich reakcja z cząsteczką organiczną, która prowadzi do ponownego „zmostkowania”.¹²



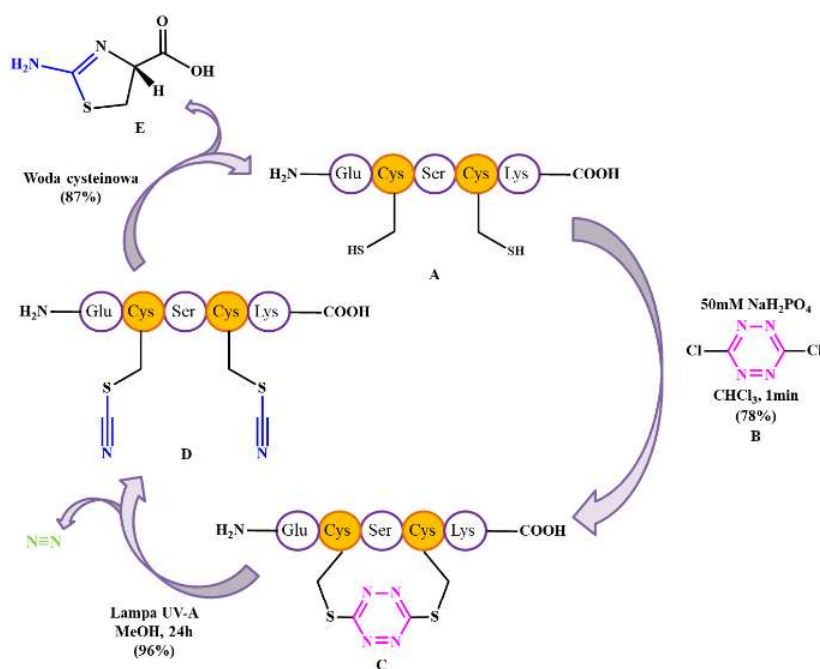
Schemat 4. Rebridging mostka dwusiarczkowego kalcytoniny łososia polimerową pochodną maleimidu

Zaletą modyfikacji typu stapling czy rebridging łańcuchów peptydowych, jest ich odwracalność, np. przy użyciu tego samego odczynnika redukującego użytego do wcześniejszej modyfikacji mostka dwusiarczkowego.

Przykładowo, na Schemacie 5 został przedstawiony przykład odwracalnego staplingu. W pierwszym etapie dwie wolne grupy -SH peptydu **A** zostały poddane reakcji z dichlorotetrazyną **B**, przez co otrzymano zmodyfikowany peptyd **C**. Następnie przeprowadzono proces „rozszywania” - unstaplingu, w celu otrzymania pierwotnego peptydu **A**. W tym celu „zszyty peptyd” został poddany działaniu promieniowania UV, które spowodowało

¹² M. W. Jones, R. A. Strickland, F. F. Schumacher, S. Caddick, J. R. Baker, M. I. Gibson, D. M. Haddleton, *Polymeric Dibromomaleimides As Extremely Efficient Disulfide Bridging Bioconjugation and Pegylation Agents*, J. Am. Chem. Soc., **2012**, 134, 3, 1847–1852

uzyskanie pochodnej ditiocyjanianowej **D**, a w ostatnim etapie, wprowadzenie do wodnego roztworu cysteiny spowodowało usunięcie grup nitrylowych i otrzymanie pierwotnego niezmodyfikowanego peptydu **A**.¹³



Schemat 5. Przykład odwracalnego staplingu¹³

Coraz to nowsze metody i podejście do chemicznej modyfikacji biomolekuł doprowadziły do opracowania szeregu metod biokoniugacji białek. Metody te z powodzeniem znajdują zastosowanie w wielu dziedzinach, takich jak:

- fluorescencyjne znakowanie białek,
- rozwój terapeutycznych koniugatów białkowych stosowanych w leczeniu m.in. HIV, nowotworów oraz malarii,
- nowoczesne narzędzia diagnostyczne.¹⁰

¹³ S. P. Brown, A. B. Smith, *Peptide/Protein Stapling and Unstapling: Introduction of s-Tetrazine, Photochemical Release, and Regeneration of the Peptide/Protein*, J. Am. Chem. Soc., **2015**, *137*, 4034–4037

2.2 Reakcje bioortogonalne

Reakcje bioortogonalne są szeroko stosowane do znakowania biocząsteczek, w szczególności białek, węglowodanów i kwasów nukleinowych, za pomocą markerów fluorescencyjnych.^{14, 15} Reakcje bioortogonalne oprócz nieinwazyjności wobec żywych organizmów, charakteryzują się wysoką wydajnością, dużym zakresem zastosowania, wysoką chemoselektywnością i szybkością.¹² Aby reakcja mogła zostać uznana jako reakcja bioortogonalna, musi spełniać następujące warunki:

- reakcje powinny zachodzić w warunkach fizjologicznych, czyli w środowisku wodnym o pH zbliżonym do obojętnego i temperaturze około 37°C,
- reakcje powinny być selektywne - substraty reakcji reagują tylko z określonymi, specyficznymi substratami - nie reagując z innymi składnikami komórki,
- reakcje powinny zachodzić szybko, nawet przy niskich stężeniach, a otrzymane produkty reakcji powinny być stabilne, co umożliwi obserwowanie procesów zachodzących w komórce,
- reakcje powinny obejmować grupy funkcyjne, które nie występują naturalnie w układach biologicznych.¹⁶

W literaturze znajduje się wiele przykładów reakcji badanych pod kątem spełniania warunków reakcji bioortogonalnych. Natkniemy się na reakcje takie jak ligacja Bertozzi-Staudingera, cykloaddycję CuAAC (*Copper(I)-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition*) i cykloaddycję azydek-alkin SPAAC (*Strain-Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition*) oraz reakcję iEDDA (*inverse electron-demand Diels-Alder*). W celu znalezienia i wytypowania warunków najkorzystniejszych oraz najbezpieczniejszych do zastosowania w układach biologicznych została przebadana kinetyka tych reakcji oraz przeanalizowano stosowane reagenty oraz produkty - Tabela 1.^{2, 4}

¹⁴ K. Krell, H. A. Wagenknecht, *Fluorogenic and Bioorthogonal Modification of RNA Using Photoclick Chemistry*, *Biomolecules*, **2020**, 10, 480

¹⁵ P. Shieh, C. R. Bertozzi, *Design strategies for bioorthogonal smart probes*, *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, 12, 9307–9320

¹⁶ R. E. Bird, S. A. Lemmel, X. Yu, Q. A. Zhou, *Bioorthogonal Chemistry and Its Applications*, *Bioconjugate Chem.*, **2021**, 32, 2457–2479

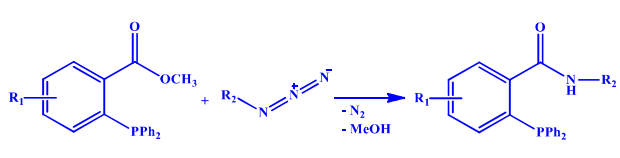
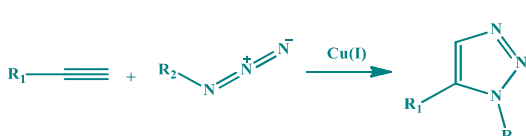
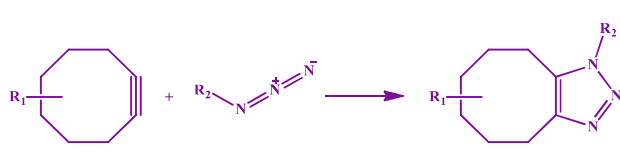
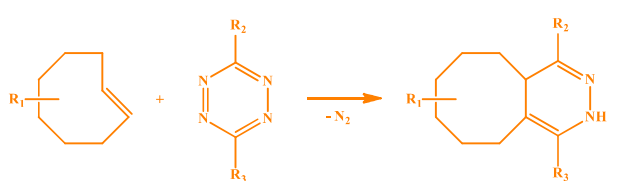
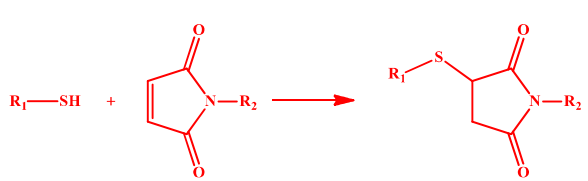
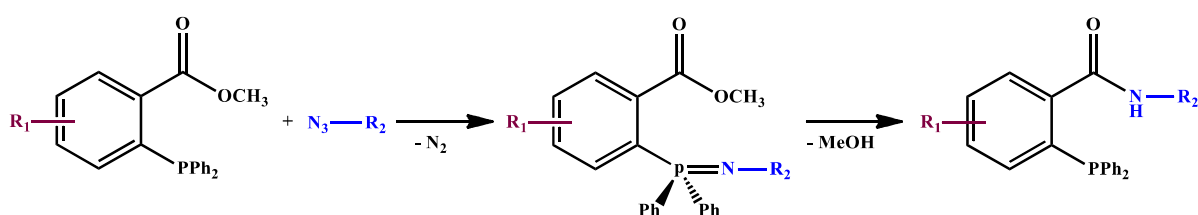
Typ reakcji	Schemat reakcji	Czy spełnia warunki reakcji „click”?	Czy spełnia warunki reakcji bioortogonalnej?
Ligacja Bertozzi-Staudingera	 <p>Reakcja fosfin z azydkami</p>	Nie - niska wydajność oraz produkty uboczne	Nie - produktem ubocznym jest metanol
CuAAC	 <p>Reakcja cykloaddycji alkenów z azydkami w obecności katalizatora</p>	Nie - niezbędne jest użycie katalizatora	Nie - potrzeba zastosowania katalizatora miedziowego
SPAAC	 <p>Reakcja cykloaddycji alkenów z azydkami</p>	Tak	Tak
Reakcje iEDDA	 <p>Reakcja bogatego w elektrony dienofila z elektrofilowym dienem</p>	Nie - powstają produkty uboczne	Tak
Reakcje tiol-alken (addycja grupy tiolowej do wiązania podwójnego alkenu)	 <p>Reakcja tiolu z alkenem</p>	Nie - powstają nietrwałe produkty	Nie - zastosowanie tiolu jako reagenta

Tabela 1. Podsumowanie różnych typów reakcji w celu wytypowania wariantów spełniających warunki reakcji typu „click” oraz reakcji bioortogonalnej

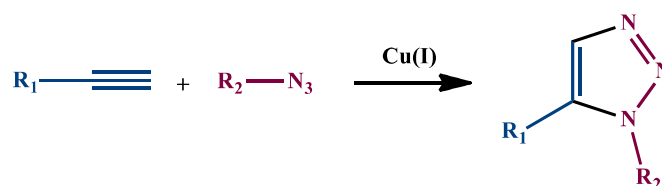
Reakcje bioortogonalne cechują się selektywnością oraz możliwością stosowania w warunkach fizjologicznych, co czyni je bardzo istotnym narzędziem syntetycznym. Reakcje te mają jednak pewne ograniczenia.

Ligacja Staudingera zachodząca pomiędzy azydkami, a fosfinami, jest jedną z pierwszych wariantów reakcji „click” opracowywanych w celu znalezienia warunków bezpiecznych dla układów biologicznych. Na drodze ligacji Staudingera tworzą się aminy i tlenki fosfin poprzez produkt pośredni - iminofosforan. Carolyn Bertozzi zmodyfikowała klasyczny wariant ligacji Staudingera, w którym azydek reaguje z odpowiednio zaprojektowaną fosfiną, tworząc trwałą pochodną amidu. W przeciwieństwie do klasycznej reakcji, modyfikacja ta wykorzystuje elektrofilową "pułapkę" (np. grupę estrową) w pozycji orto fosfiny. Taki zabieg ma na celu zapobiec hydrolizie i umożliwić znakowanie cząsteczek w żywych komórkach. W następnym etapie powstaje nowe wiązanie amidowe, które łączy dwa reagenty. Do ligacji Staudingera (Schemat 6) wykorzystywane są małowymiarowe azydki, które po wprowadzeniu do biomolekuły reagują z fosfinami z dużą selektywnością tworząc stabilne wiązania amidowe. Jedną z wad tego rozwiązania jest powolna kinetyka, co skutkuje mało wydajnym bioznakowaniem.¹⁶



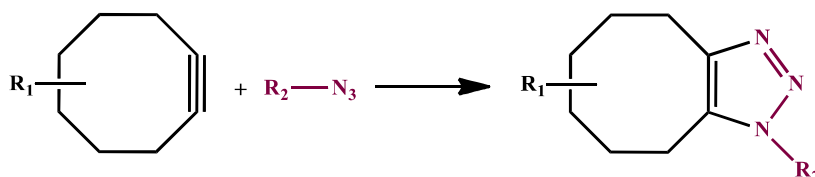
Schemat 6. Ligacja Bertozzi-Staudingera

Katalizowane miedzią cykloaddycje azydek-alkin (CuAAC) zostały zaproponowane przez Artura Michaela - Schemat 7. Tego typu reakcje były intensywnie badane przez Huisgena, a następnie Sharplessa i Meldala. Zastosowanie katalizatorów miedziowych do cykloaddycji znacząco poprawiło wydajność oraz regioselektywność tych reakcji. Choć reakcje te są regioselektywne, a stosowanie katalizatorów ma pozytywny wpływ na kinetykę reakcji, to ze względu na cytotoksyczność związków miedzi, możliwości bioaplikacyjne są znacząco niższe.¹⁶



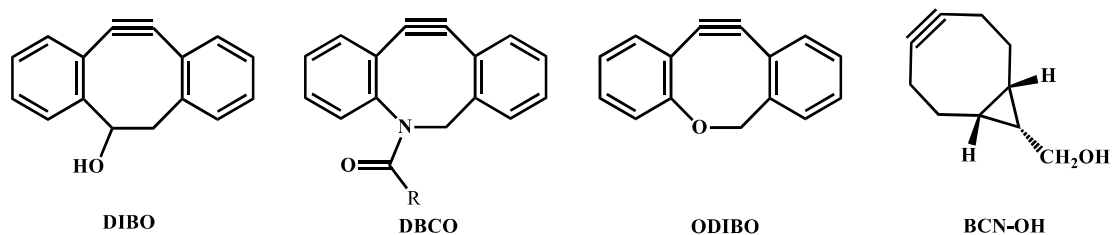
Schemat 7. Cykloaddycja CuAAC

Ze względu na fakt, iż stosowność reakcji CuAAC w bioukładach jest ograniczona ze względu na obecność jonów miedzi (I),¹⁷ chemię typu „click” zrewolucjonizował zaproponowany przez Carolyn Bertozzi niekatalityczny wariant cykloaddycji azydkowo-alkinowych (SPAAC) - Schemat 8. Reakcje te przebiegają z dużymi (niejednokrotnie ilościowymi) wydajnościami, w temperaturze pokojowej, bez dodatku katalizatorów z doskonałą selektywnością nawet w warunkach fizjologicznych. Pozwala to na znakowanie sfunkcjonalizowanych enzymów, białek czy komórek.



Schemat 8. Cykloaddycja SPAAC

Aby zwiększyć wydajności reakcji, bez konieczności stosowania katalizatorów miedziowych, badaczka zamieniła proste alifatyczne alkiiny na cykliczne odpowiedniki - pochodne cyklooktynu wśród których wymienić możemy m.in. 4-dibenzenocyklooktynol (DIBO), aza-dibenzocyklooktyn (DBCO), bicyklononyn (BCN), czy okso-dibenzocyklooktyn (ODIBO) przedstawione na Rysunku 4. Dzięki Bertozzi i jej zespołowi cyklooktyny stały się ważnymi reagentami w bioortogonalnej chemii, a ich reaktywność wynika z obecności zwiększonych naprężeń w pierścieniu cyklooktynu. Pochodne te reagują z azydkami na drodze cykloaddycji tworząc stabilne 1,2,3-triazole, dając uniwersalny wariant reakcji bioortogonalnych w porównaniu do cykloaddycji CuAAC.¹⁸



Rysunek 4. Reaktywne pochodne cyklooktynu stosowane w reakcjach SPAAC

¹⁷ K. Miszczak, *Chemia bioortogonalna – Nowa perspektywa dla chemii organicznej*, **2018**, 72, 9-10

¹⁸ D. Svatunek, K. Athrin Lang, A. Murnauer, Z. Tan, K. N. Houk, *How cycloalkane fusion enhances the cycloaddition reactivity of dibenzocyclooctynes*, *Chem. Sci.*, **2024**, 15, 2229–2235

Cyklooktyn i jego pochodne stosowane są do znakowania aminokwasów, peptydów i białek zawierających wiązania -SH lub mostki dwusiarczkowe.¹⁹ W tym przypadku możliwe jest zarówno bezpośrednie znakowanie cząsteczek, jak i znakowanie poprzedzone aktywacją mostków dwusiarczkowych w reakcji z dichlorotetrazyną. Bardzo ciekawym jest stosowanie strategii typu „kliknij, aby uwolnić” (ang. „click to release”) w celu zainicjowania syntezy leków *in vitro* i *in vivo*. Ponadto naukowcy wykazali, że poprzez wprowadzenie zamaskowanej reszty lizyny za pomocą miejscowo specyficznej inkorporacji aminokwasu, reakcja bioortogonalna może zostać wykorzystana do wywołania aktywacji białka. Ta strategia umożliwia farmakologiczną aktywację białek w żywych organizmach i może dostarczyć nowych informacji na temat wpływu aktywności białek na fizjologię. Dodatkowe badania wykazały, że bioortogonalne maskowanie może być również wykorzystane do aktywacji fluoroforów w obrazowaniu, umożliwiając wykrywanie biomolekuł, takich jak RNA. Sprzężenia bioortogonalne mogą znaleźć zastosowanie do inicjowania tworzenia biologicznie aktywnych składników, zarówno poprzez bezpośrednią syntezę leków *in situ*, jak i poprzez kontrolowane uwalnianie leków. Jeśli tego typu rozwiązania *in vivo* będą dalej rozwijane, to reakcje bioortogonalne mają duży potencjał do zastosowania w praktyce klinicznej.²⁰

Kolejnym wariantem reakcji bioortogonalnych jest ligacja tetrazyny. Ten typ reakcji po raz pierwszy został opisany przez Blackmana oraz Devaraja i zachodzi na drodze odwrotnej reakcji Dielsa-Aldera (iEDDA) - Schemat 9. W tym wariacie cykloaddycji tetrazyna pełni rolę ubogiego w elektrony dienu i reaguje z bogatym w elektrony dienofilem.²¹ Stosowane są różne dienofile, jednak najpowszechniej wykorzystywane są naprężone alkeny, takie jak *trans*-cyklooktyny, ale również norborneny,²² cyklooktyny²³ i metylocyklopropen²⁴. Kinetyka ligacji tetrazyny jest szybka co czyni ją niemal optymalną metodą do zastosowań w żywych

¹⁹ A. Vidyakina, S. A. Silonov, A. I. Govdi, A. Yu. Ivanov, E. P. Podolskaya, I. A. Balova, S. Bräse, N. A. Danilkina, *Key Role of Cycloalkyne Nature in Alkyne-Dye Reagents for Enhanced Specificity of Intracellular Imaging by Bioorthogonal Bioconjugation*, *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2024**, 22

²⁰ N. K. Devaraj, *The Future of Bioorthogonal Chemistry*, *ACS Cent. Sci.*, **2018**, 4, 952–959

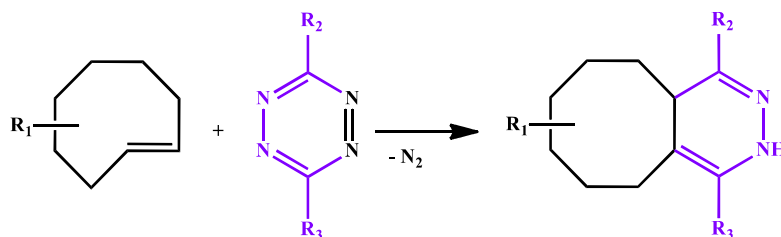
²¹ R. E. Bird, S. A. Lemmel, X. Yu, Q. A. Zhou, *Bioorthogonal Chemistry and Its Applications*, *Bioconjugate Chem.*, **2021**, 32, 2457–2479

²² N. K. Devaraj, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Tetrazine Based Cycloadditions: Application to Pretargeted Live Cell Imaging*, *Bioconjugate Chem.*, **2008**, 19 (12), 2297–2299

²³ M. T. Taylor, M. L. Blackman, O. Dmitrenko, J. M. Fox, *Design and Synthesis of Highly Reactive Dienophiles for the Tetrazine–*trans*-Cyclooctene Ligations*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133 (25), 9646–9649

²⁴ D. N. Kamber, L. A. Nazarova, Y. Liang, S. A. Lopez, D. M. Patterson, H. W. Shih, K. N. Houk, J. A. Prescher, *Isomeric Cyclopropenes Exhibit Unique Bioorthogonal Reactivities*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135 (37), 13680–13683

komórkach. Jedynym ograniczeniem tych reakcji jest trwałość stosowanych pochodnych tetrazyny.²⁵



Schemat 9. Cykloaddycja typu iEDDA

Selektywne i wydajne znakowanie biocząsteczek w warunkach fizjologicznych jest nadal trudne do osiągnięcia za pomocą tradycyjnych narzędzi biochemicznych lub biologii molekularnej. Ponieważ reakcje bioortogonalne można przeprowadzać bez żadnej ingerencji w układ biologiczny, istnieje znaczne zainteresowanie ich wykorzystaniem do znakowania i śledzenia małych cząsteczek w żywych komórkach.²⁶ Postęp jaki został dokonany poprzez rozwijanie chemii bioortogonalnej - optymalizowanie warunków reakcji, dobór odpowiednio reaktywnych i biokompatybilnych reagentów, dostarczył naukowcom nowych narzędzi umożliwiających znakowanie biomolekuł, a następnie ich bioobrazowanie. Wszystkie typy reakcji bioortogonalnych znalazły zastosowanie do znakowania biomolekuł takich jak łańcuchy peptydowe, proteiny, cukry, łańcuchy DNA i RNA, a także lipidy. Badania mogą być prowadzone *in vitro*, ale naukowcy podejmują także próby prowadzenia badań *in vivo*.^{27, 28, 29, 30, 31}

Ze względu na swoją prostotę, wysokie wydajności i specyficzność, chemia bioortogonalna cechuje się dużym potencjałem zastosowania w dostarczaniu leków. Reakcje bioortogonalne poprawiają dostarczanie środków terapeutycznych do miejsc docelowych. Ponadto, nanocząstki i biocząsteczki mogą być łączone z błonami komórkowymi poprzez reakcje

²⁵ M. R. Karver, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Synthesis and Evaluation of a Series of 1,2,4,5-Tetrazines for Bioorthogonal Conjugation*, *Bioconjugate Chem.*, **2011**, 22 (11), 2263–2270

²⁶ X. Li, Z. Liua, S. Dong, *Bicyclo[6.1.0]nonyne and tetrazine amino acids for Diels–Alder reactions*, *RSC. Adv.*, **2017**, 7, 44470–44473

²⁷ K. Horisawa, *Specific and quantitative labeling of biomolecules using click chemistry*, *Frontiers in Physiology*, **2014**, 4

²⁸ K. Lang, J. W. Chin, *Cellular incorporation of unnatural amino acids and bioorthogonal labeling of proteins*, *Chem. Rev.*, **2014**, 114, 4764–4806

²⁹ R. E. Bird, S. A. Lemmel, X. Yu, Q. A. Zhou, *Bioorthogonal Chemistry and Its Applications*, *Bioconjugate Chem.*, **2021**, 32, 2457–2479

³⁰ J. H. Choi, S. Kim, O. Kang, S. Y. Choi, J. Y. Hyun, H. S. Lee, I. Shin, *Selective fluorescent labeling of cellular proteins and its biological applications*, *Chem. Soc. Rev.*, **2024**, 53, 9446

³¹ N. Z. Fantoni, A. H. El-Sagheer, T. Brown, *A Hitchhiker's Guide to Click-Chemistry with Nucleic Acids*, *Chem. Rev.*, **2021**, 121, 7122–7154

bioortogonalne, zapewniając możliwość opracowywania nowych wielofunkcyjnych systemów dostarczania leków DDSs („drug delivery systems”).³²

Bardzo ciekawym zastosowaniem chemii bioortogonalnej są reakcje typu „fotoclick”, które w porównaniu do reakcji iEDDA naukowcy mogą kontrolować dzięki wykorzystaniu światła do zapoczątkowania reakcji. Podczas naświetlania dochodzi do tworzenia się produktu wykazującego fluorescencję. Grupa badawcza Katji Krell i Hansa-Achima Wagenknechta opisała indukowaną światłem reakcję typu „click” DNA zmodyfikowanego tetrazolem oraz modyfikacje jednoniciowego RNA, a otrzymane przez badaczy wyniki stanowią nowe narzędzie do fluorescencyjnego obrazowania RNA w komórkach biologicznych.¹⁴

Coraz częściej modyfikowane peptydy i białka wykorzystywane są w terapiach celowanych. Terapeutyczne biomolekuły znajdują zastosowanie w leczeniu chorób układu krążenia, procesach metabolicznych czy onkologicznych, w leczeniu chorób wirusowych (np. wirusa HIV) czy pasożytniczych (np. malarii). Białkowe koniugaty są również wykorzystywane jako narzędzia diagnostyczne.^{31, 33, 34}

3. Bioobrazowanie

Biosensing oraz bioobrazowanie to dwie najczęściej stosowane techniki do badania układów biologicznych różniące się podejściem i wynikami. Biosensing skupia się na wykrywaniu oraz analizie ilościowej cząsteczek lub procesów biologicznych z zastosowaniem specjalistycznych urządzeń zwanych biosensorami, podczas gdy bioobrazowanie, które jest optyczną formą biosensingu, ma na celu analizę wizualną (jakościową) struktur oraz procesów i funkcji biologicznych. Zarówno biosensing jak i bioobrazowanie umożliwiają badanie procesów biologicznych i patologicznych w żywych systemach na poziomie molekularnym, zapewniając w ten sposób możliwości cennej wczesnej diagnozy wielu chorób.^{35, 36}

Techniki bioobrazowania zostały wykorzystane po raz pierwszy w 1980 roku i do dziś są jednym z podstawowych narzędzi stosowanych w medycynie do diagnostyki chorób, a także

³² W. Yi, et.al., *Recent advances in developing active targeting and multifunctional drug delivery systems via bioorthogonal chemistry*, Signal Transduction and Targeted Therapy, **2022**, 7, 386

³³ A. Chi-Lung Lee, J. L. Harris, K. K. Khanna, J.-H. Hong, *A Comprehensive Review on Current Advances in Peptide Drug Development and Design*, Int. J. Mol. Sci., **2019**, 20, 2383

³⁴ M. T. W. Lee, et. Al., *Next-generation disulfide stapling: reduction and functional re-bridging all in one*, Chem. Sci., **2016**, 7, 799

³⁵ K. Pu, *Biosensors and Bioimaging*, ChemBioChem, **2019**, 20

³⁶ J. Li, K. Pu, *Development of organic semiconducting materials for deep-tissue optical imaging, phototherapy and photoactivation*, Chem. Soc. Rev., **2019**, 48, 38–71

do śledzenia procesów komórkowych.³⁷ Wizualizacja nie byłaby możliwa bez stosowania specjalistycznych sond molekularnych, czujników, czy środków kontrastowych, a sama technika ma nie zakłócać procesów życiowych. Odmianą zaletą tej metodyki jest zbieranie danych analitycznych w czasie niemal rzeczywistym, wysoka dokładność oraz niezawodność. Przetwarzanie obrazów oraz analiza dużych zbiorów danych są nieodłącznymi elementami bioobrazowania. Wizualizacja obejmuje struktury subkomórkowe i komórki, a także całe organizmy wielokomórkowe, tkanki i narządy.

Typowe metody obrazowania obejmują techniki takie jak:

- rentgenografia,
- tomografia komputerowa (CT),
- pozytonowa tomografia emisyjna (PET),
- rezonans magnetyczny (MRI),
- ultradźwięki,
- fluorescencja,
- mikroskopia optyczna.^{38, 39, 40}

Dużą zaletą stosowania technik optycznych (spektroskopii UV/VIS, spektroskopii emisyjnej czy mikroskopii optycznej) jest fakt, iż dają one obrazy o wysokiej rozdzielczości bez konieczności stosowania radioaktywnych środków kontrastowych. Nowoczesne techniki bioobrazowania pozwalają nie tylko zwizualizować przestrzenną dystrybucję białek czy kwasów nukleinowych, ale i również sprawdzić czy badane molekuly występują w konkretnych częściach komórek, a nawet to czy ze sobą oddziałują.⁴¹

Obrazowanie fluorescencyjne białek jest kluczowe dla zrozumienia ich funkcji w ich rodzimym środowisku, dostarcza ono wgląd w lokalizację, dynamikę i transport białek w żywych systemach. W związku z tym selektywne znakowanie białek docelowych fluoroforami stało się bardzo aktywnym obszarem badawczym, obejmującym chemię bioorganiczną, biologię chemiczną i biologię komórki. Opracowano różne metody

³⁷ Wen-Xiong Wang, *Bioimaging of metals in environmental toxicological studies: Linking localization and functionality*, Crit. Rev. Env. Sci. Tec., **2022**, 52, 3384–3414

³⁸ H. S. Lahoti, S.D. Jogdand, *Bioimaging: Evolution, Significance, and Deficit*, Cureus , **2022**, 14(9)

³⁹ R. Salzer, *BIOMEDICAL IMAGING: Principles and Applications*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, **2012**

⁴⁰ A. Verma, S. K. Gupta, *Chapter 5: "History and Techniques of Bioimaging"*, *Magnetic Quantum Dots for Bioimaging*, CRC Press, **2023**

⁴¹ K. Deleńko i wsp., *Techniki bioobrazowania na poziomie komórkowym metody in situ*, *Postępy biologii komórki tom 40*, **2013** nr 3, 551-578

selektywnego znakowania białek fluoroforami w komórkach i tkankach, które są stale rozwijane w celu wizualizacji i charakteryzowania białek.³¹ Chemia bioortogonalna umożliwia otrzymanie biologicznych środków terapeutycznych dzięki swojej biokompatybilności. Ponadto możliwe jest tworzenie połączeń, które są trudne do uzyskania przy użyciu standardowych technologii ekspresji białek lub ich sprzęgania, a stosowanie chemii bioortogonalnej ma ogromny potencjał w generowaniu trudnodostępnych połączeń typu białko-białko.⁴²

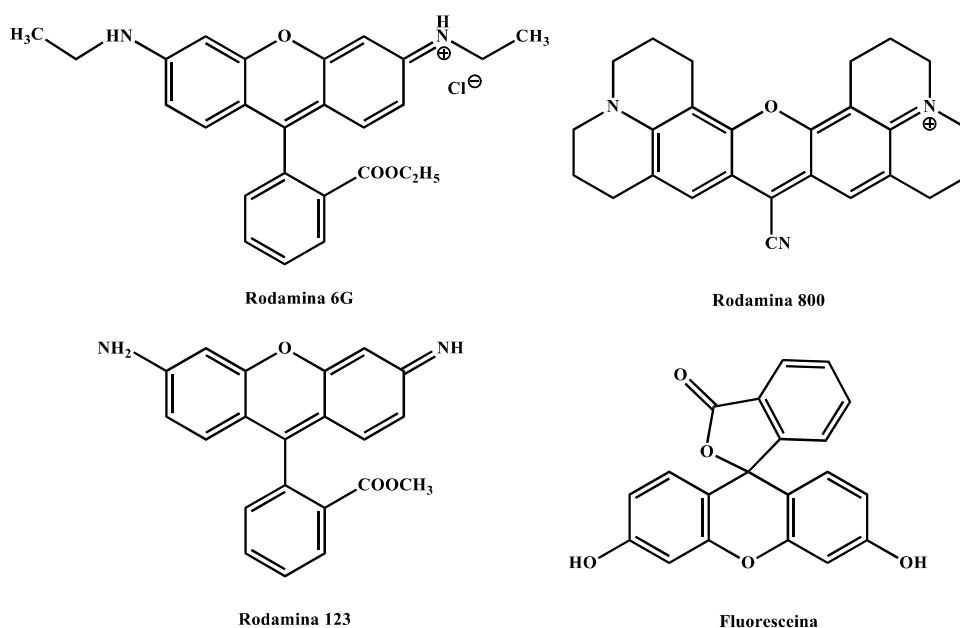
Barwniki egzogenne, w tym fluorescencyjne sondy molekularne, są od lat stosowane w celu zintensyfikowania kontrastu w materiałach biologicznych w procesie zwanym „barwieniem”, który pozostaje podstawą wielu klinicznych diagnoz chorób. Po dziś dzień, barwniki organiczne nadal stanowią większość fluorescencyjnych sond molekularnych stosowanych w obrazowaniu biologicznym ze względu na ich ustaloną chemię, skalowalność i różnorodne właściwości fizyczne, chemiczne i biologiczne. O potencjale aplikacyjnym barwnika do bioobrazowania świadczy fakt, że wyższa wydajność kwantowa fluorescencji koreluje z dłuższym czasem życia fluorescencji. Dlatego preferowane są sondy molekularne o wyższych wydajnościach kwantowych i dłuższym czasie życia fluorescencji - co zapewnia dobry kontrast obrazowania. Jednymi z najpowszechniej stosowanymi barwnikami w biologii są fluoresceina, rodamina (Rysunek 5), czy cyjaniny. Ponadto, fluorescencyjne sondy molekularne mogą wykazywać inne ciekawe właściwości fizykochemiczne, tj. wrażliwość na zmiany otaczającego środowiska, co dodatkowo zwiększa ich potencjał aplikacyjny. Takim przykładem jest Rodamina123 - przepuszczalny dla komórek, kationowy, zielony barwnik fluorescencyjny o wysokim powinowactwie do mitochondriów.^{43, 44, 45}

⁴² M Baalmann, et. al., *A Bioorthogonal Click Chemistry Toolbox for Targeted Synthesis of Branched and Well-Defined Protein-Protein Conjugates*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, 59, 12885-12893

⁴³ M. Y. Berezin, S. Achilefu, *Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging*, *Chemical Reviews*, **2010**, 110, 5

⁴⁴ M. Sameiro T. Goncalves, *Fluorescent Labeling of Biomolecules with Organic Probes*, *Chemical Review.*, **2009**, 109, 190

⁴⁵ Q. Yu, M. Proia, A. Heikal, *Integrated biophotonics approach for noninvasive and multiscale studies of biomolecular and cellular biophysics*, *A. J. Biomed. Opt.*, **2008**, 13(4), 041315



Rysunek 5. Przykłady barwników powszechnie stosowanych do bioobrazowania

W porównaniu z innymi technikami, takimi jak identyfikacja radioizotopowa, spektroskopia ESR, MRI i metodami detekcji elektrochemicznej, obrazowanie fluorescencyjne wyróżnia się wieloma zaletami - wysoką czułością, nieinwazyjnością i bezpieczeństwem podczas detekcji w organizmach żywych.^{46, 47} Czujniki fluorescencyjne, których działanie opiera się na małych cząsteczkach organicznych stały się obecnie bezcennym narzędziem dla współczesnej biologii, ponieważ dostarczają szczegółową wiedzę na temat położenia i ilości ważnych cząsteczek.^{48, 49}

Obok barwników organicznych i innych syntetycznych fluoroforów, szeroką stosowalnością cieszą się białka fluorescencyjne, które są wytwarzane przez komórki poprzez kaskadę procesów kodowanych przez DNA.^{50, 51} Główną różnicą między organicznymi fluoroforami, a białkami fluorescencyjnymi jest fakt, iż fluorofory w białkach są na ogół osłonięte od środowiska przez powłokę białkową.⁴⁵

⁴⁶ K. Horisawa, *Specific and quantitative labeling of biomolecules using click chemistry*, Front Physiol, **2014**, 5, Article 457

⁴⁷ D. J. Stephens, V. J. Allan, *Light microscopy techniques for live cell imaging*, Science 300, **2003**, 82–86

⁴⁸ K. Ayyavoo, P. Velusamy, *Pyrene based materials as fluorescent probes in chemical and biological fields*, New J. Chem., **2021**, 45, 10997–11017

⁴⁹ T. Nagano, *Development of fluorescent probes for bioimaging applications*, Proc. Jpn. Acad. Ser. B: Phys. Biol. Sci., **2010**, 86, 837–847

⁵⁰ S. J. Remington, *Fluorescent proteins: maturation, photochemistry and photophysics*, Curr. Opin. Struct. Biol., **2006**, 16, 714

⁵¹ L. Zhang, H. N. Patel, J. W. Lappe, R. M. Wachter, *Reaction Progress of Chromophore Biogenesis in Green Fluorescent Protein*, J. Am. Chem. Soc., **2006**, 128, 4766

Na poziomie laboratoryjnym techniki bioobrazowania są wykorzystywane do badania procesów biologicznych, takich jak sygnalizacja komórkowa, interakcje międzybiałkowe oraz mechanizmy chorób. Jeśli chodzi o zastosowania kliniczne techniki bioobrazowania stosowane są w diagnozowaniu chorób oraz monitorowaniu skuteczności leczenia. Szeroka stosowalność technik bioobrazowania ma bezpośredni wpływ na rozwój wczesnej diagnostyki i leczenia interwencyjnego chorób. Co więcej, techniki bioobrazowania są niezbędne do diagnostyki oraz leczenia chorób nowotworowych. Umożliwiają one szczegółową wizualizację guzów w organizmie, dokładną identyfikację i diagnozę na wczesnych etapach powstawania, przez co lekarze mają możliwość monitorowania ich rozwoju i procesu leczenia w czasie rzeczywistym. 52, 53, 54

4. Wybrane znaczniki cząsteczek biologicznie aktywnych

Ze względu na dużą ilość danych literaturowych dotyczących znaczników biomolekuł w tej części pracy zostaną omówione tylko te zagadnienia, które są merytorycznie związane z przeprowadzonymi przeze mnie badaniami.

4.1. Pochodne maleimidu

Jako uniwersalne i reaktywne reagenty sprzęgające, pochodne maleimidu (Rysunek 6) umożliwiły efektywną syntezę różnych produktów cyklicznych, znajdując zastosowanie w chemii medycznej, farmacji oraz nauce o materiałach. W ciągu ostatnich 50 lat stosowanie pochodnych maleimidu jako akceptorów Michaela stało się powszechną metodą sprzęgania z biocząsteczkami zawierającymi grupę tiolową.⁵⁵ Omawiane związki są również blokami budulcowymi do syntezy bardziej złożonych układów, np. na drodze reakcji polimeryzacji.⁵⁶ W ciągu ostatnich pięciu lat układy maleimidowe zyskały duże znaczenie w syntezie

⁵² X. Li, Y. Zhou, L. Li, T. Wang, B. Wang, R. Che, Y. Zhai, J. Zhang, W. Li, *Metal selenide nanomaterials for biomedical applications*, *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, **2023**, 225

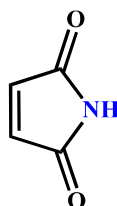
⁵³ Z. Zeng, H. Gao, C. Chen, L. Xiao, K. Zhang, *Bioresponsive nanomaterials: recent advances in cancer multimodal imaging and imaging-guided therapy*, *Front. Chem.*, **2022**, 276

⁵⁴ L. Chen, W. Zuo, Z. Xiao, Q. Jin, J. Liu, L. Wu, N. Liu, X. Zhu, *A carrier-free metal-coordinated dual-photosensitizers nanotheranostic with glutathione-depletion for fluorescence/photoacoustic imaging-guided tumor phototherapy*, *J. Colloid Interface Sci.*, **2021**, 600, 243–255

⁵⁵ K. Renault, J. W. Fredey, P.-Y. Renard, C. Sabot, *Covalent Modification of Biomolecules through Maleimide-Based Labeling Strategies*, *Bioconj. Chem.*, **2018**, 29, 249

⁵⁶ B. E. Kirkpatrick, K. S. Anseth, T. S. Hebner, *Diverse reactivity of maleimides in polymer science and beyond*, *Polymer International*, **2025**, 74, 4, 296-306

organicznej, ze względu na ich rolę w tworzeniu cząsteczek cyklicznych na drodze reakcji annulacji oraz fotoannulacji, aktywacji wiązania C-H, cykloaddycji i spirocyklizacji.^{55, 57, 58, 59}



Rysunek 6. Maleimid

Reakcje pomiędzy tiolami, a maleimidami od dawna są uznawane za jedne z najefektywniejszych addycji typu Michaela.⁶⁰ Czynnikiem nukleofilowym w reakcji addycji do wiązania podwójnego maleimidu jest grupa tiolowa, która przyłącza się do jednego z atomów węgla α,β -nienasyconego układu karbonylowego w pierścieniu maleimidowym (Schemat 11). Na drodze reakcji addycji nukleofilowej grupy -SH do wiązania podwójnego maleimidu tworzy się trwałe wiązanie tioeterowe.

Chociaż addycja tiolu do wiązania podwójnego maleimidu spełnia większość warunków, aby klasyfikować ją jako reakcję bioortogonalną, jedno z ważniejszych kryteriów zostaje niespełnione, otrzymane produkty są nietrwałe (Schemat 10). Ze względu na ich niezawodność, wydajność i selektywność, reakcje te od kilku dekad stanowią podstawowe narzędzie w syntezie biokoniugatów.⁶¹ Reakcje typu tiol-maleimid znajdują zastosowanie także w syntezie polimerów i materiałów oraz przyczyniają się do rozwoju chemii typu „click” stosowanej do syntezy makrocząsteczek i nowych materiałów.⁶²

⁵⁷ M. Aslam, M. S. Akhtar, H. N. Lim, J. H. Seo, Y. R. Lee, *Recent advances in the transformation of maleimides via annulation*, *Org. Biomol. Chem.*, **2025**, 23, 269-291

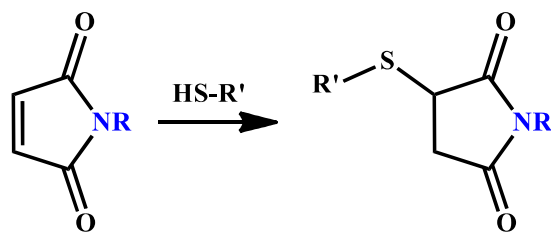
⁵⁸ G. Ilayda, T. Oguzhan, A. Gokhan, S. Ufuk, S. Gunay, H. Durmaz, *Thiol-Dibromomaleimide Polymerization: A Simple Strategy for Easily Degradable and Modifiable Polythioether Synthesis*, *Macromolecules*, **2025**, 58, 8, 3906–3915

⁵⁹ A. H. St. Amant, D. Lemen, S. Florinas, S. Mao, C. Fazenbaker, H. Zhong, H. Wu, C. Gao, R. J. Christie, J. R. de Alaniz, *Tuning the Diels–Alder Reaction for Bioconjugation to Maleimide Drug-Linkers*, *Bioconjugate Chem.*, **2018**, 29, 7, 2406–2414

⁶⁰ D. P. Nair, M. Podgórski, S. Chatani, T. Gong, W. Xi, C. R. Fenoli, C. N. Bowman, *The Thiol-Michael Addition Click Reaction: A Powerful and Widely Used Tool in Materials Chemistry*, *Chem. Mater.*, **2014**, 26, 1, 724–744

⁶¹ S. D. Fontaine, R. Reid, L. Robinson, G. W. Ashley, D. V. Sant, *Long-Term Stabilization of Maleimide–Thiol Conjugates*, *Bioconjugate Chem.*, **2015**, 26, 1, 145–152

⁶² B. H. Northrop, S. H. Frayne, U. Choudhary, *Thiol–maleimide “click” chemistry: evaluating the influence of solvent, initiator, and thiol on the reaction mechanism, kinetics, and selectivity*, *Polym. Chem.*, **2015**, 6, 3415–3430



Schemat 10. Addycja tiolu do wiązania podwójnego maleimidu

Maleimidy są szeroko stosowane jako akceptory Michaela do sprzęgania z tiolami białkowymi, co umożliwia selektywne modyfikacje biomolekuł. Jest to możliwe dzięki stosunkowo niskiej zawartości wolnych grup -SH pochodzących od cystein występujących w strukturach białek oraz ich wysokiej nukleofilowości.^{63, 64} Biologiczne tiole, takie jak cysteina i glutation, odgrywają istotną rolę metaboliczną w organizmach żywych. Z tego powodu poszukuje się nowych połączeń leków i markerów białkowych, które można uzyskać w reakcjach typu tiol-maleimid. Reakcja addycji tiolu do cząsteczki maleimidu jest szczególnie istotna i przydatna do znakowania przeciwciał.^{65, 66} Ponadto, maleimid jest często stosowany do koniugacji z innymi biologicznie istotnymi związkami, takimi jak barwniki fluorescencyjne, lipidy czy leki przeciwnowotworowe.⁶⁷ Z tych względów próba modyfikacji mostków dwusiarczkowych za pomocą pochodnych sukcyminidu i maleimidu jest szczególnie interesująca.⁶⁸

Maleimidy mogą być podstawiane zarówno w pozycjach alkenylowych, jak i w grupie imidowej, dzięki czemu możliwe jest pozyskiwanie dwu- i trójfunkcyjnych podstawionych pochodnych. Szeroka możliwość funkcjonalizacji układu maleimidowego przyczyniła się do otrzymania pochodnych, które znajdują zastosowanie w reakcjach sprzęgania, jako znaczniki białek czy związki ułatwiające dostarczanie leków (Rysunek 7). Na szczególną uwagę

⁶³ S. B. Gunnoo, A. Madder, *Chemical protein modification through cysteine*, ChemBioChem, **2016**, 17, 529–553

⁶⁴ M. Salmain, N. Fischer-Durand, B. Rudolf, *Bioorthogonal Conjugation of Transition Organometallic Complexes to Peptides and Proteins: Strategies and Applications*, Eur. J. Inorg. Chem., **2020**, 21–35

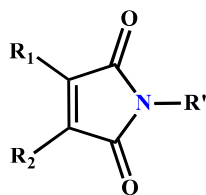
⁶⁵ M. Davydova, G. D. Le Roi, P. Adumeau, B. M. Zeglis, *Synthesis and Bioconjugation of Thiol-Reactive Reagents for the Creation of Site-Selectively Modified Immunoconjugates*, J. Vis. Exp., **2019**, 145

⁶⁶ P. A. Szijj, et al. *Minireview: Addressing the retro-Michael instability of maleimide bioconjugates*, Drug Discov Today: Technol, **2018**, 30, 27-34

⁶⁷ A. Bergamo, G. Sava, *Ruthenium complexes can target determinants of tumour malignancy*, Dalton Trans., **2007**, 1267-72

⁶⁸ G. I. Tezcan, O. Aslantruk, G. Sagdic, U. S. Gunay, *Thiol-Dibromomaleimide Polymerization: A Simple Strategy for Easily Degradable and Modifiable Polythioether Synthesis*, Macromolecules, **2025**, 58, 3906–3915

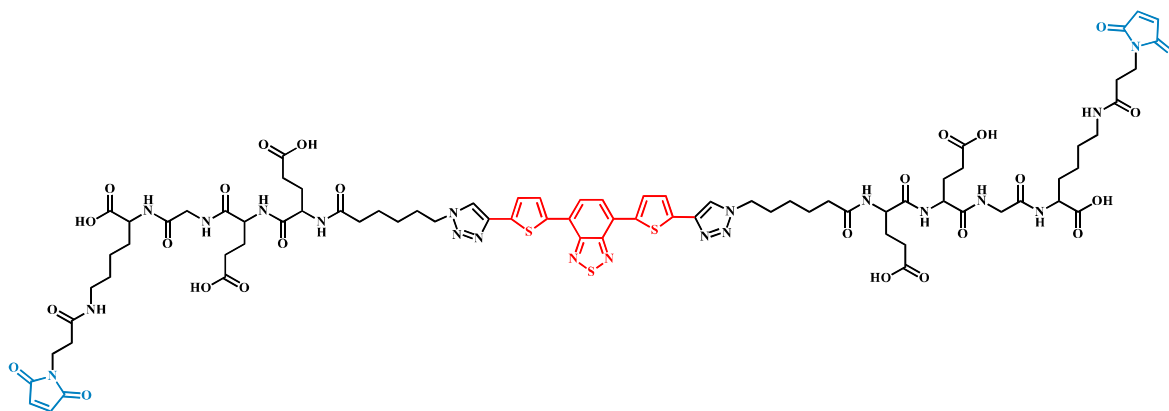
zasługują halogenopochodne maleimidu, zwłaszcza bromomaleimidy, które wykorzystywane są do modyfikacji białek.⁶⁹



R₁, R₂: -CH₂Br, -NHR, -OR, -SR, -Cl, -Br, -I
R': aryl, alkil, aminokwas

Rysunek 7. Przykłady pochodnych maleimidu

Ciekawym przykładem zastosowania pochodnej maleimidowej jest sonda fluorescencyjna DBT-2 (EEGK-maleimid) typu „light-up” - Rysunek 8. Sonda ta rozpuszcza się w wodzie, natomiast jej emisja w roztworach wodnych jest bardzo słaba. W roztworach zawierających białka dochodzi do reakcji wolnych grup tiolowych białek z grupami maleimidowymi, co prowadzi do włączenia fluorescencji sondy. Wykazano, że znaczne wzmocnienie fluorescencji sondy może być wykorzystane do selektywnego wykrywania tioli białkowych, w komórkach *Escherichia coli* oraz w żywych komórkach śródbłonna.⁷⁰



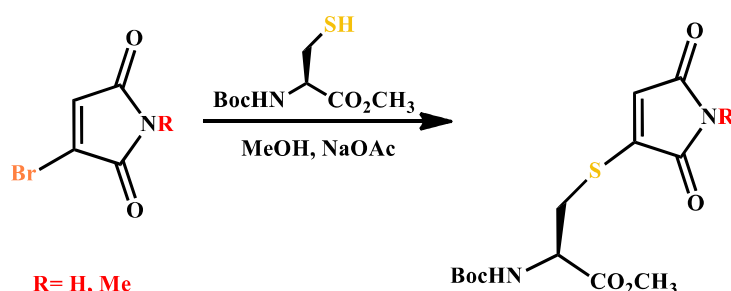
Rysunek 8. Sonda DBT-2(EEGK-maleimid) do selektywnego wykrywania tioli białkowych w roztworach

W ostatnim czasie dużym zainteresowaniem wśród naukowców cieszą się bromopochodne maleimidu. W 2009 roku ukazała się praca Bakera i współpracowników, w której wykazano, że

⁶⁹ J. E. Barker, J. D. Tibbetts, C. T. J. Ferguson, Y. Xie, R. K. O'Reilly, *Substituted Maleimides: Self-Reportable Linkers and Tags in Bioconjugation, Materials Science, and Nanotechnology*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2024**, 43, 21;63

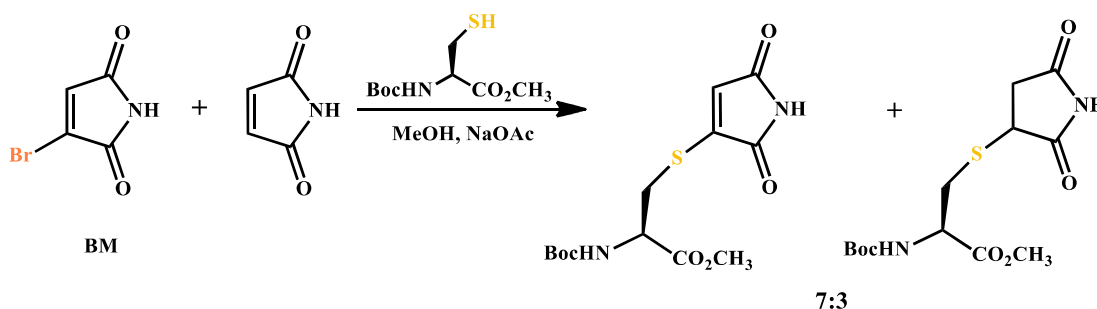
⁷⁰ G. Chen, Y. Hua, C. Ou, X. Zhang, D. Mao, Z. Yang, M. Chen, *Nanostructure formation-induced fluorescence turn-on for selectively detecting protein thiols in solutions, bacteria and live cells*, *Chem. Comm.*, **2015**, 51, 10758-10761

bromomaleimidy reagują szybko i selektywnie z cysteiną (Schemat 11). Ponadto, udowodniono, że bromomaleimidy w przeciwieństwie do maleimidów, mogą być stosowane do odwracalnej modyfikacji cysteiny. Użycie fosfiny TCEP w przypadku koniugatów tiomaleimidowych umożliwia przywrócenie do pierwotnej formy. Warto podkreślić, że w przypadku reakcji addycji i otrzymania koniugatów tiosukcynimidowych reakcje te są z reguły nieodwracalne.⁷¹



Schemat 11. Reakcja bromomaleimidu z *N*-Boc-CysOMe

Ciekawych informacji dotyczących reaktywności bromomaleimidów dostarczył eksperyment, w którym mieszaninę maleimidu oraz 2-bromomaleimidu (**BM**) poddano konkurencyjnej reakcji z estrem metylowym *N*-Boc-cysteiny (*N*-Boc-CysOMe) - Schemat 12. W wyniku reakcji otrzymano mieszaninę produktów w stosunku 7:3, co wskazuje, że bromomaleimid reaguje z cysteiną szybciej niż maleimid.⁶²

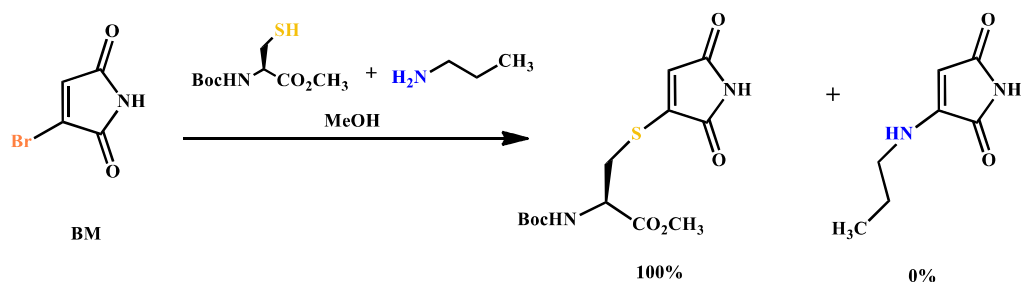


Schemat 12. Reakcja konkurencyjna **BM** oraz maleimidu z *N*-Boc-CysOMe

Dodatkowo zbadana została selektywność reakcji bromomaleimidów względem cysteiny w porównaniu z innymi nukleofilami. Do reakcji została użyta *N*-Boc-CysOMe oraz propyloamina. Z mieszaniny wyizolowany został wyłącznie produkt reakcji pochodnej *N*-Boc-CysOMe z maleimidem. Nie zaobserwowano obecności produktu reakcji maleimidu

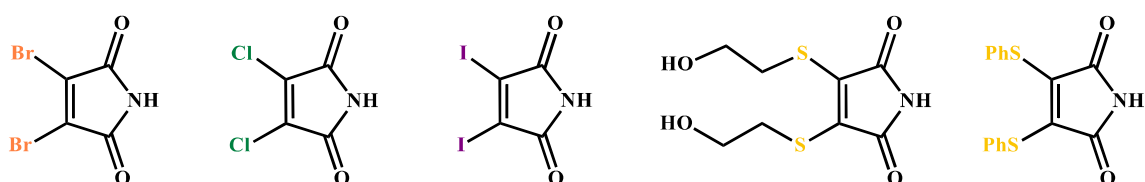
⁷¹ L. M. Tedaldi, M. E. B. Smith, R. I. Nathani, J. R. Baker, *Bromomaleimides: new reagents for the selective and reversible modification of cysteine*, Chem. Commun., **2009**, 6583–6585

z propyloaminą (Schemat 13). Świadczy to jednoznacznie o 100% selektywności reakcji bromomaleimidów względem grup tiolowych w porównaniu z nukleofilami aminowymi.⁶²



Schemat 13. Reakcja konkurencyjna propyloaminy oraz *N*-Boc-CysOMe z BM

2,3-Dibromomaleimid (**DBM**) oraz tiopochodne (Rysunek 9) mogą wbudowywać się w mostek dwusiarczkowy, tworząc nowy mostek maleimidowy - co zostało potwierdzone na przykładzie hormonu peptydowego somatostatyny.⁷²



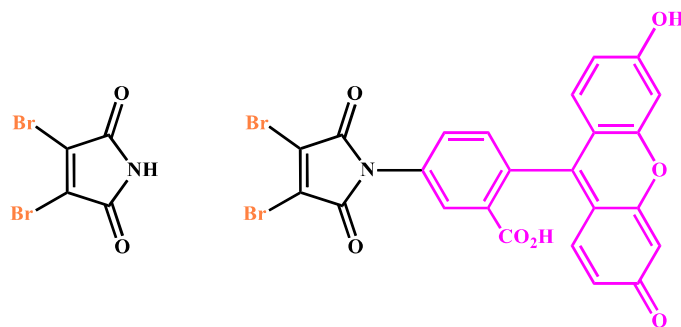
Rysunek 9. Pochodne maleimidu stosowane do modyfikacji mostków dwusiarczkowych

Wykazano, że mono- i dibromomaleimidy mogą być stosowane do selektywnej modyfikacji reszty cysteinowej w somatostatynie, a sama modyfikacja może być odwracalna.⁷³ Oprócz potencjalnych korzyści płynących z odwracalności tej modyfikacji, dibromopochodne maleimidu dają również możliwość przyłączania kolejnych grup funkcyjnych. Do koniugatów białko-maleimid może zostać dołączony drugi tiol, tworząc koniugaty maleimidowe lub sukcyimidowe. Podobnie jak w przypadku innych odczynników opartych na maleimidzie, do atomu azotu można również przyłączyć grupę funkcyjną. Daje to trzy możliwości przyłączenia białek bądź innych cząsteczek, co udowodniono na drodze znakowania somatostatyny dibromomaleimidem oraz jego fluorescencyjną pochodną (Rysunek 10).⁷⁴

⁷² F. F. Schumacher, M. Nobles, C. Ryan, M. E. B. Smith, A. Tinker, S. Caddick, J. R. Baker, *In Situ Maleimide Bridging of Disulfides and a New Approach to Protein PEGylation*, *Bioconjugate Chem.*, **2011**, 22, 132–136

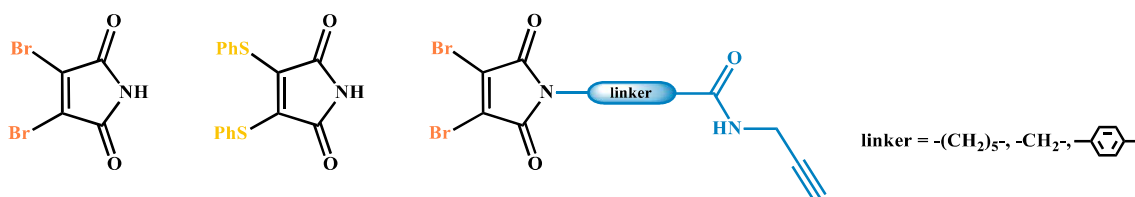
⁷³ Y. Chen, C. Dai, J. Han, Y. Xing, F. Yin, Z. Li, *Recent Chemical Biology Insights Towards Reversible Stapled Peptides*, *ChemBioChem.*, **2025**, 26

⁷⁴ M. E. B. Smith, F. F. Schumacher, C. P. Ryan, L. M. Tedaldi, D. Papaioannou, G. Waksman, J. R. Baker, *Protein Modification, Bioconjugation, and Disulfide Bridging Using Bromomaleimides*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 1960–1965



Rysunek 10. Dibromomaleimid oraz jego fluoresceinowa pochodna do znakowania somatostatyny

Ponadto, w 2014 i 2017 roku grupa naukowa Bakera zaproponowała kolejne zastosowanie pochodnych maleimidów do bioznakowania. Zastosowano dibromomaleimidy, jako najprostsze i najłatwiej dostępne reagenty do tworzenia mostków dwusiarczkowych, z dodatkowo przyłączonymi do atomu azotu różnymi linkerami. Wykazano, że dibromomaleimidy z przyłączonymi elektronoujemnymi linkerami (Rysunek 11) stanowią zoptymalizowane układy do biokoniugacji natywnych przeciwciał, umożliwiające tworzenie wyjątkowo trwałych biokoniugatów.^{75, 76}



Rysunek 11. Pochodne maleimidu stosowane do koniugacji przeciwciał

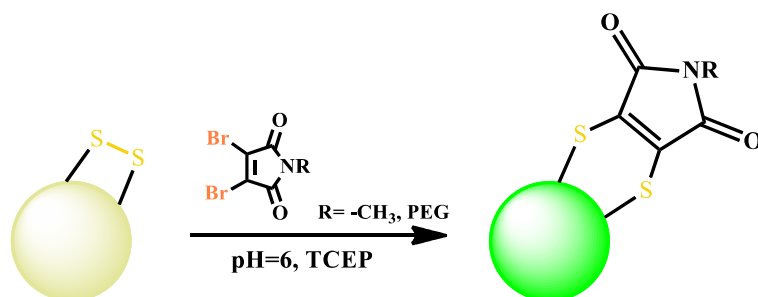
Co ważne, w 2013 roku grupa badawcza O'Reilly'ego zaproponowała nowe zastosowanie pochodnych maleimidów jako znaczniki fluorescencyjne w chemii materiałowej i biomedycynie. Zaobserwowano, że na drodze reakcji bromomaleimidu z alkiłotiolami powstają produkty o silnej fluorescencji. Możliwość podstawienia atomów bromu różnymi podstawnikami czyni z tych związków uniwersalne znaczniki fluorescencyjne.⁷⁷

⁷⁵ F. F. Schumacher, J. P. M. Nunes, A. Maruani, V. Chudasama, M. E. B. Smith, K.A. Chester, J. R. Baker, S. Caddick, *Next generation maleimides enable the controlled assembly of antibody–drug conjugates via native disulfide bond bridging*, *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, 12, 7261-7269

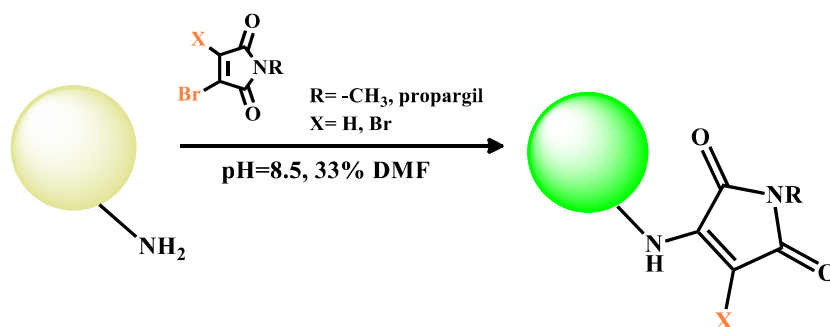
⁷⁶ M. Morais, J. P. M. Nunes, K. Karu, N. Forte, I. Benni, M. E. B. Smith, J. R. Baker, *Optimisation of the dibromomaleimide (DBM) platform for native antibody conjugation by accelerated post-conjugation hydrolysis*, *Org. Biomol. Chem.*, **2017**, 15, 2947-2952

⁷⁷ M. P. Robin, P. Wilson, A. B. Mabire, J. K. Kiviaho, J. E. Raymond, D. M. Haddleton, R. K. O'Reilly, *Conjugation-Induced Fluorescent Labeling of Proteins and Polymers Using Dithiomaleimides*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135, 2875–2878

W reakcji dibromomaleimidów i monobromomaleimidów z zredukowanymi mostkami dwusiarczkowymi (Schemat 14) oraz wolnymi grupami aminowymi (Schemat 15) obecnymi w α -chymotrypsynie otrzymano koniugaty enzymatyczne.⁷⁸



Schemat 14. Rebridging mostka dwusiarczkowego α -chymotrypsyny przy użyciu pochodnej **DBM**



Schemat 15. Reakcja pochodnej (di)bromomaleimdu z grupą aminową α -chymotrypsyny

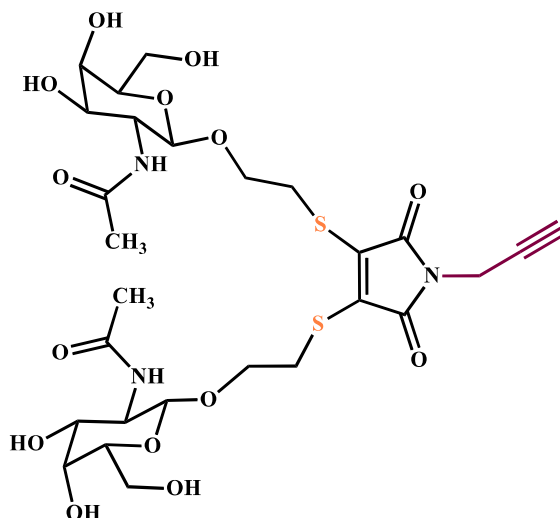
Otrzymane koniugaty enzymów mostkowanych ditiomaleimidami wykazywały fluorescencję, podobnie było w przypadku produktów reakcji **BM** z grupą aminową α -chymotrypsyny. Analiza uzyskanych widm wzbudzenia i emisji sprzężonych enzymów wykazała, że są one podobne do widm fluoroforów małowcząsteczkowych.⁷⁰

Opracowany został koniugat *N*-acetylogalaktozaminy (GalNAc) zawierający fragment ditiomaleimidowy (Rysunek 12), który charakteryzuje się dobrą wykrywalnością na drodze spektroskopii fluorescencyjnej. Emisja koniugatu jest na tyle silna, że strategia ta może mieć potencjalne zastosowanie w dostarczaniu leków w terapii medycznej.⁷⁹ Ponadto, zaletą tego

⁷⁸ J. T. Husband, A. C. Hill, R. K. O'Reilly, *Utilizing functionalized bromomaleimides for fluorogenic conjugation and PEGylation of enzymes*, Polym. Int., **2019**, 68, 1247-1254

⁷⁹ S. Kong, X. Gao, Q. Wang, J. Jin, L. Qiu, M. Xie, *A Novel Dithiomaleimide-Based GalNAc-siRNA Conjugate Enabling Good siRNA Delivery and Traceability*, Molecules, **2023**, 28, 7184

związku oprócz silnej emisji, jest obecność w strukturze ugrupowania alkinowego, dzięki któremu może on reagować z azydami na drodze reakcji „click”.



Rysunek 12. Koniugat GalNAc

4.2. Kompleksy metaloorganiczne oraz chemia biometaloorganiczna

Stosowanie metali oraz ich soli w celach leczniczych praktykowane było już w czasach starożytnych cywilizacji - egipskiej, chińskiej, greckiej i rzymskiej. Miedź stosowano do odkażania ran,⁸⁰ złoto do leczenia problemów skórnych, np. osób dotkniętych ospą i wrzodami skórnymi,⁸¹ a srebro do leczenia ran i infekcji.⁸²

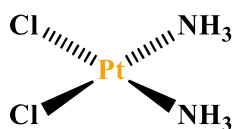
Odkrycie w 1844 roku cisplatyny (Rysunek 13), która jest kompleksem nieorganicznym, przyczyniło się do licznych badań nad innymi kompleksami metali, np. kompleksami tytanu, żelaza, molibdenu czy rutenu, pod kątem ich działania przeciwnowotworowego. Zapoczątkowało to pracę nad nową klasą związków - kompleksami metaloorganicznymi. W 1965 roku w zespole Barnetta Rosenberga zaobserwowano iż cisplatyna hamuje podział bakterii *Escherichia coli*, co doprowadziło do odkrycia przeciwnowotworowych właściwości tego kompleksu, który stał się kluczowym lekiem onkologicznym.⁸³

⁸⁰ G. Borkow, J. Gabbay, *Copper, an ancient remedy returning to fight microbial, fungal and viral infections*, Curr. Chem. Biol., **2009**, 3, 272–278

⁸¹ Z. Huaizhi, N. Yuantao, *China's ancient gold drugs*, Gold Bulletin, **2001**, 34, 24–29

⁸² M. Spear, *Silver: an age-old treatment modality in modern times*, Plastic. Surg. Nurs., **2010**, 30, 90–93

⁸³ G. Jaouen et al., *12.08 Medicinal organometallic chemistry*, **2007**, Elsevier



Rysunek 13. Struktura cisplatyny

Specyficzne właściwości kompleksów metaloorganicznych pozwalają na wykorzystanie ich w różnych gałęziach biologii i medycyny - stosowane są nie tylko jako środki przeciwnowotworowe i przeciwbakteryjne, ale również jako leki przeciwzapalne oraz przeciwmalaryczne. Związki te mogą służyć również do znakowania molekuł oraz jako inhibitory enzymów. Przykładem mogą być kompleksy rutenu posiadające zdolność hamowania przerzutów nowotworowych, czego nie obserwuje się w przypadku kompleksów innych metali.^{84, 85, 86}

Kompleksy metaloorganiczne stanowią grupę związków z pogranicza chemii nieorganicznej i organicznej. Składają się one z centrum metalicznego, które jest bezpośrednio związane z przynajmniej jednym atomem węgla grupy organicznej.^{87, 88} Ligand to cząsteczka lub jon, który ma przynajmniej jedną parę elektronów, którą może wykorzystać do połączenia z metalem. Centrum metaliczne może być związane z różnymi ligandami (np. grupami arenowymi, alkenowymi, alkinowymi, karbenowymi), które są donorami wolnych par elektronowych, bądź elektronów wiązań π lub σ – Tabela 2.⁸⁹

⁸⁴ C. X. Zhang, S. J. Lippard, *New metal complexes as potential therapeutics*, *Curr. Chem. Biol.*, **2003**, 7, 481-489

⁸⁵ A. Bergamo, G. Sava, *Ruthenium complexes can target determinants of tumour malignancy*, *Dalton Trans.*, **2007**, 1267-72

⁸⁶ C-H. Leung, S. Lin, H-J. Zhonga, D-L. Ma, *Metal complexes as potential modulators of inflammatory and autoimmune responses*, *Chem. Sci.*, **2015**, 6, 871-884

⁸⁷ J. K. C. Abbott, B. A. Smith, T. M. Cook, Z.-L. Xue, *Chapter 10. Synthesis of Organometallic Compounds, Modern Inorganic Synthetic Chemistry*, Elsevier B.V, **2017**

⁸⁸ J. Clayden, N. Greeves, S. Warren and P. Wothers, *Organic Chemistry*, Oxford University Press, **2001**

⁸⁹ J. Zakrzewski, Wykład pt. „Wstęp do chemii metaloorganicznej metali przejściowych”, Łódź, **2020**

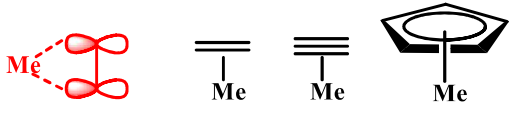
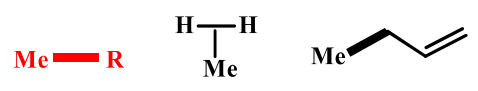
Źródło elektronów	Przykłady
Wolne pary elektronów	np. NH ₃ , H ₂ O H ₃ N: → Me H ₂ O: → Me
Pary elektronów π	 Kompleksy π
Pary elektronów σ	 Kompleksy σ

Tabela 2. Rodzaje ligandów w kompleksach metaloorganicznych

Chemia biometaloorganiczna rozwinęła się w dość krótkim czasie, równoległe z chemią medyczną metalofarmaceutyków.^{90, 91} Termin chemia biometaloorganiczna został po raz pierwszy użyty w 1985 roku w pracy profesora G. Jaouena⁹² i odnosi się do kompleksów tworzonych przy użyciu klasycznych ligandów metaloorganicznych oraz biomolekuł (steroidy, aminokwasy, cukry, peptydy, DNA, witaminy, enzymy, przeciwciała), połączonych z centrum metalicznym. Kompleksy te odgrywają istotną rolę w procesach biologicznych.

W 1996 roku w grupie naukowej Jaouena opisana pochodna ferrocenu wykazująca aktywność biologiczną względem dwóch linii komórkowych nowotworu piersi - MCF-7 i MDA-MB-231.⁹³ Metaloorganiczny analog chemioterapeutyku - tamoksifenu, wykazywał silne działanie antyproliferacyjne. Ponadto, linia komórek nowotworu piersi

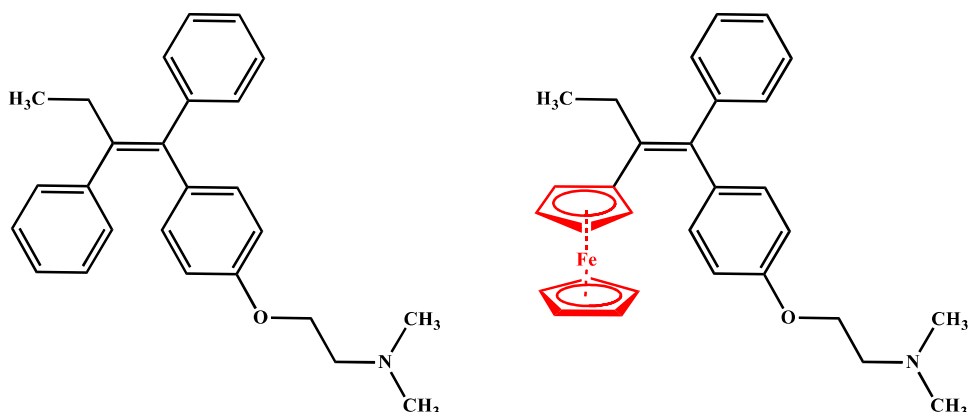
⁹⁰ M. Fanelli, M. Formica, V. Fusi, L. Giorgi, M. Micheloni, P. Paoli, *New trends in platinum and palladium complexes as antineoplastic agents*, *Coord. Chem. Rev.*, **2016**, 310, 41–79

⁹¹ B. J. Pages, K. B. Garbutcheon-Singh, J. R. Aldrich-Wright, *Platinum intercalators of DNA as anticancer agents*, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2017**, 1613–1624

⁹² S. Top, G. Jaouen, A. Vessières, J. Abjean, D. Davoust, C. A. Rodger, B. G. Sayer, M. J. McGlinchey, *Chromium tricarbonyl complexes of estradiol derivatives: differentiation of α- and β-diastereoisomers using 1- and 2-dimensional NMR spectroscopy at 500 MHz*, *Organometallics*, **1985**, 4, 2143–2150

⁹³ S. Top, J. Tang, A. Vessières, D. Carrez, C. Provot, G. Jaouen, *Ferrocenyl hydroxytamoxifen: a prototype for a new range of oestradiol receptor site-directed cytotoxics*, *Chem. Commun.*, **1996**, 0, 955-956

MDA-MB-231, która jest niewrażliwa na działanie tamoksifenu, okazała się być podatna na działanie ferrocenyłowej pochodnej terapeutyku (Rysunek 14).^{94, 95}



Rysunek 14. Struktura tamoksifenu i ferrocifenu

Duża trwałość rutenu i jego kompleksów wyróżniają go wśród innych metali. Ruten może przyjmować stopnie utlenienia od +II do +IV, a procesy redoks mogą zachodzić w warunkach fizjologicznych. Ponadto, ubogie w tlen środowisko komórki nowotworowej promuje procesy redukcyjne z +III do +II stopnia utlenienia, co przekłada się na wzrost aktywności kompleksu oraz jego interakcji w komórce nowotworowej. Nie dziwi zatem, że kompleksy rutenu wykazują często aktywność przeciwnowotworową, a ich dodatkową zaletą jest niska cytotoksyczność wobec komórek prawidłowych dzięki czemu związki tj. NAMI-A, KP1019 oraz jego sól sodowa KP1339 (Rysunek 15) zostały zakwalifikowane do badań klinicznych.^{96, 97, 98}

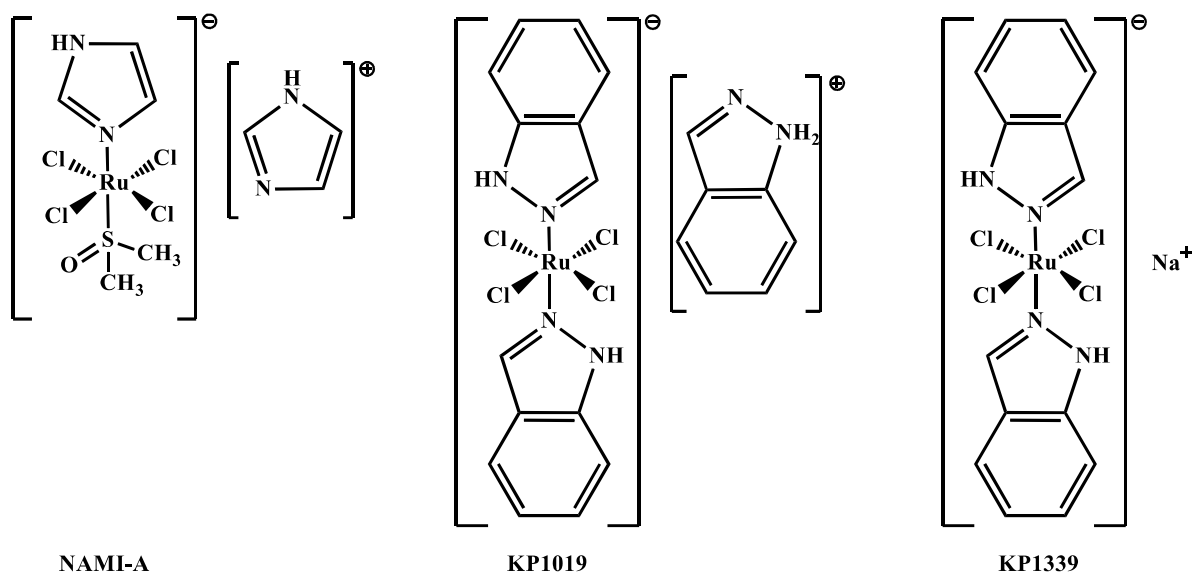
⁹⁴ E. Hillard, A. Vessieres, L. Thouin, G. Jaouen, C. Amatore, *Ferrocene-mediated proton-coupled electron transfer in a series of ferrocenyl-type breast-cancer drug candidates*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 285-290

⁹⁵ A. Vessieres, C. Corbet, J. M. Heldt, N. Lories, N. Jouy, I. Laios, G. Leclercq, G. Jaouen, R. A. Toillon, *A ferrocenyl derivative of hydroxytamoxifen elicits an estrogen receptor-independent mechanism of action in breast cancer cell lines*, *J. Inorg. Biochem.*, **2010**, 104, 503-511

⁹⁶ M. Juszczak, M. Kluska, D. Wysokiński, K. Woźniak, *Anti-cancer properties of ruthenium compounds: NAMI-A and KP1019*, *Postepy Hig. Med. Dosw. (online)*, **2020**, 74, 12-19

⁹⁷ Q. Sun, Y. Li, H. Shi, Y. Wang, J. Zhang, Q. Zhang, *Ruthenium Complexes as Promising Candidates against Lung Cancer*, *Molecules*, **2021**, 26, 4389

⁹⁸ S. Katheria, *Ruthenium Complexes as Potential Cancer Cell Growth Inhibitors for Targeted Chemotherapy*, *ChemistrySelect.*, **2022**, 7

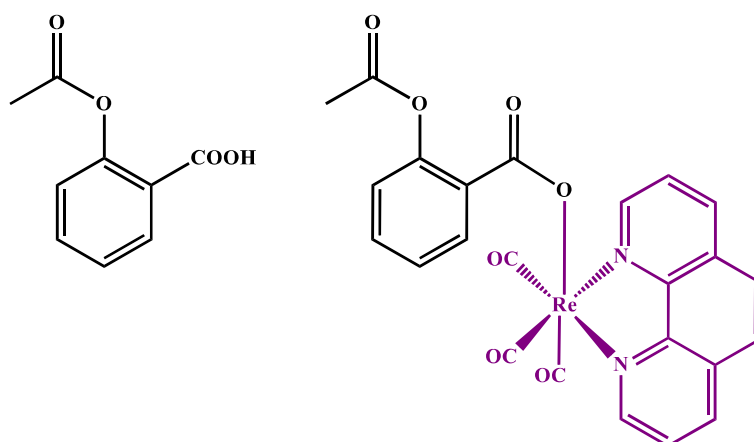


Rysunek 15. Pochodne rutenu wykazujące działanie przeciwnowotworowe zakwalifikowane do badań klinicznych

Zmodyfikowanie struktury dostępnych leków poprzez wprowadzenie atomów metali, np. żelaza, rutenu czy renu, w wielu przypadkach prowadzi do uzyskania metaloterapeutyków. Obecność atomów metali w strukturze może zwiększyć aktywność danego leku oraz znacząco wpłynąć na właściwości fizykochemiczne cząsteczki.

Bardzo ciekawym przykładem metaloterapeutyku jest renowa pochodna dobrze znanego leku - aspiryny. Kompleks aspiryny z renem (I) i fenantroliną (Rysunek 16) został początkowo przebadany pod kątem aktywności przeciwbakteryjnej, natomiast ze względu na niewystarczającą rozpuszczalność, badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej były utrudnione. Badania aktywności przeciwnowotworowej kompleksu renowego z kwasem acetylosalicylowym na ludzkich komórkach nowotworowych HeLa wykazały, że jest on kompleksem aktywnym względem komórek. Dodatkowo ciekawą właściwością opisanego metaloterapeutyku było wykazywanie pomarańczowej fosforescencji.⁹⁹

⁹⁹ J. Skiba, A. Kowalczyk, P. Stączek, T. Bernaś, D. Trzybiński, K. Woźniak, U. Schatzschneider, R. Czerwieniec, K. Kowalski, *Luminescent fac-[Re(CO)3(phen)] carboxylato complexes with novel luminescent properties: A structure–property relationship study*, *New J. Chem.*, **2019**, 43, 573–583



Rysunek 16. Struktura aspiryny i jej metaloorganicznej pochodnej

Żelazo odgrywa kluczową rolę w procesach biologicznych i fizjologicznych, odpowiada m. in. za transport tlenu, wspiera układ odpornościowy i nerwowy, bierze udział w detoksykacji komórek i jest niezbędne do syntezy DNA.¹⁰⁰ Istnieją związki chelatujące żelazo, które zostały zidentyfikowane jako inhibitory reduktazy rybonukleotydowej (RNR) - enzymu kluczowego niezbędnego podczas syntezy i naprawy DNA. Ponadto, wiele badań wykazało, że związki chelatujące żelazo mogą skutecznie ograniczać jego dostępność w procesach transportu i metabolizmu komórkowego, co prowadzi do zahamowania wzrostu komórek nowotworowych.¹⁰¹

Kompleksy metaloorganiczne żelaza, w tym pochodne ferrocenu często wykazują aktywność przeciwnowotworową. Przykładem może być, kompleks ferroceno-benzoimidazolowy wykazuje silną cytotoksyczność wobec komórek raka płuc i ma podobne działanie na receptor EGFR jak znany chemoterapeutyk - erlotynib.¹⁰² Innym przykładem jest chalconowa pochodna ferrocenu, która wykazała szerokie spektrum działania przeciwko różnym liniom komórek nowotworowych (Jurkat, HeLa, MCF-7, A549 i MDA), co czyni ją obiecującym kandydatem w dalszych badaniach klinicznych.¹⁰³ Kolejnym przykładem jest heterocykliczny kompleks ferrocenylofenolowy zawierający ugrupowanie sukcyminidowe.

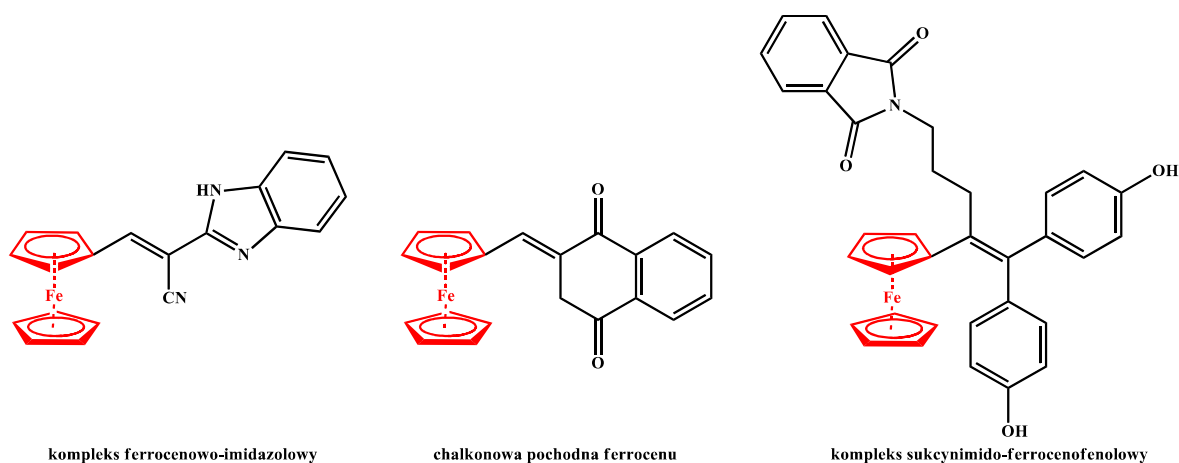
¹⁰⁰ G. Gao, J. Li, Y. Zhang, Y. Chang, *Cellular Iron Metabolism and Regulation*, Adv. Exp. Med. Biol., **2019**, 1173, 21-32

¹⁰¹ P.P. Arun et al., *Exploring Metal Complexes for Cancer Treatment: Mechanistic Insights and Therapeutic Potential*, J. Organomet. Chem., **2025**, 1035, 123682

¹⁰² B. A. Babgi, M. H. Abdellattif, M. A. Hussien, N. E. Eltayeb, *Exploring DNA-Binding and anticancer properties of benzoimidazolyl-ferrocene dye*, J. Mol. Struct., **2019**, 1198, 126918

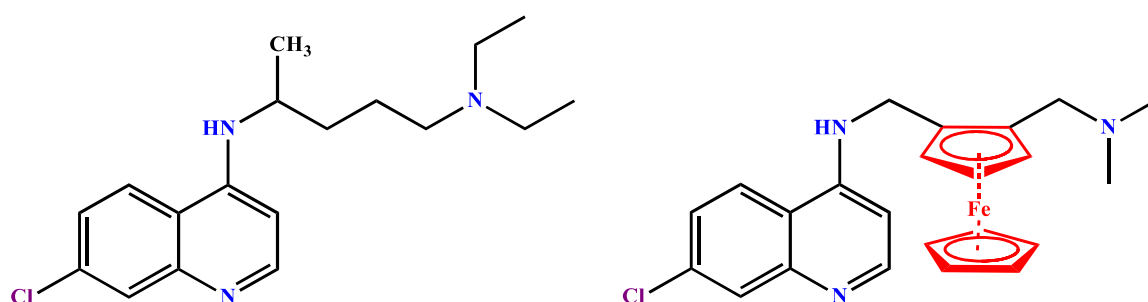
¹⁰³ V. Janka, D. Zlatko, V. Ladislav, P. Pal, P. Janka, M. Gabriela, *Some ferrocenyl chalcones as useful candidates for cancer treatment*, Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim., **2015**, 51, 964-974

Kompleks ten wykazuje silną aktywność wobec komórek raka jajnika opornych na cisplatinę.¹⁰⁴ Struktury wyżej opisanych kompleksów zostały przedstawione na Rysunku 17.



Rysunek 17. Przykładowe kompleksy żelaza wykazujące aktywność przeciwnowotworową

Metaloterapeutyki zawierające w swej strukturze atom żelaza znajdują zastosowanie jako leki przeciw pasożytnicze. Takim przykładem jest np. ferrochina (pochodna chlorochiny) stosowana jako lek przeciwmalaryczny (Rysunek 18).¹⁰⁵



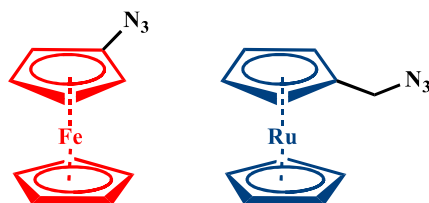
Rysunek 18. Struktura chlorochiny i ferrochiny

Na przestrzeni lat zsyntezowano kompleksy metaloorganiczne zawierające grupę azydkową, która została użyta w reakcjach sprzęgania typu CuAAC (cykloaddycji azydkowo-alkinowej katalizowanej Cu (I)) z biopolimerami. Pierwszym przykładem takiego zastosowania było użycie pochodnej ferrocenu w reakcji z biologicznie czynnym peptydem enkefaliną - neuropeptydem wiążącym się z receptorami opioidowymi, zaangażowanym w działanie

¹⁰⁴ P. Pigeon, Y. Wang, S. Top, F. Najlaoui, M.C. Garcia Alvarez, J. Bignon, M. J. McGlinchey, G. Jaouen, *A New Series of Succinimido-ferrociphenols and Related Heterocyclic Species Induce Strong Antiproliferative Effects, Especially against Ovarian Cancer Cells Resistant to Cisplatin*, *J. Med. Chem.*, **2017**, 60, 8358–8368

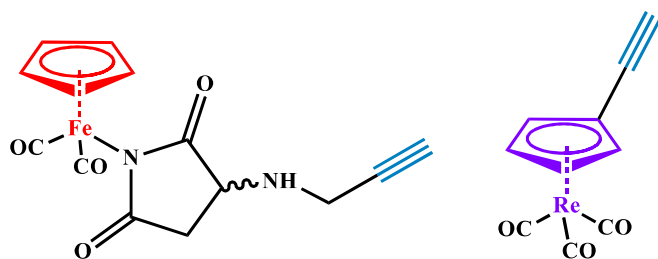
¹⁰⁵ F. L. Eyase, H. M. Akala, J. D. Johnson, D. S. Walsh, *Inhibitory Activity of Ferroquine, versus Chloroquine, against western Kenya Plasmodium falciparum Field Isolates Determined by a SYBR Green I In Vitro Assay*, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **2011**, 85(6), 984–988

przeciwbólne oraz procesy związane ze stresem. Kolejnym użytym do bioznakowania enkefaliną związkami były rutenowy analog ferrocenu (Rysunek 19).⁶⁶



Rysunek 19. Azydkowe pochodne ferrocenu i rutenocenu stosowane do znakowania peptydów

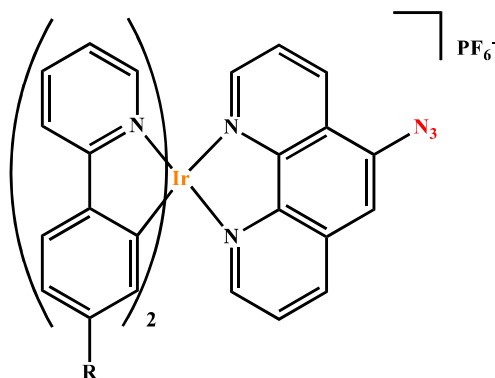
Bardzo ciekawym aspektem dotyczącym kompleksów metaloorganicznych jest możliwość ich zastosowania do bioobrazowania. W literaturze opisano kilka przykładów reakcji CuAAC kompleksów metaloorganicznych z białkami. Dwa z nich (kompleks żelaza oraz rutenu - Rysunek 20) miały na celu wprowadzenie fragmentu karbonylowego do białka, aby wykorzystać silne właściwości absorpcyjnych ligandów -CO w zakresie średniej podczerwieni (obejmującym pasma w zakresie 1800-2150 cm⁻¹). Obecność ligandów -CO umożliwia ich łatwą detekcję na drodze spektroskopii w podczerwieni cechującej się nieinwazyjnością dla biomolekuł i dużą czułością.⁹³



Rysunek 20. Przykładowe kompleksy żelaza i rutenu wykorzystywane do bioobrazowania

Natomiast, kompleksy irydu (III) (Rysunek 21) znajdują szerokie zastosowanie jako sondy do bioobrazowania ze względu na ciekawe właściwości fotofizyczne. Jednakże możliwość ich praktycznego zastosowania znacząco ogranicza słaba przenikalność do komórek oraz wysoka cytotoksyczność.¹⁰⁶

¹⁰⁶ S. Jing, X. Wu, D. S-H. Chan, S-C. Nao, J. Du, C-Y. Wong, J. Wang, C-H. Leung, W. Wang, *Luminescent iridium(III)-peptide bioconjugates for bioanalytical and biomedical applications*, Inorg. Chem. Front., **2024**, 11, 3400–3417



Rysunek 21. Przykładowy kompleks irydu (III) wykorzystywany do bioobrazowania

4.2.1. Żelazowe kompleksy metalokarbonylowe

W Katedrze Chemii Organicznej (KChO) Uniwersytetu Łódzkiego od wielu lat prowadzone są badania związane z syntezą półsandwichowych kompleksów metaloorganicznych metali przejściowych. Kompleksy te w swej strukturze zawierają atomy różnych metali tj. żelazo, molibden, wolfram i ruten, do których przyłączone są ligandy η^5 -cyklopentadienylowe (Cp), ligandy karbonylowe (-CO) oraz ligandy η^1 -*N*-imidato. Kompleksy te różnią się od siebie strukturą, reaktywnością chemiczną oraz charakteryzują się różnym potencjałem aplikacyjnym.

Obecność ligandów karbonylkowych w kompleksach umożliwia łatwą detekcję na drodze spektroskopii w podczerwieni (FT-IR). Obecność -CO wiąże się z występowaniem w widmie charakterystycznych, intensywnych pasm absorpcji w zakresie 1800-2150 cm^{-1} . Warto wspomnieć, że ogromną zaletą użycia spektroskopii IR jest jej wysoka czułość. Wykrywanie ligandów -CO możliwe jest nawet przy bardzo niewielkich stężeniach - mniejszych niż 10^{-9} mol/l.¹⁰⁷ Ponadto, zakres ten jest zazwyczaj wolny od absorpcji biomolekuł, które nie absorbują w tym obszarze (w tym obszarze absorbują jedynie ugrupowania $\text{C}\equiv\text{N}$). Dodatkowo, pasma pochodzące od grup karbonylkowych są 8-10 razy bardziej intensywne niż jakiegokolwiek inne pasma absorpcyjne widoczne w widmach IR. Zjawisko to przyczyniło się do powstania terminu CMIA (ang. *Carbonyl Metallo Immuno Assays*)¹⁰⁸, który jest formą testu immunologicznego

¹⁰⁷ V. Bhatt, *Chapter 8 – Metal Carbonyls, Essentials of Coordination Chemistry*, Elsevier, 2016

¹⁰⁸ N. Fischer-Durand, M. Salmain, B. Rudolf B., L. Jugé, V. Guérineau, O. Laprèvote, A. Vessières, G. Jaouen, *Design of a new multifunctionalized PAMAM dendrimer with hydrazide-terminated spacer arm suitable for metal-carbonyl multilabeling of aldehyde-containing molecules*, *Macromolecules*, 2007, 40, 8568-8575

umożliwiającego znakowanie leków przeciwpadaczkowych^{109, 110 111} czy hormonów, np. kortyzolu przy pomocy spektroskopii IR.¹¹²

Warto też wspomnieć o potencjale terapeutycznym tlenku węgla (CO). Najlepszym sposobem na kontrolowane i bezpieczne dostarczanie tlenku węgla do organizmu ludzkiego jest zastosowanie tzw. CORMs (*Carbon Monoxide Releasing Molecules*) - cząsteczek, które uwalniają określone ilości tlenku węgla w odpowiedzi na specyficzny bodziec. Jedną z najbardziej obiecujących metod - uwalniania CO z kompleksów metalokarbonylowych jest fotoaktywacja. Fotochemiczne uwalnianie tlenku węgla umożliwia kontrolę nad miejscem, czasem i dawką CO dostarczaną do tkanki docelowej. Obecnie opracowano wiele nowych nośników opartych na kompleksach metali uwalniających tlenek węgla. Przeprowadzone dotychczas badania wskazują na skuteczność tych kompleksów w leczeniu różnych stanów patologicznych, takich jak zakażenia bakteryjne, procesy zapalne, stres oksydacyjny, choroby nowotworowe, gdzie odnotowano wiele obiecujących wyników.^{113, 114, 115}

Żelazo dzięki swojej zdolności do przenoszenia elektronów i zmiany stopnia utlenienia jest jednym z najważniejszych niezbędnych mikroelementów dla organizmu ludzkiego i pełni kluczową rolę w wielu procesach biochemicznych takich jak transport tlenu, replikacja DNA oraz różnorodne reakcje redoks. Ponadto, kompleksy żelaza stanowią niezbędne centra katalityczne w wielu enzymach redoks.¹¹⁶

Żelazowy kompleks metaloorganiczny CpFe(CO)₂(η¹-maleimidato) - **FpM** zawiera jednocześnie w swej strukturze: ligand η¹-*N*-maleimidato, ligand η⁵-cyklopentadienylowy (Cp) oraz dwa ligandy karbonylkowe (-CO). Jest on bardzo ciekawym substratem, który można

¹⁰⁹ A. Varenne, A. Vessières, P. Brossier, G. Jaouen, *Application of the non-radioisotopic carbonyl metalloimmunoassay (CMLA) to diphenylhydantoin*, Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol, **1994**, 84, 81-94

¹¹⁰ A. Varenne, A. Vessières, M. Salmain, P. Brossier, G. Jaouen, *Production of specific antibodies and development of a non-isotopic immunoassay for carbamazepine by the carbonyl metallo-immunoassay (CMLA) method*, J. Immunol. Methods, **1995**, 186, 195-204

¹¹¹ A. Vessières, K. Kowalski, J. Zakrzewski, A. Stepien, M. Grabowski, G. Jaouen, *Synthesis of CpFe(CO)(L) complexes of hydantoin anions (Cp = η⁵-C₅H₅, L = CO, PPh₃), and the use of the 5,5-diphenylhydantoin anion complexes as tracers in the nonisotopic immunoassay CMLA of this antiepileptic drug*, Bioconjugate Chem., **1999**, 10, 379-385

¹¹² V. Philomin, A. Vessières, G. Jaouen, *New applications of carbonylmetalloimmunoassay (CMLA): a non-radioisotopic approach to cortisol assay*, J. Immunol. Methods, **1994**, 171, 201-210

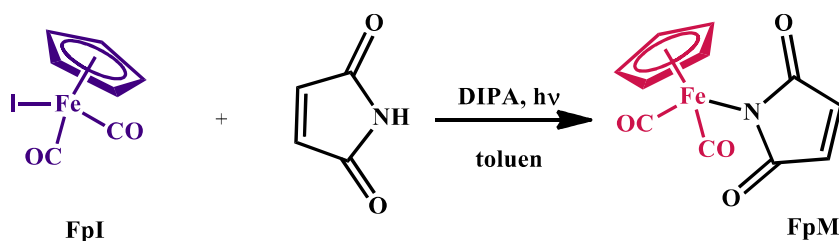
¹¹³ A. Kubicka, E. Parfieniuk, E. Fornal, M. Palusiak, D. Lizińska, A. Gumieniczek and B. Rudolf, *Metallo carbonyl complexes: (η⁵-C₅H₅)M(CO)_n(η¹-N-imidato) (M = Fe, Ru, Mo, W; n = 2, 3) as new photoactive CO-releasing molecules (CORMs)*, J. Photochem. Photobiol., A, **2018**, 351, 115-123

¹¹⁴ D. Wysokiński, P. Lewandowska, D. Zątak, M. Juszczak, M. Kluska, D. Lizińska, B. Rudolf, K. Woźniak, *Photoactive CO-releasing complexes containing iron – genotoxicity and ability in HO-1 gene induction in HL-60 cells*, Toxicol. Res., **2019**, 8, 544

¹¹⁵ M. A. Wright, J. A. Wright, *PhotoCORMs: CO release moves into the visible*, Dalton Trans., **2016**, 45, 6801-6811

¹¹⁶ S-S. Xue, Y. Pan, W. Pan, S. Liu, N. Li, B. Tang, *Bioimaging agents based on redox-active transition metal complexes*, Chem. Sci., **2022**, 13, 9468-9484

modyfikować w celu otrzymania produktów metaloorganicznych o pożądanych właściwościach i potencjale aplikacyjnym. **FpM** otrzymuje się na drodze fotochemicznej reakcji $\text{CpFe}(\text{CO})_2\text{I}$ (**FpI**) z maleimidem w obecności diizopropylaminy (DIPA) (Schemat 16).



Schemat 16. Synteza $\text{CpFe}(\text{CO})_2(\eta^1\text{-maleimidato})$ - **FpM**

Obecność ligandu $\eta^1\text{-N}$ -maleimidato sprawia, że kompleksy tego typu łatwo ulegają reakcjom Michaela z odczynnikami nukleofilowymi. Reakcje Michaela należą do grupy ważnych, często wykorzystywanych metod tworzenia nowego wiązania typu węgiel-węgiel oraz węgiel-heteroatom.^{110, 117} Oprócz różnych wariantów reakcji Michaela, kompleksy zawierające w strukturze cząsteczkę maleimidu mogą ulegać reakcjom cykloaddycji [4+2] znanych w środowisku naukowym jako reakcje Dielsa-Aldera.

Ze względu na strukturę **FpM** istnieje wiele sposobów modyfikacji tego układu. Na Schemacie 17 zostały przedstawione najważniejsze przekształcenia kompleksu **FpM** na drodze reakcji addycji -oksa, -aza, -tio, -fosfa Michaela oraz Dielsa-Aldera opracowane w zespole Prof. Bogny Rudolf. Możliwa jest również wymiana ligandów -CO na inne, np. fosfinowe (PR_3) i fosforynowe ($\text{P}(\text{OR})_3$).^{108, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124}

¹¹⁷ A. Michael, *Base-promoted conjugate addition of carbon nucleophiles (donors) to activated unsaturated systems (acceptors)*, J. Prakt. Chem., **1887**, 35, 349

¹¹⁸ B. Rudolf, J. Zakrzewski, ($\eta^5\text{-cyclopentadienyl}$) $\text{Fe}(\text{CO})_2$ -complex of maleimide anion: An organometallic carbonyl probe for biomolecules containing HS groups, Tetrahedron Lett., **1994**, 35, 9611

¹¹⁹ B. Rudolf, J. Zakrzewski, *Addition of imidazoles and aminoacids to the ethylenic bond in ($\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5$) $\text{Fe}(\text{CO})_2(\eta^1\text{-N-maleimidato})$* , J. Organomet. Chem., **1996**, 522, 313-315

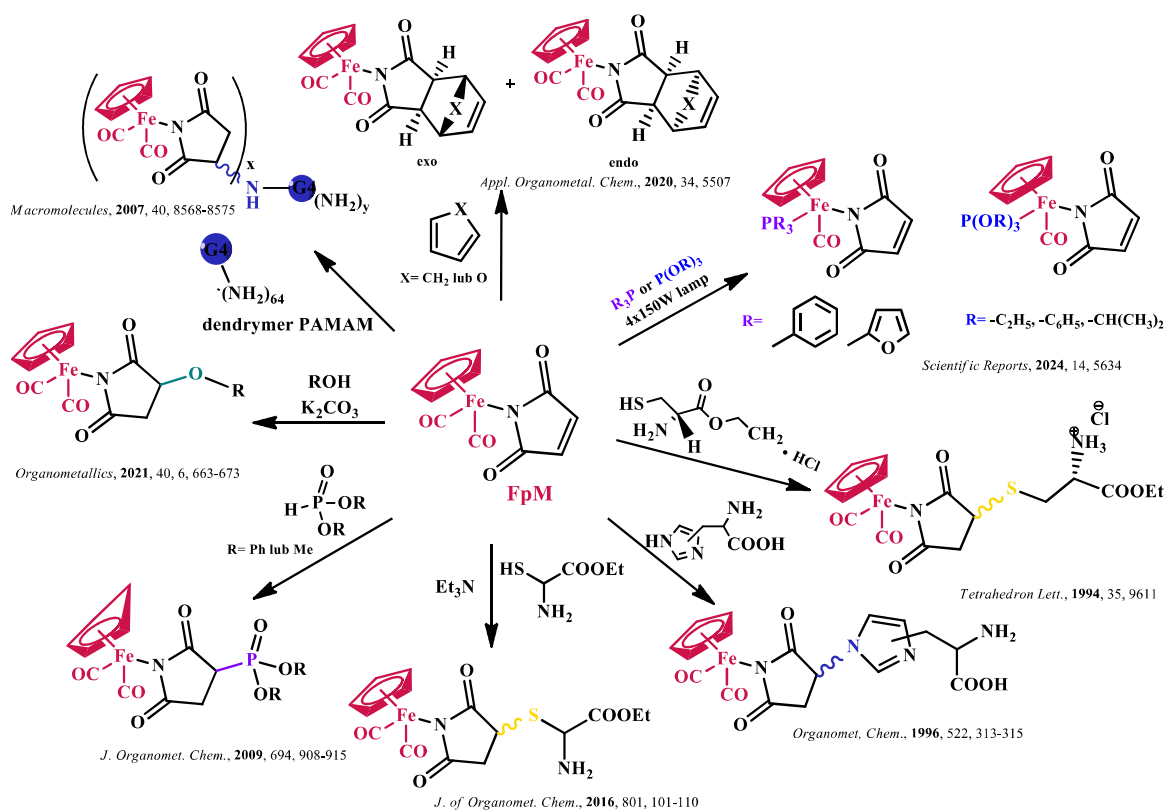
¹²⁰ B. Rudolf et al., *The phospho-Michael addition of dimethyl- and diphenylphosphites to the $\eta^1\text{-N-maleimidato}$ ligand: Inhibition of serine hydrolases by half-sandwich metallocarbonyl azaphosphonates*, J. Organomet. Chem., **2009**, 694, 908-915

¹²¹ B. Rudolf et al., *Synthesis and characterization of new $M(\text{II})$ carbonyl complexes ($M = \text{Fe}$ or Ru) including an $\eta^1\text{-N-maleimidato}$ ligand. Reactivity studies with biological thiols*, J. of Organomet. Chem., **2016**, 801, 101-110

¹²² D. Jamroz, N. Fischer-Durand, M. Palusiak, S. Wojtulewski, S. Jarzyński, M. Stępniewska, M. Salmain, B. Rudolf, *Inverse electron-demand Diels-Alder (iEDDA) bioorthogonal conjugation of half-sandwich transition metallocarbonyl entities to a model protein*, Appl. Organometal. Chem., **2020**, 34, 5507

¹²³ A. Kosińska, S. Wojtulewski, M. Palusiak, P. Tokarz, B. Rudolf, *A Useful Synthetic Route to N -Nonsubstituted Succinimides via Light-Induced Degradation of Metallocarbonyl Complexes*, Organometallics, **2021**, 40, 6, 663-673

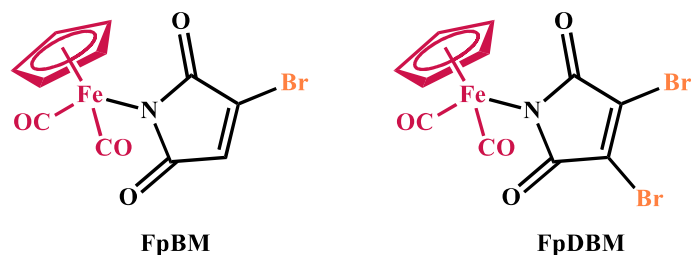
¹²⁴ S. Das, et al., *Synthesis, anticancer activity, and molecular docking of half-sandwich iron(II) cyclopentadienyl complexes with maleimide and phosphine or phosphite ligands*, Scientific Reports, **2024**, 14, 5634



Schemat 17. Modyfikacje kompleksu **FpM**

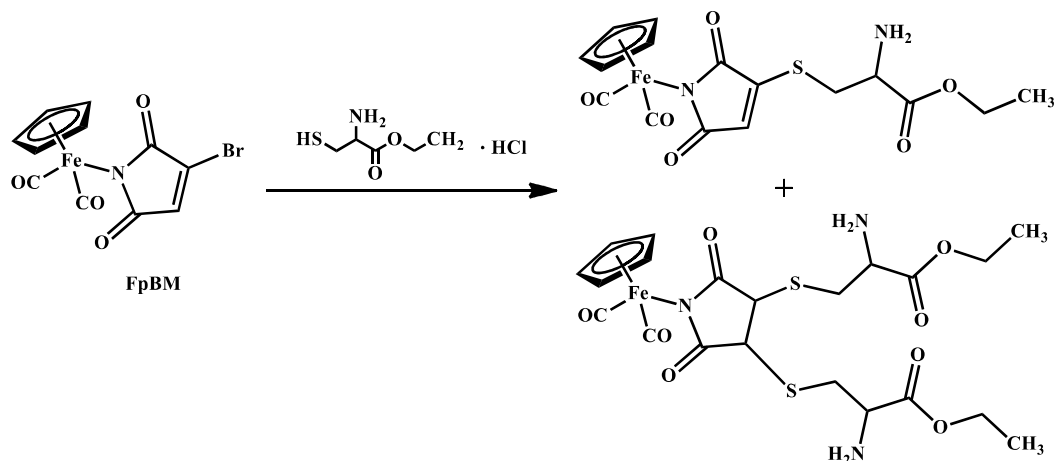
Zsyntezowano również metalokarbonyłowe pochodne bromomaleimidu (**BM**) oraz dibromomaleimidu (**DBM**). Wykazano, wówczas iż bromomaleimidy reagują selektywnie z grupami tiolowymi cysteiny, na drodze substytucji atomu bromu tworząc tiomaleimidy. Związki te mogą zostać następnie rozszczepione za pomocą TCEP w celu zregenerowania pochodnych cysteiny. Bromopochodne żelazowego kompleksu metaloorganicznego **FpM**: $\text{CpFe}(\text{CO})_2(\eta^1\text{-2-bromomaleimidato})$ - **FpBM** i $\text{CpFe}(\text{CO})_2(\eta^1\text{-2,3-dibromomaleimidato})$ - **FpDBM** (Rysunek 22), poddano reakcji z biomolekułami zawierającymi grupy tiolowe odpowiednio z estrem etylowym cysteiny w postaci chlorowodoru, glutationem oraz papainą - enzymem, który w swojej strukturze zawiera cysteinę. Atomy bromu na drodze reakcji substytucji zostały podstawione grupami tiolowymi cysteiny. Natomiast w przypadku nadmiaru tiolu zaobserwowano także reakcję addycji do wiązania podwójnego (Schemat 19).¹²⁵

¹²⁵ B. Rudolf, M. Salmain, E.Fornal, A.Rybarczyk-Pirek, Metallo carbonyl complexes of bromo- and dibromomaleimide: synthesis and biochemical application, *Appl. Organomet. Chem.*, **2012**, 26, 80–85



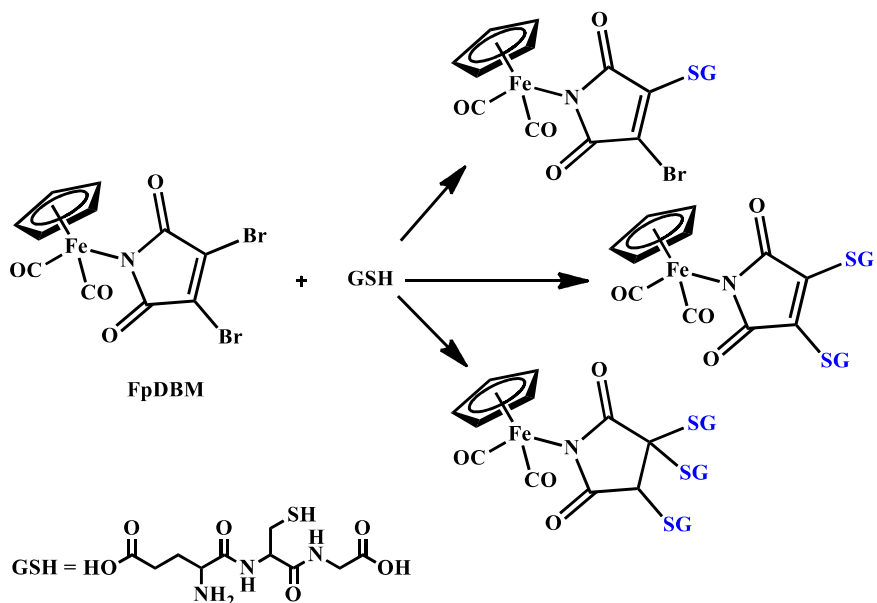
Rysunek 22. Struktury **FpBM** i **FpDBM**

W wyniku reakcji metalokarbonylowej pochodnej bromomaleimidu (**FpBM**) z chlorowodorkiem estru etylowego cysteiny zaobserwowano tworzenie się dwóch koniugatów - produktu reakcji substytucji atomu bromu atomem siarki oraz ditio pochodnej sukcyimidu, która powstaje w wyniku podstawienia atomu bromu atomem siarki, a następnie addycji cząsteczki cysteiny do wiązania podwójnego (Schemat 18).¹¹⁵



Schemat 18. Reakcja **FpBM** z chlorowodorkiem estru etylowego cysteiny

Natomiast na drodze reakcji metalokarbonylowej pochodnej dibromomaleimidu (**FpDBM**) z glutationem (**GSH**) zaobserwowano tworzenie się trzech koniugatów (Schemat 20). Na drodze tej reakcji powstają produkty mono- i dipodstawienia atomu bromu atomem siarki pochodzącej z cząsteczki glutationu. Powstaje również pochodna sukcyimidowa (dochodzi do substytucji dwóch atomów bromu atomami siarki, a następnie na drodze addycji do wiązania podwójnego przyłącza się trzecia cząsteczka glutationu) - Schemat 19.¹¹⁵



Schemat 19. Reakcja FpBM z glutationem

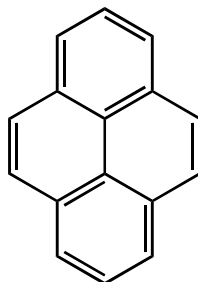
Związki metaloorganiczne stanowią bardzo istotną klasę związków organicznych, które znajdują zastosowanie zarówno w syntezie organicznej, a także jako związki o dużym potencjale terapeutycznym. Ponadto, ze względu na swoje unikatowe właściwości związane z ich budową (łatwa detekcja karbonylków metodami spektroskopii IR, właściwości fluorescencyjne w przypadku kompleksów irydu) znajdują zastosowanie aplikacyjne w bioobrazowaniu. Warto dodać, że w literaturze znajduje się wiele informacji dotyczących możliwości modyfikacji kompleksów metaloorganicznych co umożliwiła przemyślane projektowanie nowych cząsteczek o konkretnych właściwościach fizykochemicznych. Z tych powodów istotnym wydaje się projektowanie nowych kompleksów metaloorganicznych, które mogłyby znaleźć zastosowanie w terapiach przeciwnowotworowych, znakowaniu oraz bioobrazowaniu.

4.3. Pochodne pirenu

Ciekawą alternatywą dla znaczników izotopowych jest projektowanie fluoroforów organicznych, które mogą zostać użyte jako znaczniki bądź barwniki fluorescencyjne umożliwiające bioobrazowanie czy monitorowanie procesu leczenia. Zaletą tego typu związków jest możliwość detekcji łatwo dostępnymi, bezpiecznymi oraz bardzo czułymi metodami spektroskopowymi.

W ostatnich latach wykazano, że jednymi z bardziej obiecujących układów fluorescencyjnych mogących znaleźć zastosowanie biologiczne lub medyczne, są pochodne pirenu.

Piren (Rysunek 23) to wielopierścieniowy węglowodór aromatyczny składający się z czterech sprzężonych ze sobą pierścieni benzenowych.



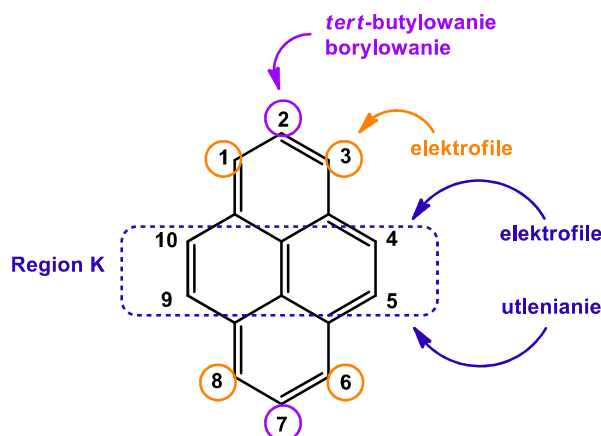
Piren

Rysunek 23. Struktura pirenu

Zarówno piren jak i jego pochodne wykazują interesujące właściwości fotofizyczne, w tym długie czasy życia fluorescencji, wysokie wydajności fluorescencji oraz fluorescencję zależną od środowiska otaczającego fluorofor. Dodatkowo, chemia pirenu jest tematyką dość dobrze poznaną, a w literaturze znajduje się wiele przykładów modyfikacji pirenu (Rysunek 24), co umożliwia przemyślane projektowanie nowych fluoroforów z jednoczesną możliwością kontrolowania koloru fluorescencji oraz innych właściwości fotofizycznych i dopasowania ich do konkretnych zastosowań.^{126, 127}

¹²⁶ T. M. Figueira-Duarte, K. Müllen, *Pyrene-based materials for organic electronics*, Chem. Rev., **2011**, 111, 7260–7314

¹²⁷ J. M. Casas-Solvas, J. D. Howgego, A. P. Davis, *Synthesis of substituted pyrenes by indirect methods*, Org. Biomol. Chem., **2014**, 12, 212–232



Rysunek 24. Możliwe modyfikacje układu pirenowego

Obecność czterech skondensowanych pierścieni aromatycznych w cząsteczce pirenu przekłada się na jego reaktywność chemiczną. Związek ten, podobnie jak inne węglowodory aromatyczne, ulega substytucji elektrofilowej. W reakcji pirenu z elektrofilami preferowane jest podstawienie w pozycjach o zwiększonej gęstości elektronowej, tj. 1, 3, 6, 8. Wyjątek stanowią reakcje alkilowania (*tert*-butylovanie i adamantylovanie) oraz borylowania prowadzące do produktów mono- i dipodstawienia w pozycjach 2 i 7. W przypadku pochodnych pirenu zawierających w pozycjach 2 i 7 duże objętościowo podstawniki reakcje z odczynnikami elektrofilowymi prowadzą do powstania produktów substytucji w obrębie regionu K. Przykładowo, acylovanie 2,7-ditert-butylpirenu zachodzi w pozycji 4. Innym przykładem reakcji zachodzących w obszarze K jest utlenianie. Ponadto, piren ulega reakcjom katalizowanym metalami przejściowymi oraz reakcjom cyklizacji prowadzącym do rozbudowy układu sprzężonych wiązań π . Duża ilość możliwych modyfikacji pozwala na wprowadzanie różnych grup funkcyjnych do układu pirenowego. Pozwala to na łatwe sterowanie barwą emisji uzyskanych fluoroforów oraz na projektowanie związków wykazujących określone właściwości luminescencyjne.¹²⁶

Właściwości fotofizyczne pochodnych pirenu przekładają się natomiast na możliwości aplikacyjne m.in. jako biomarkery, sondy środowiska, znaczniki luminescencyjne do bioobrazowania itp. Na szczególną uwagę zasługują pochodne karbonylowe, które wykazują fluorescencję zależną od środowiska, wynikającą z oddziaływania pomiędzy emisyjnymi stanami wzbudzonymi typu $\pi\pi^*$, a nieemisyjnymi stanami $n\pi^*$.¹²⁸ Dodatkowo, ostatnie opublikowane dane eksperymentalne wykazują niską toksyczność pochodnych pirenu na

¹²⁸ A. Wrona-Piotrowicz et al., *Pyrene fluorophores bearing two carbonyl groups in 1,2-positions: Synthesis and photophysical properties of pyrene-1,2-dicarboximides and a pyrene-1,2-dicarboxamide*, J. Photochem. Photobiol. A Chem., **2016**, 330, 15-21

poziomie komórkowym. Szczególnie cenne pod względem aplikacyjnym są pochodne pirenu posiadające grupę karbonylową, tiokarbonylową czy estrową.⁴⁸

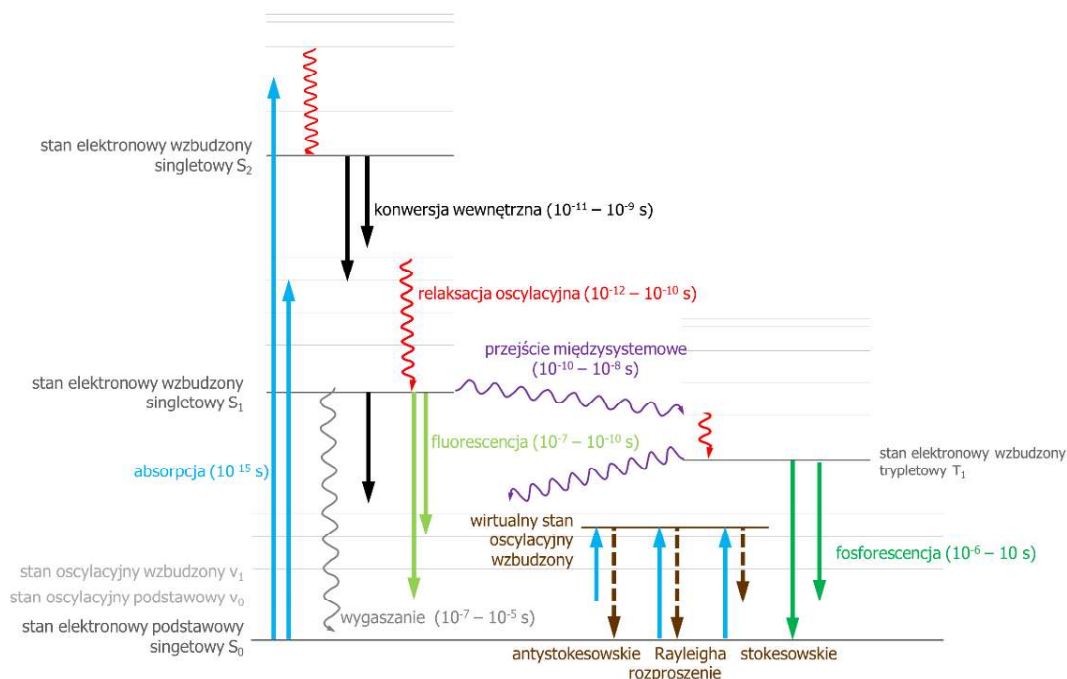
4.3.1. Zjawisko fluorescencji - informacje ogólne

Szczególnie istotne przy projektowaniu nowych fluoroforów jest poznanie podstawowych parametrów fotofizycznych składających się na właściwości luminescencyjne.

Luminescencja jest to zjawisko fizyczne, które polega na emisji promieniowania elektromagnetycznego przez cząsteczki w stanie wzbudzonym. Natężenie takiego promieniowania jest większe od natężenia promieniowania cieplnego w danej temperaturze.

W zależności od sposobu wzbudzania cząsteczki można wyróżnić kilka rodzajów luminescencji, np.: fotoluminescencję, chemiluminescencję, bioluminescencję czy termoluminescencję.

Fotoluminescencja jest efektem wzbudzenia cząsteczki na skutek absorpcji fotonu. W wyniku absorpcji fotonu dochodzi do przeniesienia elektronu z najniższego poziomu wibracyjnego elektronowego stanu podstawowego na pierwszy lub wyższy poziom wibracyjny elektronowego stanu wzbudzonego. Proces ten jest bardzo szybki ($\sim 10^{15}$ s) i przebiega bez zmiany położenia cięższych jąder atomowych (reguła Francka-Condon). Następnie wzbudzona cząsteczka dąży do powrotu do stanu równowagi i wyemitowania pochłoniętej energii, czemu mogą towarzyszyć różne procesy. Przejścia te ilustruje diagram Jabłońskiego (Rysunek 25).



Rysunek. 25. Diagram Jabłońskiego

(<https://epodreczniki.open.agh.edu.pl/handbook/37/module/976/reader>)

Jeżeli cząsteczka znajduje się w singletowym S_1 stanie elektronowym wzbudzonym to jej powrotowi do stanu podstawowego towarzyszy emisja promieniowania nazywana fluorescencją. Jest to przejście pomiędzy stanami o takiej samej multipletowości i jest ono dozwolone zgodnie z regułą zachowania spinu. Proces ten zachodzi z szybkością rzędu 10^8s^{-1} , a czas życia fluorescencji wynosi ok. 10 ns.^{129, 130}

W przypadku powrotu z trypletowego T_1 stanu elektronowego wzbudzonego zjawisko to nosi nazwę fosforescencji. Przejściu temu towarzyszy zmiana spinu i zgodnie z w/w teorią powinno być zabronione. Jest ono jednak możliwe, ale przebiega ze znacznie mniejszą szybkością (stała szybkości rzędu $10^3 - 10^0 \text{s}^{-1}$), a czas życia fosforescencji wynosi zazwyczaj od milisekundy do sekundy.¹²⁹

Zarówno absorpcja, fluorescencja i fosforescencja są procesami promienistymi. Oprócz nich mogą mieć miejsce procesy bezpromieniste takie jak konwersja wewnętrzna (ang. IC, Internal Conversion) oraz przejścia międzysystemowe (ang. ISC, InterSystem Crossing). Ponieważ szybkość bezpromienistej dezaktywacji jest znacznie większa od szybkości przejść

¹²⁹ J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Third Edition, Springer, Singapore 2006, ISBN-13: 978-0387-31278-1

¹³⁰ L. Sobczyk, A. Kisza, K. Gatner, A. Koll, *Eksperymentalna chemia fizyczna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1982, ISBN: 83-01-00390-1

promienistych to emisja pochodzi niemal w całości z najniższego poziomu wibracyjnego stanu wzbudzonego.

Widma emisji, będące wykresem intensywności fluorescencji w funkcji długości fali (nm) lub liczby falowej (cm^{-1}) są zazwyczaj niezależne od długości fali wzbudzenia. Najczęściej długość fali wzbudzenia odpowiada długofalowemu maksimum absorpcji. Różnica między maksimum absorpcji i emisji danego fluoroforu nosi nazwę przesunięcia Stokesa. Na jej wartość mają wpływ m.in.: zmiana geometrii cząsteczki następująca w wyniku relaksacji, różnica w wartości momentu dipolowego w stanie wzbudzonym i podstawowym oraz polarność rozpuszczalnika.¹²⁹

Parametrami, które charakteryzują właściwości fluoroforu są wydajność kwantowa fluorescencji oraz czas życia fluorescencji.

Wydajność kwantowa fluorescencji (Φ) to stosunek liczby wyemitowanych fotonów do liczby fotonów zaabsorbowanych przez substancję. Parametr ten jest kluczowy do zrozumienia procesów fotofizycznych, określa efektywność procesu emisji i wyrażany jest wzorem:

$$\Phi = \frac{\text{ilość wyemitowanych fotonów}}{\text{ilość zaabsorbowanych fotonów}}$$

Wydajność kwantowa fluorescencji jest bezpośrednio związana z procesami promienistymi (dochodzi do emisji fotonu podczas powrotu cząsteczki ze stanu wzbudzonego do stanu podstawowego) i bezpromienistymi (wygaszanie stanu wzbudzenia zachodzi bez emisji światła) - obejmuje relaksację oscylacyjną, konwersję wewnętrzną oraz przejścia międzystemowe, które zostały przedstawione na Rysunku 25. Wysoką wydajność kwantową fluorescencji obserwuje się, gdy zachodzi mało procesów bezpromienistych, a niska wydajność kwantowa fluorescencji wiąże się z dominacją procesów bezpromienistych.¹²⁹

Wydajność kwantową fluorescencji w roztworze można wyznaczyć na drodze metody bezpośredniej stosując sferę całkującą lub pośredniej - stosując metodę wzorca. Metoda wzorca polega na porównaniu intensywności fluorescencji badanej próbki z wzorcem o znanej wydajności kwantowej np. siarczanem chininy. Wydajność kwantową fluorescencji w ciele stałym wyznaczana jest jedynie przy użyciu metody bezpośredniej.

Kolejnym istotnym parametrem opisującym właściwości fotofizyczne cząsteczek wykazujących fluorescencję jest *czas życia fluorescencji* (τ). Jest to średni czas w jakim

fluorofor znajduje się w stanie wzbudzenia (na wyższym poziomie energetycznym), zanim powróci do stanu podstawowego, emitując foton.¹³¹

Po wzbudzeniu cząsteczki zachodzące procesy dezaktywacji (promieniste i bezpromieniste) prowadzą do zmniejszenia się ilości cząsteczek w stanie wzbudzonym. Czas życia fluorescencji jest odwrotnie proporcjonalny do sumy stałych szybkości zaniku fluorescencji, co można opisać wzorem:

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}}$$

gdzie: stała radiacyjna k_r (promienista) i nieradiacyjna k_{nr} (niepromienista) to współczynniki, określające sposób, w jaki wzbudzony układ traci energię. Stała radiacyjna opisuje emisję fotonu, podczas gdy stała nieradiacyjna dotyczy utraty energii przez ciepło lub przekaz energii.

Zanik fluorescencji ma charakter eksponentialny, a czas życia fluorescencji odpowiada czasowi, po którym liczba cząsteczek wzbudzonych spadnie do ok. 30%.

Pomiędzy czasem życia fluorescencji, a wydajnością kwantową fluorescencji istnieje zależność, którą wyrażają wzory:

$$k_r = \frac{\Phi}{\tau}$$

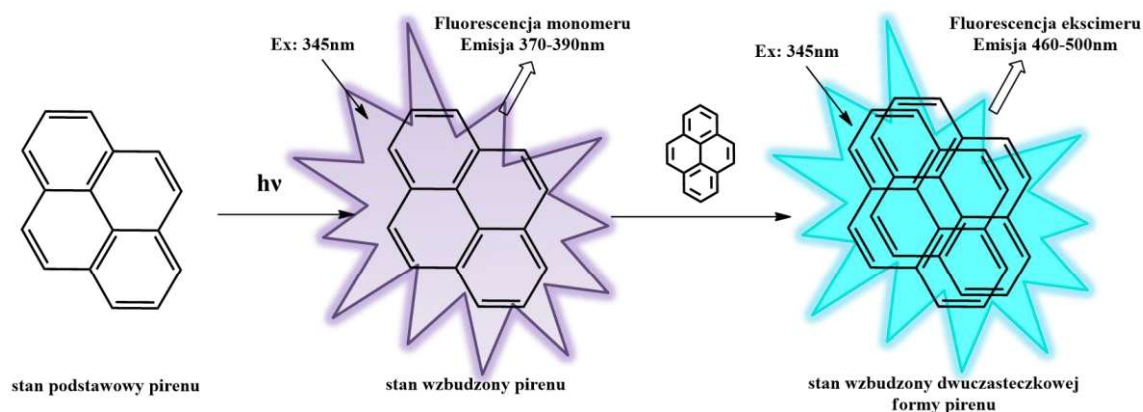
$$k_{nr} = \frac{(1 - \Phi)}{\tau}$$

Zależność ta pozwala także na wyznaczenie stałej radiacyjnej k_r i nieradiacyjnej k_{nr} .¹³²

¹³¹ P. Suppan, *Chemia i światło*, Wydawnictwo Naukowe PWN, 1997, ISBN 83-01-12375-3

4.3.2. Właściwości fluorescencyjne i zastosowanie pochodnych pirenu

Na właściwości luminescencyjne, a więc parametry opisane w poprzednim podrozdziale, duży wpływ ma struktura cząsteczki. W przypadku pochodnych pirenu często obserwuje się wygaszanie luminescencji na skutek agregacji cząsteczek spowodowane oddziaływaniami typu π - π układów pirenowych (π -stacking) - Schemat 20.¹³² Istnieje także zjawisko odwrotne t.j. wzmocnienie fluorescencji na skutek kontrolowanej częściowej agregacji, związanej np. z wprowadzeniem do układu pirenowego zatłoczonych podstawników w pozycjach 2 i 7.¹³³



Schemat 20. Emisja monomeru i ekscimeru

Pochodne pirenu są interesującymi związkami, które zastosowanie znajdują w wielu dziedzinach nauki i techniki, np.: w chemii materiałowej jako fluorofory o zastosowaniu aplikacyjnym do produkcji zaawansowanych materiałów optoelektronicznych takich jak: energooszczędne organiczne diody emitujące światło (OLEDs) i organiczne tranzystory polowe (OFETs) czy też stanowiące odnawialne źródła energii organiczne ogniwa fotowoltaiczne (OPVs), ale również w mikroskopii fluorescencyjnej oraz do projektowania i syntezy luminescencyjnych biomateriałów.^{126, 127}

Pochodne pirenu są wykorzystywane jako sondy środowiskowe wrażliwe na zmiany pH środowiska.¹³⁴ Pomiar pH w komórkach jest bardzo istotny, ponieważ nadmierne odchylenia pH w organizmie mogą powodować szereg chorób neurodegeneracyjnych. Wykazano, że

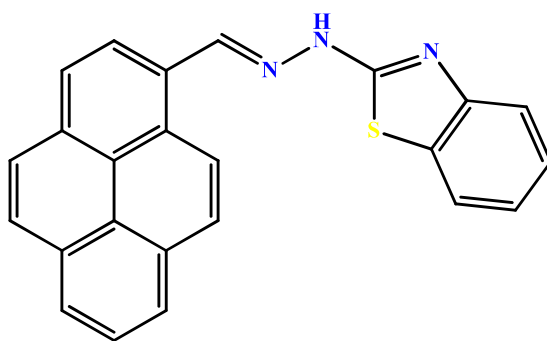
¹³² K. Zhang et al., *Theoretical Study of the Mechanism of Aggregation-Caused Quenching in Near-Infrared Thermally Activated Delayed Fluorescence Molecules: Hydrogen-Bond Effect*, J. Phys. Chem. C, **2019**, 123, 40, 24705–24713

¹³³ A. Wrona-Piotrowicz, A. Makal, J. Zakrzewski, *Triflic Acid-Promoted Adamantylation and tert-Butylation of Pyrene: Fluorescent Properties of Pyrene-Decorated Adamantanes and a Channeled Crystal Structure of 1,3,5-Tris(pyren-2-yl)adamantane*, J. Org. Chem., **2020**, 85, 17, 11134–11139

¹³⁴ P. L. Paris, J. M. Langenhan, E. T. Kool, *Probing DNA sequences in solution with a monomer-excimer fluorescence color change*, Nucleic Acids Res., **1998**, 26, 3789

zaburzenia związane z nieregularnym pH w cytoplazmie lub kwaśnych błonach komórkowych są przyczyną nowotworzenia się zdrowych komórek, choroby Alzheimera i mogą prowadzić do problemów z układem sercowo-płucnym oraz nerwowym.⁴⁸

W 2019 roku Chao i współpracownicy opisali fluorescencyjny znacznik oparty na pireninie, połączony z powszechnie stosowanym akceptorem elektronów - benzotiazolem (Rysunek 26). Pochodna ta wykazywała duże przesunięcie Stokesa (105 nm) oraz czułą odpowiedź pH (pochodna emitowała w zakresie pH od 4,70 do 3,16), umożliwiając nieinwazyjny pomiar w żywych komórkach. Stwierdzono, że związek ten może być wykorzystywany jako narzędzie wizualizacyjne w układach biologicznych do monitorowania zmian pH.¹³⁵



Rysunek 26. Pochodna pireniny wykorzystywana jako sensor pH w żywych komórkach

Metale przejściowe tj. żelazo, kobalt, miedź czy cynk są niezbędne dla systemu fizjologicznego. W ludzkim organizmie białka i enzymy zawierające te metale pełnią istotne funkcje m.in. uczestniczą w transporcie tlenu, reakcjach redox, magazynowaniu i transporcie żelaza itp. Z tych powodów poszukiwanie nowych czułych i selektywnych metod identyfikacji kationów metali jest bardzo pożądane. Obecnie projektowane są sondy fluorescencyjne na bazie pireniny umożliwiające detekcję kationów metali, takich jak na przykład Ag^+ ,¹³⁶ Au^{3+} ,¹³⁷ Pb^{2+} ,¹³⁸

¹³⁵ J. Chao, M. Li, Y. Zhang, C. Yin, F. Huo, *A simple fluorescent pH probe and its application in cells*, Chem. Pap., **2019**, 73, 1481–1488

¹³⁶ Y. Fujiwara, Y. Amao, *Optical oxygen sensor based on controlling the excimer formation of pyrene-1-butyl acid chemisorption layer onto nano-porous anodic oxidized aluminium plate by myristic acid*, Sens. Actuators B: Chem., **2003**, 89, 58-61

¹³⁷ S. I. Hazarika, B. Dolai and A. K. Atta, *Water compatible triazole linked pyrene-C1-glucosyl fluorescent sensor for Au³⁺ and living cell imaging studies*, J. Mol. Struct., **2020**, 1202, 127272

¹³⁸ C. C. Nagel, J. G. Bentsen, J. L. Dektar, et al. US Patent 1995, 5, 409, 666

Zn²⁺,^{139, 140} czy Hg²⁺.¹⁴¹ Układy te mogą zmieniać swoje właściwości fluorescencyjne pod wpływem kompleksowania kationów srebra, bądź reagować selektywnie z jonami ołowiu (II) obecnymi w roztworze.⁴⁸

Bardzo istotną zaletą metod fluorescencyjnych stanowiących ważne narzędzie w badaniach eksperymentalnych, jest możliwość precyzyjnej analizy mechanizmów molekularnych. Pozwalają one na prowadzenie pomiarów w czasie rzeczywistym, w środowisku roztworu, z wysoką rozdzielczością czasową i czułością sięgającą pojedynczych cząsteczek. Dzięki tym właściwościom możliwa jest dokładna charakterystyka oddziaływań typu białko-białko, aktywności enzymatycznej, zmian konformacyjnych, subkomórkowej lokalizacji białek oraz obserwacja dynamiki pojedynczych cząsteczek białkowych w czasie rzeczywistym.¹⁴²

Wewnątrzkomórkowe cząsteczki zawierające grupy tiolowe, takie jak cysteina (Cys), homocysteina (Hcys) oraz glutation (GSH), odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu struktur wyższego rzędu kontrolujących homeostazę redoks oraz funkcjonowanie białek. Nieprawidłowy poziom aminotiolu w płynach ustrojowych może prowadzić do rozwoju wielu chorób, w tym choroby Alzheimera, chorób układu sercowo-naczyniowego oraz zaburzeń hematopoezy. W 2019 roku została zaprojektowana i zsyntetyzowana fluorescencyjna sonda typu „turn-on” do wykrywania cysteiny (Cys) - Rysunek 27. W wyniku reakcji addycji Michaela układ π -sprzężony sondy ulega zniszczeniu na skutek ataku grupy -SH na wiązanie podwójne w α,β -nienasyconym układzie węgiel-węgiel, co prowadzi do zmiany emisji fluorescencji. Jednocześnie sonda charakteryzuje się wysoką selektywnością i czułością oraz niską granicą detekcji. Eksperymenty obrazowania fluorescencyjnego wykazały, że sonda ma duży potencjał do wykrywania cysteiny w organizmach.¹⁴³ Inny przykład fluorescencyjnego znakowania cysteiny pochodnymi pirenu został opisany w 2020 roku przez Sato i współpracowników. W swych badaniach opisali metodę fluorescencyjnego znakowania reszt cysteinowych w białkach i innych biomolekułach. Technika ta wykorzystuje sondę opartą na pirenie, która tworzy ekscimer (dimer) w przypadku bliskiego położenia dwóch oznakowanych

¹³⁹ P. Thirupathi and K. H. Lee, *A ratiometric fluorescent detection of Zn(II) in aqueous solutions using pyrene-appended histidine*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, 23, 6811–6815

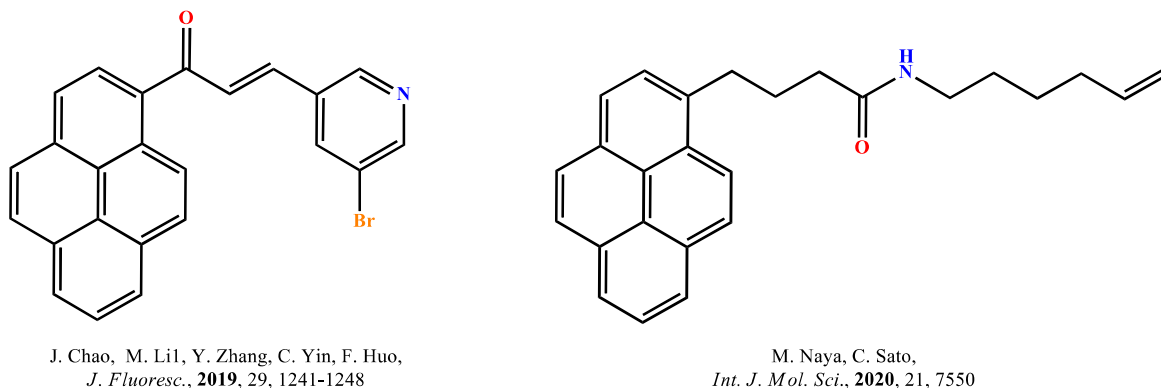
¹⁴⁰ Y. Upadhyay, T. Anand, L. T. Babu, P. Paira, G. Crisponi, S. K. Ashok Kumar, R. Kumar and S. K. Sahoo, *Three-in-one type fluorescent sensor based on a pyrene pyridoxal cascade for the selective detection of Zn(II), hydrogen phosphate and cysteine*, *Dalton Trans.*, **2018**, 47, 742–749

¹⁴¹ Y. Zhou, C. Y. Zhu, X. S. Gao, X. Y. You and C. Yao, *Hg²⁺-Selective Ratiometric and “Off-On” Chemosensor Based on the Azadiene-Pyrene Derivative*, *Org. Lett.*, **2010**, 12, 2566–2569

¹⁴² C. P. Toseland, *Fluorescent labeling and modification of proteins*, *J. Chem. Biol.*, **2013**, 6, 85–95

¹⁴³ J. Chao, M. Li, Y. Zhang, C. Yin, F. Huo, *A Fluorescent Probe Based on Pyrene Ring for Detecting Cys and its Application in Biology*, *J. Fluoresc.*, **2019**, 29, 1241–1248

grup pirenowych, co skutkuje batochromowym przesunięciem maksimum emisji. Autorzy przedstawili zupełnie nową metodę fluorescencyjnego znakowania z wykorzystaniem reakcji typu „click” do wolnych grup -SH. Sonda pirenowa (Rysunek 27) została zaprojektowana tak, aby specyficznym reagować z resztami cysteiny, przyłączając znacznik pirenowy do tych aminokwasów. Ta nowatorska metoda znakowania fluorescencyjnego ma potencjał do szerokiego zastosowania w różnych dziedzinach, w tym jako sonda fluorescencyjna do diagnostyki chorób.¹⁴⁴

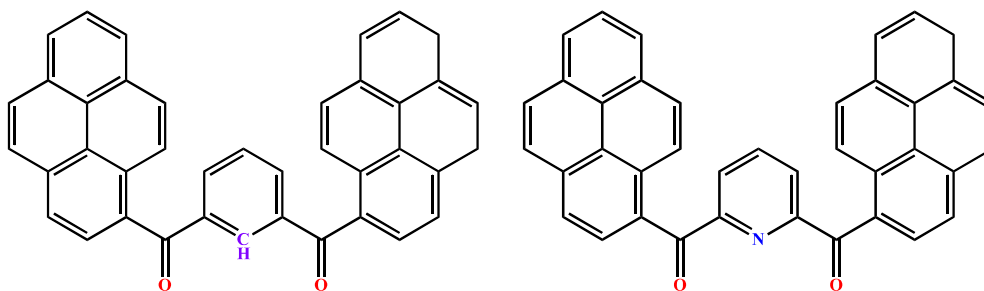


Rysunek 27. Pochodna pirenu wykorzystywana do znakowania cysteiny

Pochodne *bis*-pirenu (Rysunek 28) zostały przebadane pod kątem stosowania ich jako unikatowe sondy będące potencjalnymi sensorami do monitorowania pH w procesie endocytozy. Dwie pochodne *bis*-pirenu zostały wprowadzone do hydrofobowych miceli wrażliwych na pH, które następnie wprowadzono do lizosomów. W ostatnim etapie zachodzącym w środowisku kwaśnym lizosomów związki te uległy samoagregacji z jednoczesnym włączeniem fluorescencji. Proces ten został również powtórzony w żywych komórkach otrzymując podobny efekt jak w przypadku prób *in vitro*, co otwiera nową drogę dla wysoce czulej diagnostyki molekularnej.¹⁴⁵

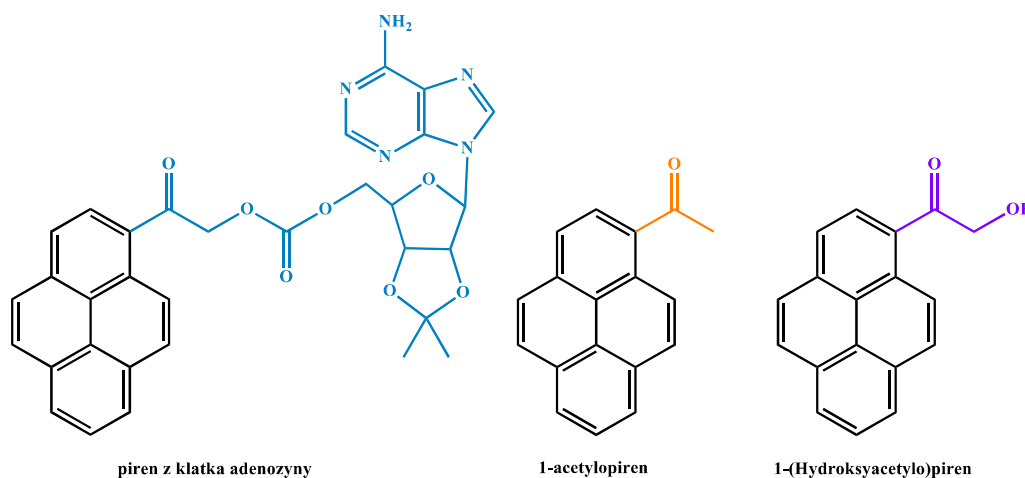
¹⁴⁴ M. Naya, C. Sato, *Pyrene Excimer-Based Fluorescent Labeling of Cysteines Brought into Close Proximity by Protein Dynamics: ASEM-Induced Thiol-Ene Click Reaction for High Spatial Resolution CLEM*, *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, 21, 7550

¹⁴⁵ Z. Duan, Y. J. Gao, Z. Qiao, S. Qiao, Y. Wang, C. Hou, L. Wang, H. Wang, *pH-Sensitive Polymer Assisted Self-Aggregation of Bis(pyrene) in Living Cells In Situ with Turn-On Fluorescence*, *Nanotechnology*, **2015**, 26, 355703



Rysunek 28. Bis-pireny stosowane do obrazowania lizosomów w środowisku kwaśnym

Kolejnym przykładem pochodnej pirenowej, która wykazała potencjał bioaplikacyjny jest 1-(hydroksyacetylo)piren - fluorescencyjny fotowyzwalacz, który został wprowadzony jako nowe narzędzie do obrazowania komórek i „klatkowania” alkoholi, fenoli i adenozy. Wychodząc z pirenu, do którego przyłączona była adenozy, pod wpływem promieniowania ultrafioletowego otrzymane zostały dwie pochodne - 1-(hydroksyacetylo)piren i 1-acetylopiren (Rysunek 29). W tym przypadku zaobserwowano ciekawe zjawisko polegające na uwalnianiu pochodnych pirenu po napromieniowaniu światłem UV, co czyni związek ten przydatnym do kontrolowanych reakcji biochemicznych w komórkach.¹⁴⁶

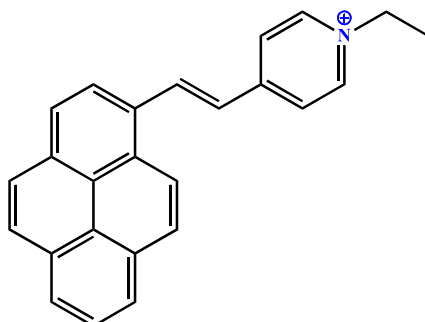


Rysunek 29. Pochodne pirenu stosowane do bioobrazowania

W 2019 roku barwnik pireno-pirydyniowy (Rysunek 30) został zbadany i opisany przez Abeywickrama i współpracowników pod kątem zastosowania w mikroskopii fluorescencyjnej - jako sonda fluorescencyjna do wizualizacji jąder komórkowych w żywych komórkach. Dzięki swoim właściwościom fotofizycznym t.j. dużym przesunięciom Stokesa, wysokim wydajnościom kwantowym fluorescencji, wysokiej selektywności oraz szybkiemu wzbudzeniu

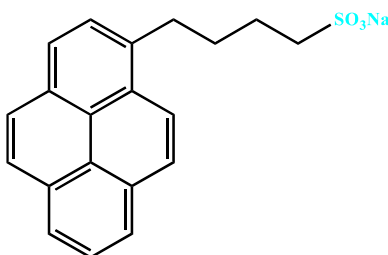
¹⁴⁶ A. Jana, B. Saha, M. Ikbal, S. K. Ghosh, N. D. P. Singh, *1-(Hydroxyacetyl)pyrene A New Fluorescent Phototrigger for Cell Imaging and Caging of Alcohols, Phenol and Adenosine*, Photochem. Photobiol. Sci., **2012**, 11, 1558–1566

przy długości fali lasera 488 nm. Pochodna ta może pełnić funkcję barwnika jąder komórkowych łatwego do detekcji przy użyciu mikroskopii konfokalnej.¹⁴⁷



Rysunek 30. Barwnik pireno-pirydyniowy stosowany do wizualizacji jąder komórkowych

Opracowano, także metodę wykrywania heparyny, polisacharydu odpowiedzialnego za rozrzedzanie krwi, przy użyciu czujnika opartego na rozpadzie ekscymerów pirenu. Metoda ta jest szybka, umożliwia wizualną detekcję w środowisku wodnym oraz charakteryzuje się wysoką czułością i selektywnością. Czujnik na bazie pirenu (Rysunek 31) cechuje się prostą metodą przygotowania, szybką odpowiedzią spektroskopową, niskim kosztem oraz wysoką czułością i selektywnością. Po dodaniu heparyny do roztworu sensora dochodzi do rozpadu ekscymerów pirenu, co powoduje spadek emisji ekscymerowej i jednoczesny wzrost emisji monomerów pirenu i zmiany w widmie fluorescencji. Metoda ta może być stosowana zarówno w roztworach buforowych, jak i w próbkach surowicy, co czyni ją potencjalnie użyteczną w zastosowaniach klinicznych.¹⁴⁸



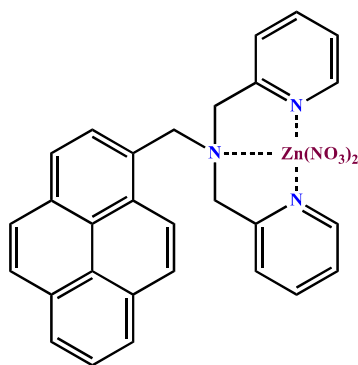
Rysunek 31. Pochodna pirenu stosowana do wykrywania heparyny

Innym przykładem bio użytecznych pochodnych pirenu jest kompleks z cynkiem (Rysunek 32) opracowany w zespole Zhu w 2016 roku, zaprojektowany jako związek modelowy do detekcji DNA. Związek ten wykazał dużą czułość w wykrywaniu krótkiego jednoniciowego

¹⁴⁷ C. S. Abeywickrama, K. J. Wijesinghe, C. B. Plescia, L. S. Fisher, T. Goodson, R. V. Stahelin and Y. Pang, *A pyrene-based two-photon excitable fluorescent probe to visualize nuclei in live cells*, Photochem. Photobiol. Sci., **2020**, 19, 1152–1159

¹⁴⁸ Y. Qiao, Z. Yao, W. Ge, L. Zhang, H.C. Wu, *Rapid and visual detection of heparin based on the disassembly of polyelectrolyte-induced pyrene excimers*, Org. Biomol. Chem., **2017**, 15, 2569-2574

DNA. Co istotne, obecność tlenu nie wygasza długotrwałej emisji fluorescencyjnej ekscymerów, co stanowi uniwersalną technikę do opracowywania długo świecących sond fluorescencyjnych do czasowo rozdzielczej detekcji (*Time-resolved luminescence*) w środowiskach i układach zawierających tlen.¹⁴⁹



Rysunek 32. Pochodna pirenu stosowana do wykrywania jednoniciowego DNA

W literaturze opisane zostały przykłady nukleozydów i analogów zasad nukleinowych zawierające podstawiony piren służących m.in. do monitorowania struktury DNA^{150,151,152} czy do biosensingu kwasów nukleinowych.¹⁵³

Bioobrazowanie opierające się na zjawisku fluorescencji w celu prostego i bezpośredniego rozpoznawania aminokwasów w czasie rzeczywistym jest bardzo pożądanym rozwiązaniem. Selektywne wykrywanie i ilościowe oznaczanie lizyny - niezbędnego aminokwasu, będącego ważnym składnikiem diety ludzi i zwierząt - jest istotne, ponieważ jej biodostępność zależy od wielu czynników. Do tej pory opracowano nieliczne fluorescencyjne sensory lizyny, oparte na zmianie intensywności emisji przy jednej długości fali, a jedyny znany sensor ratiometryczny nie potrafi odróżnić lizyny od argininy. W zespole badawczym Ghosha opracowano pochodną pirenu (Rysunek 33), która stanowi użyteczny ratiometryczny sensor fluorescencyjny, który selektywnie wykrywa lizynę w stężeniach nanomolowych. Związek ten został z powodzeniem

¹⁴⁹ Z. Zhu, W. Li, C. Yang, *Switching monomer/excimer ratiometric fluorescence to time-resolved excimer probe for DNA detection: A simple strategy to enhance the sensitivity*, *Sens. Actuators, B*, **2016**, 224, 31–36

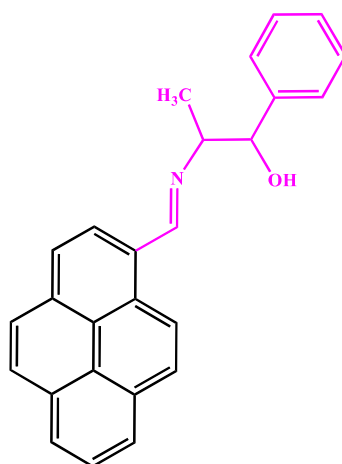
¹⁵⁰ T. Ono, S. Wang, C. Koo, L. Engstrom, S. S. David, E. T. Kool, *Direct Fluorescence Monitoring of DNA Base Excision Repair*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51, 1689–1692

¹⁵¹ B. R. Babu, J. Wengel, *Universal hybridization using LNA (locked nucleic acid) containing a novel pyrene LNA nucleotide monomer*, *Chem. Comm.*, **2001**, 20, 2114–2115

¹⁵² M. E. Østergaard, P. J. Hrdlicka, *Pyrene-functionalized oligonucleotides and locked nucleic acids (LNAs): Tools for fundamental research, diagnostics, and nanotechnology*, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40, 5771–5788

¹⁵³ Z. He, J. Wu, B. Qiao, H. Pei, Q. Xia, Q. Wu, H. Ju, *Target Catalyzed Assembly of Pyrene Labelled Hairpins for Exponentially Amplified Biosensing*, *ACS Appl. Bio Mater.*, **2020**, 3, 5342–5349

zastosowany jako sonda do obrazowania lizyny w komórkach ludzkiego raka piersi (MCF7) za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej.¹⁵⁴



Rysunek 33. Pochodna pirenu stosowana do obrazowania komórek nowotworowych raka piersi

Emisja indukowana agregacją (AIE, *aggregation-induced-emission*) to wyjątkowy temat badawczy i właściwość, która może prowadzić do szerokiego zakresu zastosowań, w tym obrazowania komórkowego, teranostyki, ilościowego oznaczania analitów i specyficznego wykrywania biologicznie ważnych gatunków. Luminofory wykazujące efekt AIE charakteryzują się zdolnością do emitowania fluorescencji z wysoką wydajnością, a ich kwantowa wydajność fluorescencji zwiększa się podczas agregacji lub krystalizacji. Takie związki są nieemisyjne lub słabo emisyjne w rozcieńczonych roztworach, ale emitują intensywnie po utworzeniu agregatów. W kierunku rozwoju materiałów aktywnych AIE opracowano wiele aromatycznych grup składających się z tetrafenyletylenu, antracenu, pirenu, itp. Piren dzięki płaskiej strukturze zawierającej cztery skondensowane pierścienie benzenowe, posiada niezwykłą cechę delokalizacji elektronów, która jest ważna we właściwości AIE. Opracowano liczne materiały aktywne AIE na bazie pirenu w kierunku zastosowań w zakresie wykrywania, obrazowania i teranostyki. Efektem przeciwnym do AIE jest wygaszanie emisji wywołane agregacją (ACQ, *aggregation-caused quenching*).^{48, 155} Pochodne pirenu wykazujące efekt AIE znalazły różne zastosowania, np. jako czujniki (sondy pirenowe wykazujące zjawisko AIE działają jako selektywne i czułe detektory jonów metali,

¹⁵⁴ A. Ghosh, A. Sengupta, A. Chattopadhyay, D. Das, *Lysine Triggered Ratiometric Conversion of Dynamic to Static Excimer of a Pyrene Derivative: Aggregation-Induced Emission, Nanomolar Detection and Human Breast Cancer Cell (MCF7) Imaging*, Chem. Commun., **2015**, 51, 11455–11458

¹⁵⁵ M. Shellaiah, K. W. Sun, *Pyrene-Based AIE Active Materials for Bioimaging and Theranostics Application*, Biosensors, **2022**, 12, 550

np. Cu^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} oraz jonów H^+ ¹⁵⁶, do bioobrazowania oraz w badaniach teranostycznych. ^{157, 158, 159}

Pochodne pirenu są powszechnie stosowanymi materiałami do produkcji biocujników ze względu na dużą trwałość chemiczną, wysoką wydajność kwantową fluorescencji, długie czas życia fluorescencji oraz fluorescencję zależną od środowiska. Wcześniej opisane pochodne pirenu znajdują zastosowanie jako sensory pH - jako sondy środowiskowe jak i sondy molekularne stosowane *in vivo*. Pochodne pirenu znajdują szerokie zastosowanie jako fluorescencyjne sensory do identyfikacji jonów metali oraz anionów. Jako sensory stanowią doskonałe wsparcie w analizie zanieczyszczeń wody, ocenie niedoborów/nadmiaru metali oraz w diagnostyce i leczeniu nowotworów. Wykrywanie toksycznych metali ciężkich przyczynia się do ochrony środowiska a także znajduje zastosowanie w śledzeniu zanieczyszczeń produktów żywnościowych i farmaceutycznych. Ponadto, w literaturze znajduje się wiele informacji o stosowaniu pochodnych pirenu jako sond temperaturowych, sond do detekcji gazów czy fotosensybilizatorów. Tak szeroką stosowalność pochodne pirenowe zawdzięczają unikatowym właściwościom fotofizycznym.

Interesującą właściwością fotofizyczną pirenu i jego pochodnych jest dualna emisja w roztworze, którą można kontrolować - emisja może pochodzić od monomerów lub ekscymerów. Główną zaletą stosowania pirenu i jego pochodnych do analizy badanych próbek jest jego wysoki współczynnik ekstynkcyjny, który pozwala na badania przy użyciu minimalnych ilości biomolekuł. Ponadto, dodatkowym atutem stosowania pochodnych pirenowych jest prosta i bezpieczna detekcja za pomocą nieinwazyjnych metod spektroskopowych. Pochodne pirenowe dzięki możliwości projektowania i kontrolowania właściwości fotofizycznych umożliwiają syntezę specjalistycznych sond molekularnych umożliwiających badanie oddziaływań w białkach, analizę struktur nici DNA oraz RNA, bioobrazowanie organeli w komórkach zdrowych, ale i do obrazowania komórek nowotworowych.

¹⁵⁶ Md. M. Islam, Z. Hu, Q. Wang, C. Redshaw, X. Feng, *Pyrene-based aggregation-induced emission luminogens and their applications*, Mater. Chem. Front., **2019**, 3, 762-781

¹⁵⁷ C. Zhang, X. Pan, S. Cheng, A. Xie, W. Dong, *Pyrene Derived Aggregation-Induced Emission Sensor for Highly Selective Detection of Explosive CL-20*, J. Luminescence, **2021**, 233, 117871

¹⁵⁸ X. Yang, Z. Zhao, H. Ran, J. Zhang, L. Chen, R. Han, X. Duan, H. Sun, J. Y. Hu, *New Pyrene-Based Butterfly-Shaped Blue AIEgens: Synthesis, Structure, Aggregation-Induced Emission and Their Nondoped Blue OLED*, Dye. Pigment., **2020**, 173, 107881

¹⁵⁹ R. Kumari, D. Sunil, *Emerging Trends in Aggregation Induced Emissive Luminogens as Bacterial Theranostics*, J. Drug Target., **2021**, 29, 793-807

CZEŚĆ BADAWCZA

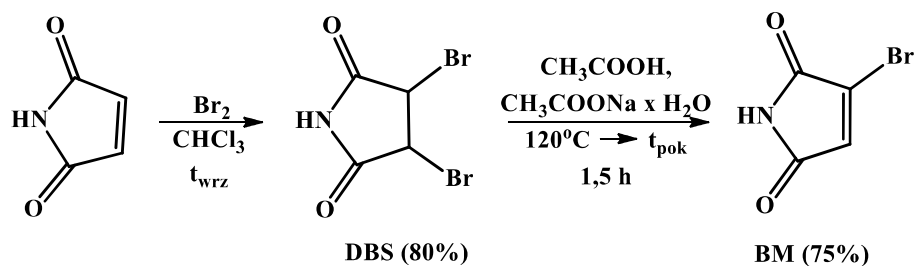
5. Omówienie wyników

5.1. Synteza *N*-niepodstawionych oraz metalokarbonylowych pochodnych maleimidu i sukcynimidu

Nawiązując do części literaturowej bromopochodne maleimidu stanowią ciekawą klasę związków, które z powodzeniem znajdują zastosowanie w modyfikacji biomolekuł. Z tego powodu postanowiłam w ramach rozprawy doktorskiej podjąć próbę wykorzystania bromopochodnych maleimidu oraz ich metalokarbonylowych analogów do znakowania biocząsteczek. W tym celu wymienione związki poddałam reakcjom z tiolami o znaczeniu biologicznym. Dla wszystkich badanych związków przeprowadziłam analizę spektroskopową i masową. Wykonane zostały również badania biologiczne w celu określenia potencjału aplikacyjnego do znakowania biocząsteczek. W moich badaniach wykorzystałam również fakt, że pochodne (di)bromomaleimidu mogą posłużyć do mostkowania biomolekuł (rebridging).

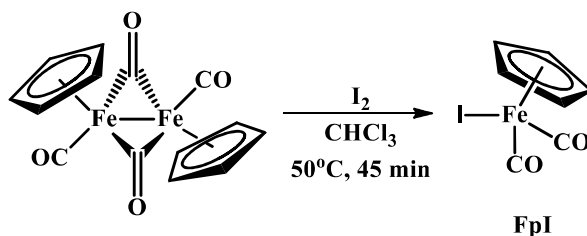
W pierwszej kolejności zdecydowałam się przeprowadzić reakcję bromopochodnych maleimidu (oraz ich metalokarbonylowych analogów) z tiolami o znaczeniu biologicznym - estrem metylowym *N*-acetylocysteiny (**Cys**) oraz tetraoctanem tioglukozy (**Gluc**).

Pierwszym etapem moich badań była synteza monobromopochodnej maleimidu, a następnie metalokarbonylowych analogów mono- i dibromomaleimidu. W pierwszej kolejności zsyntezowałam 2-bromomaleimid (Schemat 21). Dostępny handlowo maleimid poddałam reakcji bromowania za pomocą bromu cząsteczkowego, a jako rozpuszczalnik użyłam chloroform zgodnie z procedurą opisaną w literaturze (*Chem. Commun.*, **2009**, 6583-6585). Reakcję prowadziłam przez 2 godziny w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika. 2,3-dibromosukcynimid otrzymałam z 80% wydajnością, a następnie poddałam go reakcji eliminacji (-HBr) prowadzonej w kwasie octowym, w obecności octanu sodu (Schemat 21). Strukturę 2-bromomaleimidu (**BM**) potwierdziłam poprzez porównanie widm ¹H NMR z danymi literaturowymi.



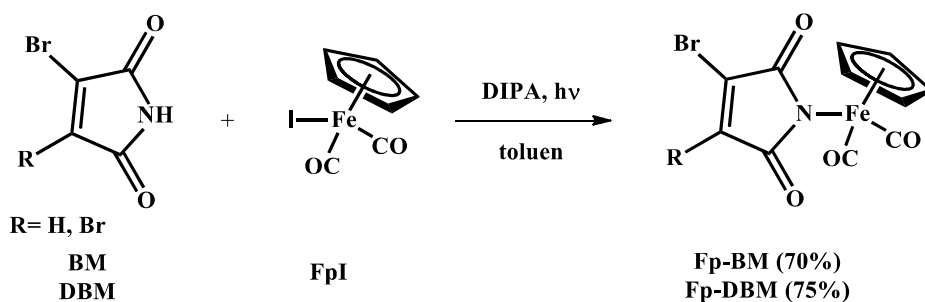
Schemat 21. Synteza **BM**

Kolejnym etapem mojej pracy badawczej była synteza jodku - $\text{CpFe}(\text{CO})_2\text{I}$ (**FpI**), który jest niezbędny do syntezy metalokarbonylowych pochodnych maleimidu. **FpI** otrzymałam na drodze reakcji dimeru (cyklopentadienilo) dikarbonylżelaza(II) z jodem cząsteczkowym (Schemat 22) otrzymując produkt w postaci bordowo-fioletowych kryształów.



Schemat 22. Synteza **FpI**

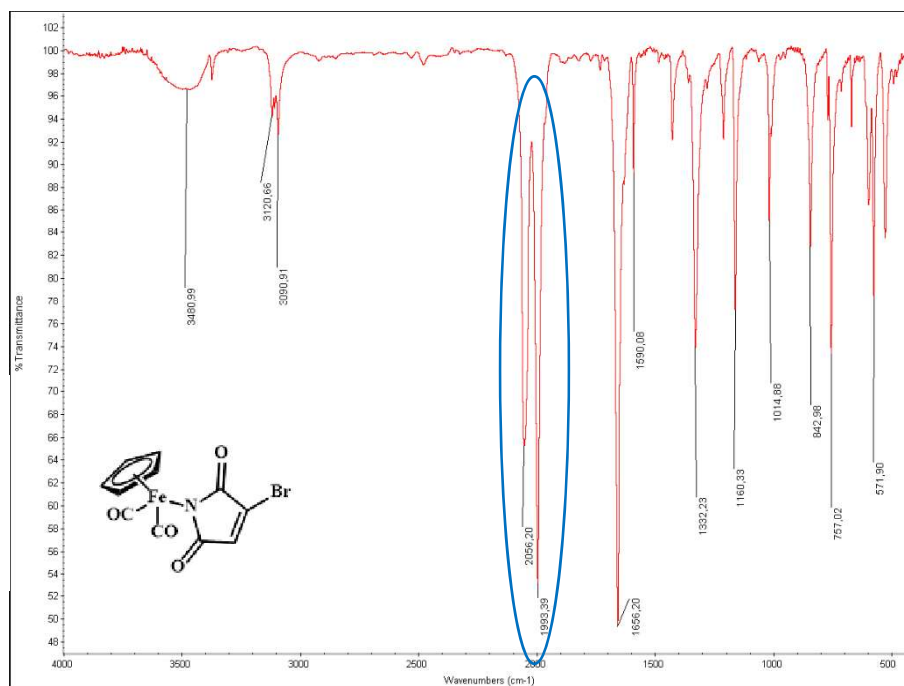
Następnie zsyntezowałam metalokarbonylowe pochodne monobromo- i dibromo-maleimidu $\text{CpFe}(\text{CO})_2(\eta^1\text{-2-bromomaleimidato})$ **Fp-BM** oraz $\text{CpFe}(\text{CO})_2(\eta^1\text{-2,3-dibromomaleimidato})$ **Fp-DBM** (Schemat 23). Syntezę obu kompleksów przeprowadziłam na drodze fotochemicznej reakcji **FpI** z pochodnymi bromomaleimidu prowadzonej w obecności diizopropylaminy (DIPA). Obie procedury zostały opracowane wcześniej w zespole profesor Bogny Rudolf. Produkty reakcji oczyściłam za pomocą chromatografii kolumnowej, a ich strukturę potwierdziłam poprzez porównanie widm ^1H NMR z danymi literaturowymi.



Schemat 23. Synteza **Fp-BM** i **Fp-DBM**

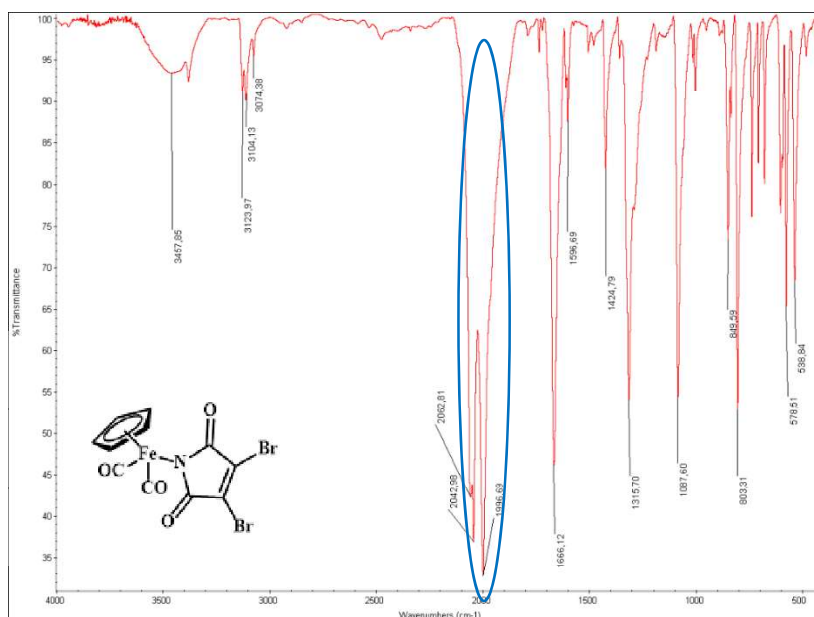
Dodatkowo, strukturę związku potwierdziłam za pomocą spektroskopii w podczerwieni, która pozwala w łatwy sposób zidentyfikować grupy C=O, gdyż karbonylki wykazują charakterystyczne pasma drgań rozciągających w zakresie 1850-2100 cm^{-1} .

W przypadku związku **Fp-BM** pasma drgań rozciągających dwóch ligandów -CO znajdujących się w cząsteczce obecne są odpowiednio przy 1993 i 2056 cm^{-1} (Rysunek 34).



Rysunek 34. Widmo FT-IR związku **Fp-BM**

W przypadku związku **Fp-DBM** pasma drgań rozciągających dwóch ligandów karbonylkowych znajdujących się w cząsteczce obecne są odpowiednio przy 1996 i 2042 cm^{-1} (Rysunek 35).

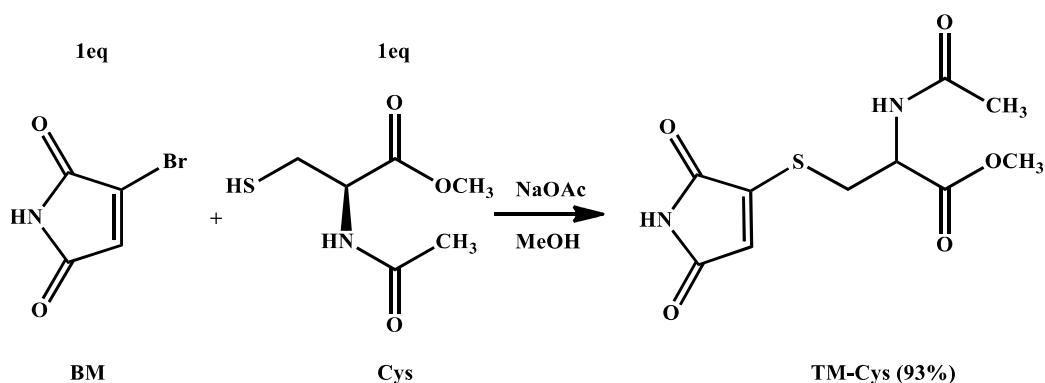


Rysunek 35. Widmo FT-IR związku **Fp-DBM**

Następnym etapem mojej pracy badawczej było sprawdzenie reaktywności **BM**, **DBM** oraz ich metalokarbonylowych pochodnych - **Fp-BM** i **Fp-DBM** względem grup tiolowych obecnych w biocząsteczkach.

W pierwszej kolejności podjęłam próbę funkcjonalizacji estru metylowego *N*-acetylocysteiny (**Cys**) za pomocą *N*-niepodstawionych bromomaleimidów. Pracę rozpoczęłam od reakcji **BM** z **Cys** (Schemat 24). Prowadziłam ją w metanolu, w obecności octanu sodu. W analogiczny sposób przeprowadziłam reakcję **DBM** z **Cys** (Schemat 25).

Syntezę **TM-Cys** prowadziłam 20 min. w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji usuwałam rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, a surowy produkt oczyściłam za pomocą chromatografii kolumnowej. Budowę produktu oraz czystość określiłam metodami spektroskopowymi: ^1H i ^{13}C NMR, IR oraz HRMS (*High-Resolution Mass Spectrometry*).



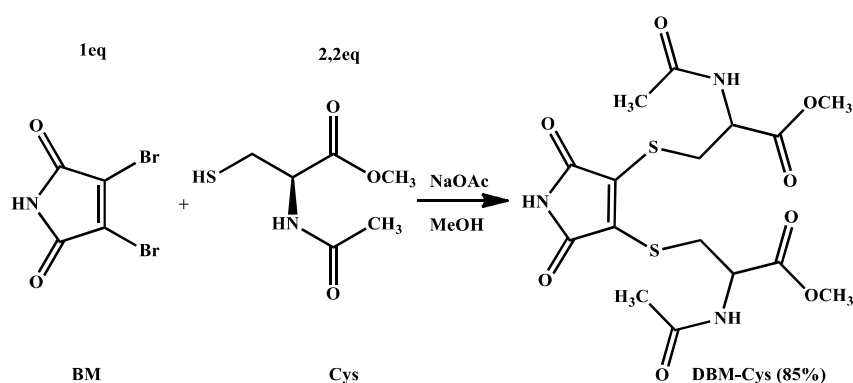
Schemat 24. Synteza **TM-Cys**

W widmie ^1H NMR (600MHz, MeOD) związku **TM-Cys** obecny jest singlet przy 1,99 ppm od trzech protonów grupy metylowej podstawnika acetylowego, następnie multiplet w zakresie 3,29-3,33 ppm i dublet dubletów przy 3,49 ppm o stałych sprzężenia odpowiednio $J_1 = 4,8$ Hz, $J_2 = 13,8$ Hz pochodzące każdy od jednego protonu grupy metylenowej połączonej bezpośrednio z atomem siarki. Kolejnym sygnałem jest singlet przy 3,77 ppm odpowiadający trzem protonom grupy $-\text{OCH}_3$, oraz dublet dubletów przy 4,76 ppm o stałych sprzężenia $J_1 = 5,1$ Hz i $J_2 = 8,1$ Hz odpowiadający protonowi grupy metinowej połączonej z grupą $-\text{NH}$ cysteiny. Najdalej przesuniętym sygnałem w widmie jest singlet przy 6,34 ppm pochodzący od protonu przyłączonego do atomu węgla wiązania podwójnego $\text{C}=\text{C}$ obecnego w pierścieniu maleimidowym.

W widmie ^{13}C NMR (150MHz, MeOD) związku **TM-Cys** obecne są sygnały pochodzące od atomów węgla grup karbonylowych: przy 172,0, 170,7, 170,2 i 169,0 ppm. Sygnał przy 150,3 ppm pochodzi od atomów węgla tworzących wiązanie podwójne $\text{C}=\text{C}$, a sygnał pochodzący od atomu węgla związanego z atomem siarki znajduje się przy 119,4 ppm. Kolejno w widmie obecne są sygnały pochodzące od alkilowych atomów węgla - przy 51,8 ppm ($-\text{OCH}_3$), 50,9 ppm ($-\text{HC}-\text{NH}$), 32,2 ppm ($-\text{H}_2\text{C}-\text{S}-$), 20,9 ppm ($-\text{CH}_3$).

W widmie IR obecne są charakterystyczne pasma drgań grupy $-\text{NH}$ przy 3312 cm^{-1} oraz pasma drgań grup $\text{C}=\text{O}$ obecnych w cząsteczce odpowiednio przy 1754 i 1710 cm^{-1} . Dodatkowo dla **TM-Cys** zostało wykonane widmo masowe wysokiej rozdzielczości HRMS (ESI), które potwierdziło powstanie tego związku.

Następnie podjęłam próbę syntezy **DTM-Cys** (Schemat 25). Reakcję prowadziłam 30 min. w temperaturze pokojowej. Następnie surowy produkt oczyściłam chromatograficznie, a jego strukturę i czystość określiłam wykonując analizy spektroskopowe: ^1H i ^{13}C NMR, IR oraz HRMS.



Schemat 25. Synteza **DTM-Cys**

W widmie ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) związku **DTM-Cys** obecny jest singlet przy 1,84 ppm pochodzący od sześciu protonów dwóch równocennych grup metylowych podstawników acetylowych, następnie dwa dublety: pierwszy przy 3,39 ppm o stałej sprzężenia $J = 8,4$ Hz oraz drugi przy 3,41 ppm o stałej sprzężenia $J = 9,0$ Hz, pochodzące od dwóch protonów grupy metylenowej połączonej z atomem siarki; singlet przy 3,70 ppm odpowiada sześciu protonom dwóch grup metoksylowych, dwa dublety odpowiadają jednemu protonowi drugiej grupy metylenowej połączonej bezpośrednio z atomem siarki - przy 3,70 ppm o stałej sprzężenia $J = 4,8$ Hz oraz przy 3,73 ppm o takiej samej wartości stałej sprzężenia. Kolejnym sygnałem jest multiplet w zakresie 4,48-4,52 ppm odpowiadający dwóm protonom dwóch grup metinowych znajdujących się w sąsiedztwie grupy -NH fragmentu cysteinowego. Najdalej przesunięte sygnały w widmie pochodzą od protonów grup aminowych - dublet przy 8,45 ppm o stałej sprzężenia $J = 7,8$ Hz odpowiadający dwóm protonom grup aminowych cysteiny oraz poszerzony singlet przy 11,21 ppm pochodzący od protonu grupy -NH obecnej w pierścieniu maleimidowym.

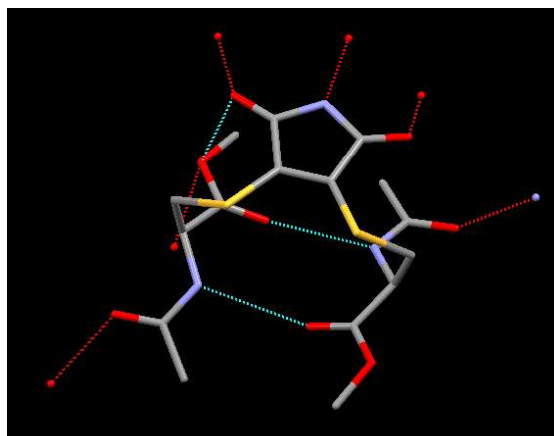
W widmie ^{13}C NMR (150MHz, DMSO- d_6) związku **DTM-Cys** obecne są sygnały atomów węgla grup C=O: przy 171,0, 169,9 i 167,6 ppm, sygnał pochodzący od atomów węgla tworzących wiązanie podwójne C=C pierścienia maleimidowego - 136,5 ppm, a następnie obecne są sygnały pochodzące od alkilowych atomów węgla - przy 52,8 ppm (-OCH₃), 52,7 ppm (-HC-NH-), 32,4 ppm (-H₂C-S-) oraz sygnały od atomów węgla grup metylowych przy 22,7 ppm.

W widmie IR obecne są charakterystyczne pasma drgań grupy -NH przy 3382 i 3344 cm^{-1} oraz pasma grup C=O odpowiednio przy 1768 i 1725 cm^{-1} . Dla związku **DTM-Cys** wykonałam analizę HRMS (ESI) - m/z: obliczona dla C₁₀H₁₂N₂O₅SH [M+H]⁺ 273,0540, wyznaczona 273,0540.

Dodatkowo, dla związku **DTM-Cys** uzyskałam monokryształy, które pozwoliły mi jednoznacznie potwierdzić strukturę uzyskanego produktu oraz dostarczyły informacji dotyczących oddziaływań występujących na poziomie molekularnym.

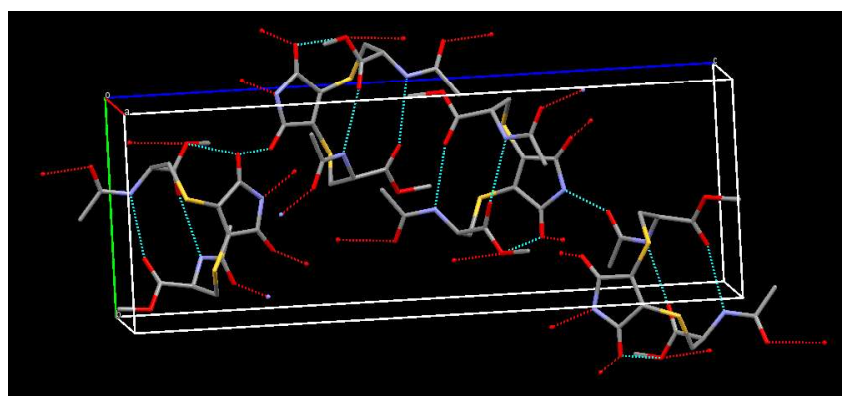
Badania rentgenostrukturalne zostały wykonane w zespole dr hab. Anny Makal, prof. UW z Uniwersytetu Warszawskiego. Struktura cząsteczkowa pochodnej została przedstawiona na Rysunku 36. Analiza rentgenostrukturalna dostarcza informacji o tworzeniu się wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych między atomami wodoru grup -NH oraz atomami tlenu grup karbonylowych cystein. Dwa podstawniki aminokwasowe układają się

podobnie na wzór antyrównoległej β -kartki występującej w strukturze białek i są stabilizowane przez dwa krótkie wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe. Obecność wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych wpływa zarówno na kształt przestrzenny cząsteczek, jak i właściwości fizykochemiczne.



Rysunek 36. Struktura cząsteczkowa **DTM-Cys**

Analiza upakowania cząsteczki w komórce elementarnej (Rysunek 37) umożliwia określenie trójwymiarowej budowy cząsteczek oraz sposobu ich wzajemnego ułożenia w sieci krystalicznej. W pojedynczej komórce elementarnej obecne są cztery cząsteczki **DTM-Cys**. Ponadto, można zaobserwować tworzenie się wiązań wodorowych między dwoma podstawnikami cystein w układzie maleimidowym jednej cząsteczki, a atomami tlenu grupy karbonylowej podstawnika cysteinowego drugiej cząsteczki.

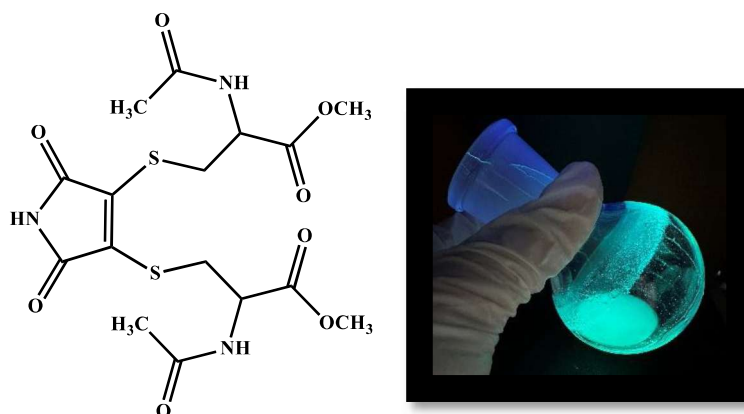


Rysunek 37. Upakowanie w komórce elementarnej **DTM-Cys**

Według danych literaturowych dipodstawienie atomów bromu w reakcji dibromomaleimidów z grupami tiolowymi prowadzi do otrzymania produktów wykazujących fluorescencję (*Chem. Commun.*, **2009**, 658-6585; *JACS*, **2013**, 135, 2875-2878). We wspomnianych w literaturze reakcjach stosowano różne tiole, m.in. butano-1-tiol,

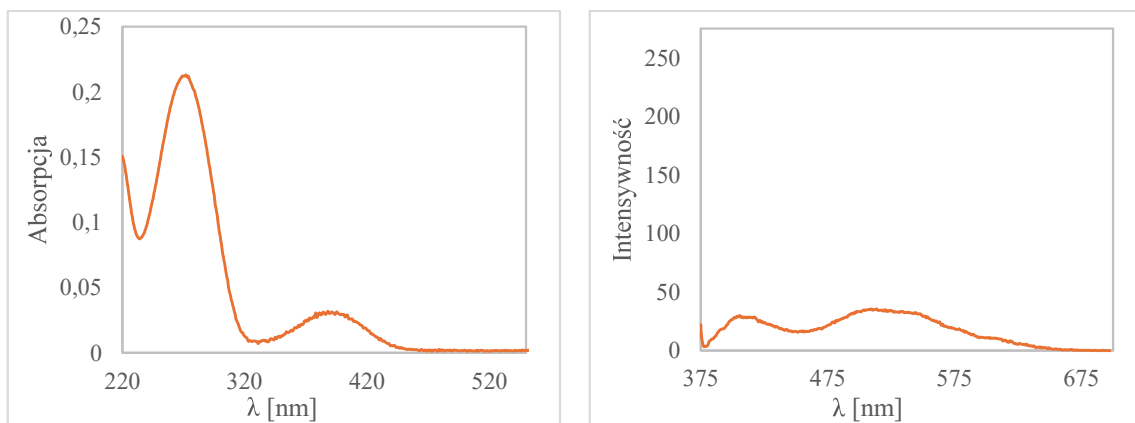
2-merkaptoetanol czy ester metylowy *N*-(*tert*-butoksykarbonylo)-*L*-cysteiny. Na drodze reakcji w/w tioli z dibromomaleimidem otrzymano ditiomaleimidy, które wykazywały fluorescencję.

Otrzymany przeze mnie produkt na drodze reakcji **DBM** z **Cys** (Schemat 26) jest związkiem nieopisanym do tej pory w literaturze i w odróżnieniu od monopodstawionej pochodnej **TM-Cys** wykazuje właściwości fluorescencyjne. **DTM-Cys** wykazuje w ciele stałym zieloną barwę fluorescencji, a w roztworze niebieską (Rysunek 38).



Rysunek 38. Fluorescencja **DTM-Cys** w metanolu

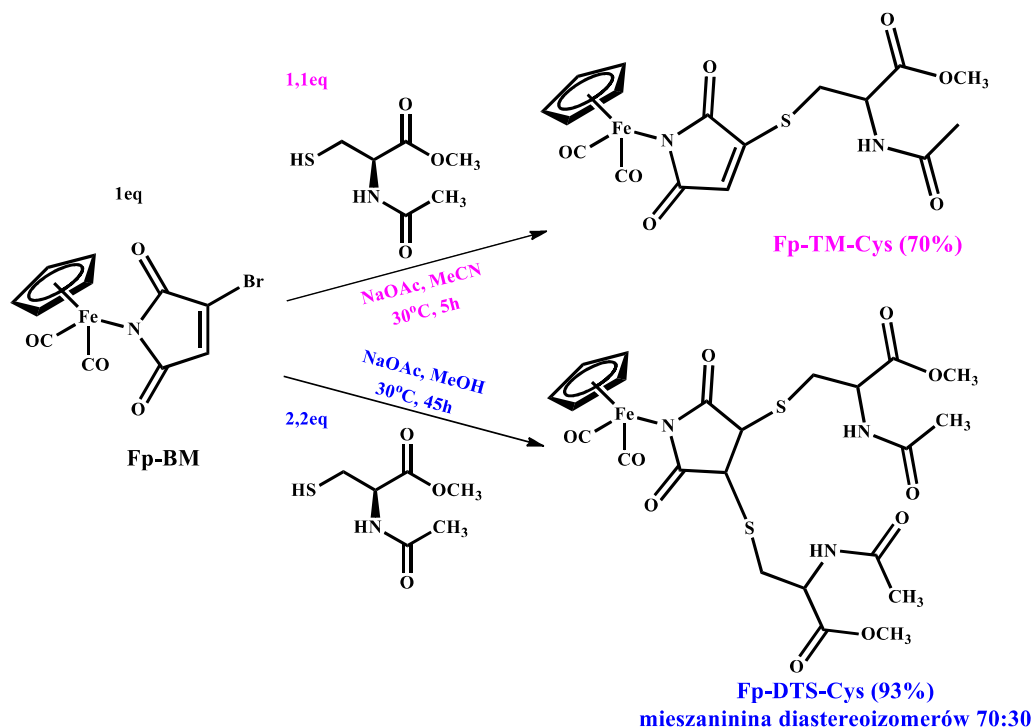
W celu scharakteryzowania właściwości fotofizycznych zarejestrowałam widmo absorcyjne i emisyjne związku **DTM-Cys** w roztworze acetonitrylu (Rysunek 39).



Rysunek 39. Widmo absorcyjne i emisyjne **DTM-Cys** w roztworze acetonitrylu ($c=10^{-5}$ mol/l)

Następnie przystąpiłam do przeprowadzenia analogicznej reakcji dla kompleksów metaloorganicznych. Jako pierwszą przeprowadziłam reakcje metalokarbonylowej pochodnej **Fp-BM** z **Cys** (Schemat 26). Zaobserwowałam, że w zależności od czasu prowadzenia reakcji oraz od użytej ilości równoważników **Cys** otrzymałam produkt monopodstawienia z 70%

wydajnością lub produkt podstawienia i addycji do wiązania podwójnego z 93% wydajnością (mieszanka diastereoizomerów).



Schemat 26. Synteza **Fp-TM-Cys** i **Fp-DTS-Cys**

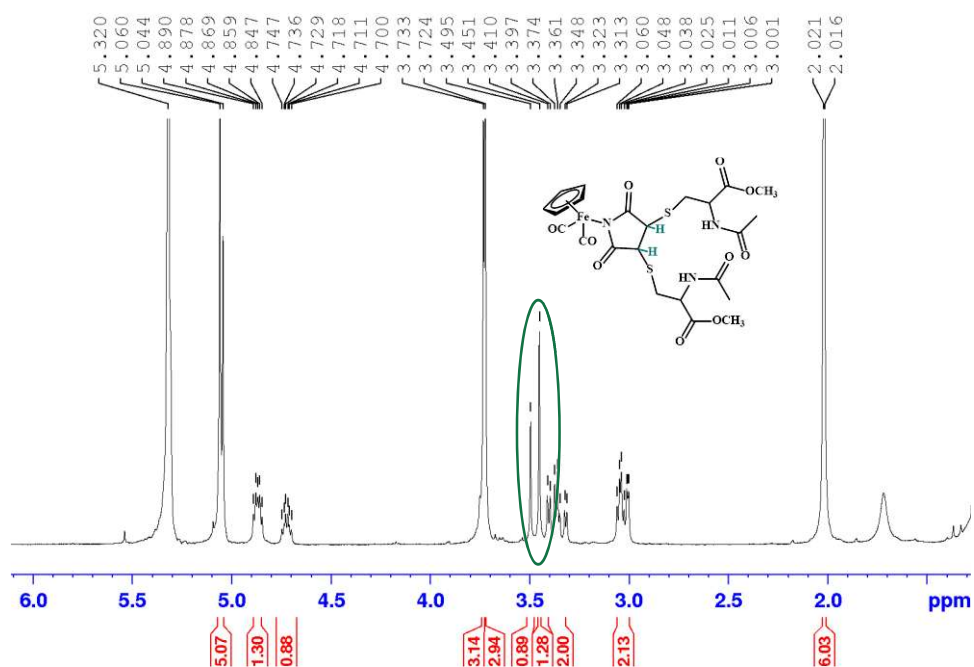
Produkt monopodstawienia otrzymałam w reakcji **Fp-BM** z 1,1 równoważnikiem **Cys**. Natomiast na drodze reakcji 2,2 równoważnika estru z **Fp-BM** otrzymałam mieszaninę dwóch diastereoizomerów **Fp-DTS-Cys** w stosunku 70:30, które rozdzieliłam na drodze chromatografii kolumnowej, a budowę wyżej wymienionych produktów oraz ich czystość ustaliłam metodami spektroskopowymi ^1H i ^{13}C NMR, IR oraz HRMS.

W widmie protonowego rezonansu magnetycznego związku **Fp-TM-Cys** (400MHz, CD_2Cl_2) obecny jest singlet przy 1,84 ppm od trzech protonów grupy metylowej podstawnika acetylowego, następnie multiplet w zakresie 3,23-3,39 ppm od dwóch protonów grupy metylenowej połączonej bezpośrednio z atomem siarki. Następnymi obecnymi w widmie sygnałami są singlet przy 3,75 ppm od trzech protonów grupy $-\text{OCH}_3$ oraz multiplet w zakresie 4,81-4,86 ppm odpowiadający protonowi grupy $-\text{CH}$ połączonej z grupą $-\text{NH}$ cysteiny. Singlet przy 5,07 ppm odpowiada pięciu protonom pierścienia cyklopentadienylowego, a singlet przy 6,22 ppm pochodzi od protonu przyłączonego do atomu węgla wiązania podwójnego obecnego w pierścieniu maleimidowym. Najdalej przesuniętym sygnałem w widmie jest dublet przy 6,39 ppm, którego stała sprzężenia wynosi $J = 6,4$ Hz pochodzący od jednego protonu grupy $-\text{NH}$.

W widmie ^{13}C NMR (75MHz, CD_2Cl_2) związku **Fp-TM-Cys** sygnał przy 212,3 ppm potwierdza obecność karbonylków w cząsteczce, a następne sygnały pochodzą od atomów węgla grup $\text{C}=\text{O}$: δ 179,4, 170,5 ppm. Kolejne sygnały pochodzą od atomów węgla tworzących wiązanie podwójne pierścienia maleimidowego - przy 151,6 ppm oraz przy 124,4 ppm. Kolejny sygnał przy 85,0 ppm odpowiada pięciu równocennym atomom węgla pierścienia cyklopentadienylowego. Kolejne sygnały pochodzą od alkilowych atomów węgla - przy 52,8 ppm ($-\text{HC}-\text{NH}-$), 51,3 ppm ($-\text{OCH}_3$), 33,5 ppm ($-\text{H}_2\text{C}-\text{S}-$) oraz sygnał przy 22,7 ppm od atomu węgla grupy metylowej.

Identyfikację diastereoizomerów **Fp-DTS-Cys** oraz określenie ich konfiguracji umożliwiła mi analiza spektroskopowa. Widma ^1H NMR obu diastereoizomerów różnią się jedynie przesunięciem i multipletowością dwóch protonów układu sukcyimidowego - co wynika z faktu, iż w konfiguracji *trans* protony te nie sprzęgają się ze sobą (Rysunek 40) - widoczne są dwa singlety przy 3,49 i 3,45 ppm, natomiast w konfiguracji *cis* protony mogą się ze sobą sprzęgać (Rysunek 41). W widmie protonowym diastereoizomeru *cis* obecne są dwa dublety - pierwszy przy 3,99 ppm o stałej sprzężenia $J = 8,1$ Hz oraz drugi dublet przy 4,07 ppm o stałej sprzężenia $J = 8,1$ Hz.

W widmie ^1H NMR (400MHz, CD_2Cl_2) izomeru *trans* obecne są dwa singlety od sześciu protonów grup metylenowych - pierwszy przy 2,01 ppm oraz drugi przy 2,02 ppm. Multiplety w zakresie 3,0-3,06 ppm oraz 3,31-3,41 ppm odpowiadają dwóm protonom grup metylowych każdy połączonych bezpośrednio z atomami siarki. Singlet przy 3,45 ppm oraz singlet przy 3,49 ppm odpowiadają protonom pierścienia sukcyimidowego i są charakterystycznymi sygnałami umożliwiającymi określenie konfiguracji diastereoizomeru. Kolejne sygnały pochodzą od sześciu protonów grup metoksyloowych - singlet przy 3,72 ppm oraz singlet przy 3,73 ppm. Dwa multiplety (w zakresie 4,70-4,74 i 4,84-4,89 ppm) pochodzą od protonów dwóch grup $-\text{CH}-$. Kolejny sygnał przy 5,06 ppm odpowiada pięciu protonom pierścienia cyklopentadienylowego. Dublet przy 7,05 ppm, którego stała sprzężenia wynosi $J = 7,2$ Hz oraz dublet przy 7,69 ppm, o stałej sprzężenia $J = 7,6$ Hz pochodzą od dwóch protonów grup $-\text{NH}$.

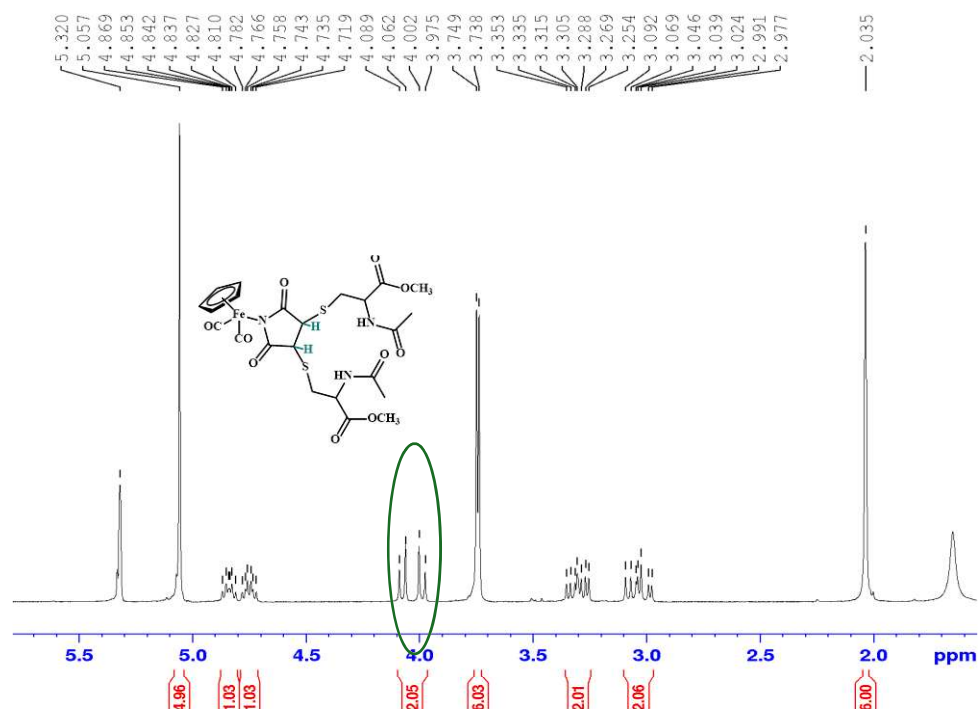


Rysunek 40. Widmo ^1H NMR diastereoizomeru *trans* **Fp-DTS-Cys** w CD_2Cl_2 (300 MHz)

W widmie węglowym (75MHz, CD_2Cl_2) diastereoizomeru *trans* sygnały obecne przy 212,3 i 212,2 ppm odpowiadają atomom węgla dwóch karbonylków, a sygnały przy δ 186,8, 186,3, 171,1, 170,9, 170,1 ppm pochodzą od grup karbonylowych. Sygnał przy 85,2 ppm odpowiada pięciu równocennym atomom węgla pierścienia cyklopentadienylowego. Kolejne sygnały pochodzą od alkilowych atomów węgla - δ 52,5 ppm ($-\text{OCH}_3$), 52,0 ppm (atomy węgla wiązania C–C w układzie sukcyminidowym), 50,9, 49,2 ppm ($-\text{HC}-\text{NH}-$), 35,7 i 34,3 ppm ($-\text{H}_2\text{C}-\text{S}-$) oraz 22,7 i 22,6 ppm ($-\text{CH}_3$). W widmie IR obecne są charakterystyczne dla ligandów karbonylkowych pasma drgań przy 2046 i 1997 cm^{-1} oraz pasma drgań grup karbonylowych przy 1741 i 1638 cm^{-1} .

W widmie ^1H NMR (300MHz, CD_2Cl_2) izomeru *cis* (Rysunek 41) obecny jest singlet przy 2,04 ppm odpowiadający sześciu protonom grup metylowych. Następnie obecne są dwa multiplety w zakresie 2,98-3,09 ppm oraz 3,25-3,34 ppm - każdy z sygnałów odpowiada dwóm protonom grup metylenowych połączonych bezpośrednio z atomami siarki. Singlet przy 3,73 ppm oraz singlet przy 3,74 ppm odpowiadają trzem protonom grup metoksylowych każdy. Następnie obecne są dwa dublety umożliwiające określenie konfiguracji diastereoizomeru, pierwszy przy 3,99 ppm, o stałej sprzężenia $J = 8,1$ Hz, drugi dublet, o tej samej wartości stałej sprzężenia znajduje się przy 4,07 ppm. Sygnały dla diastereoizomeru *cis* są przesunięte w kierunku wyższych wartości oraz różnią się multipletowością od sygnałów zarejestrowanych dla diastereoizomeru *trans*. Dwa multiplety (w zakresie 4,72-4,78 i 4,81-4,86 ppm) pochodzą

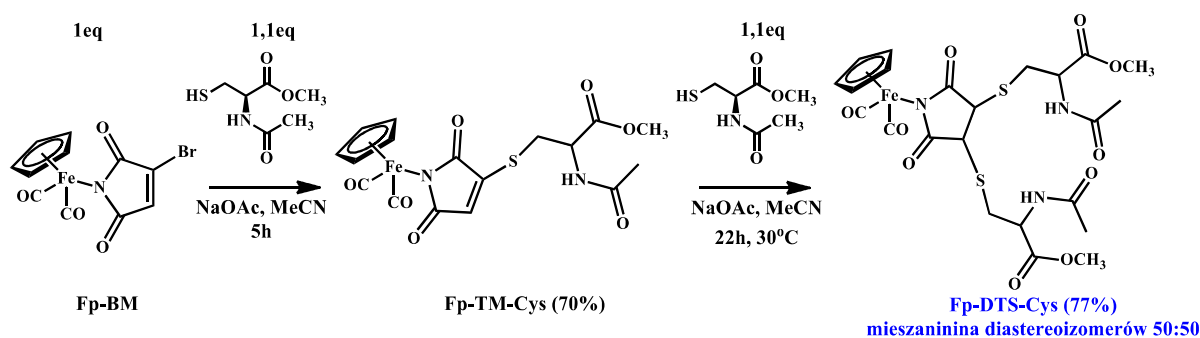
od dwóch protonów grup -CH bezpośrednio połączonych z grupami -NH cysteiny. W przypadku diastereoizomeru *cis* sygnał odpowiadający pięciu protonom pierścienia cyklopentadienylowego jest singletem znajdującym się przy 5,06 ppm. Dublet przy 7,02 ppm o stałej sprzężenia $J = 6,6$ Hz oraz dublet przy 7,72 ppm o stałej sprzężenia $J = 7,5$ Hz pochodzą od dwóch protonów grup -NH cystein.



Rysunek 41. Widmo ^1H NMR diastereoizomeru *cis* **Fp-DTS-Cys** w CD_2Cl_2 (300 MHz)

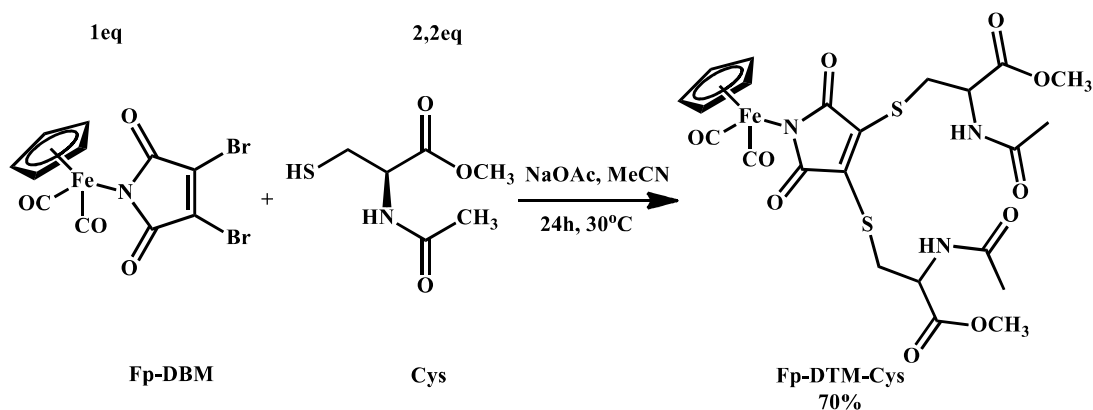
W widmie ^{13}C NMR (75MHz, CD_2Cl_2) diastereoizomeru *cis* sygnał pochodzący od karbonylków obecny jest przy 212,3 ppm, natomiast sygnały atomów węgla grup karbonylowych przy δ 187,3, 186,7, 171,2, 171,1, 170,3, 170,2 ppm. Następnie obecny jest przy 85,3 ppm sygnał pięciu równocennych atomów węgla pierścienia cyklopentadienylowego. Kolejne sygnały pochodzą od alkilowych atomów węgla - 52,5 ppm (-OCH₃), sygnał przy 52,0 ppm pochodzi od atomów węgla wiązania C-C pierścienia sukcydimidowego, sygnały przy 50,9 i 49,2 ppm pochodzą od atomów węgla grup metylowych bezpośrednio związanych z grupą -NH. Sygnały przy 35,7 i 34,3 ppm pochodzą od atomów węgla grup -CH₂ (-H₂C-S-) oraz atomów węgla grup -CH₃ przy 22,7 i 22,6 ppm.

Następnie postanowiłam otrzymać **Fp-DTS-Cys** na drodze reakcji dwuetapowej. W tym celu użyłam zsyntezowany i oczyszczony **Fp-TM-Cys**, który poddałam ponownie reakcji z **Cys**. Okazało się, że w przypadku reakcji dwuetapowej również tworzy się mieszanina diastereoizomerów, ale w stosunku 1:1 (Schemat 27).



Schemat 27. II-etapowa metoda syntezy **Fp-DTS-Cys**

Kolejnym krokiem było otrzymanie pochodnej **Fp-DTM-Cys** - w tym celu przeprowadziłam reakcję **Fp-DBM** z estrem metylowym *N*-acetylocysteiny, w której otrzymałam z 70% wydajnością dipodstawioną pochodną **Fp-DTM-Cys** (Schemat 28).



Schemat 28. Synteza **Fp-DTM-Cys**

Identyfikację produktu reakcji przedstawionej na Schemacie 28 dokonałam na podstawie analiz spektroskopowych. W widmie ^1H NMR (400MHz, CD_2Cl_2) singlet przy 1,99 ppm odpowiada sześciu protonom dwóch grup metylowych podstawników acetylowych, a następny sygnał pochodzi od czterech protonów dwóch grup metylenowych połączonych bezpośrednio z atomami siarki - dublet przy 3,67 ppm o stałej sprzężenia $J = 5,2$ Hz. Kolejnym sygnałem jest singlet przy 3,71 ppm od sześciu protonów dwóch grup $-\text{OCH}_3$ oraz multiplet w zakresie 4,82-4,86 ppm odpowiadający dwóm protonom grup metinowych bezpośrednio połączonych z grupami $-\text{NH}$ cysteiny. Następnie, przy 5,09 ppm obecny jest singlet odpowiadający pięciu protonom pierścienia cyklopentadienlowego. Najbardziej przesuniętym sygnałem obecnym w widmie jest dublet przy 7,12 ppm o stałej sprzężenia $J = 7,2$ Hz odpowiadający dwóm protonom grup $-\text{NH}$.

W widmie ^{13}C NMR (75MHz, CD_2Cl_2) związku **Fp-DTM-Cys** obecne są sygnały atomów węgla grup karbonylkowych - przy 212,9, 212,6 ppm. Sygnały pochodzące od atomów węgla grup karbonylowych znajdują się przy 177,5, 171,2, 169,8 ppm, natomiast sygnał przy 140,1 ppm odpowiada atomom węgla tworzącym wiązanie podwójne $\text{C}=\text{C}$. Sygnał znajdujący się przy 85,2 ppm pochodzi od pięciu równocennych atomów węgla pierścienia cyklopentadienylowego. Kolejne sygnały pochodzą od alkilowych atomów węgla - przy 52,8 ppm ($-\text{OCH}_3$), 52,6 ppm ($-\text{HC-NH-}$), 33,5 ppm ($-\text{H}_2\text{C-S-}$) oraz 22,7 ppm ($-\text{CH}_3$).

W widmie IR obecne są charakterystyczne dla karbonylków pasma drgań rozciągających przy 2045 i 1995 cm^{-1} . Dodatkowo powstanie produktu **Fp-DTM-Cys** zostało potwierdzone przy pomocy analizy HRMS (ESI).

W odróżnieniu od **DTM-Cys**, **Fp-DTM-Cys** nie wykazuje fluorescencji, co można wytłumaczyć obecnością fragmentu metalokarbonylowego połączonego z atomem azotu. Brak właściwości fluorescencyjnych jest prawdopodobnie związany z występowaniem „efektu atomu ciężkiego”, ze względu na obecność atomu żelaza w cząsteczce.

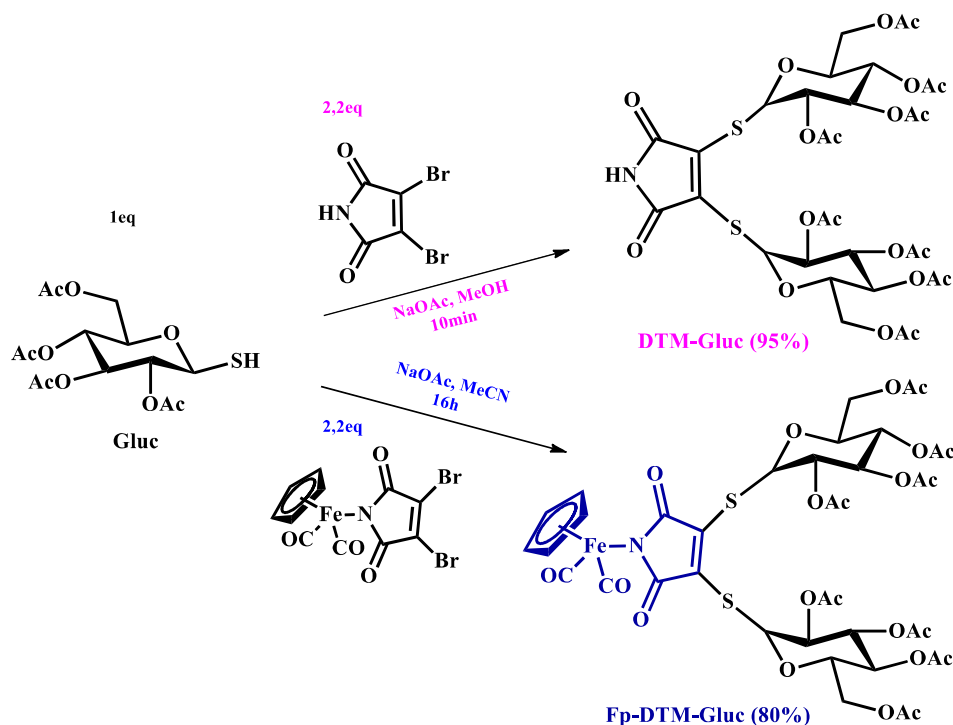
Wyżej opisane reakcje potwierdzają wysoką reaktywność pochodnych bromomaleimidu w reakcjach z grupami tiolowymi. W reakcji substytucji atomu bromu w **BM** oraz w **Fp-BM** otrzymałam produkty monopodstawienia (**TM-Cys** i **Fp-TM-Cys**) z zadawalającymi wydajnościami, a w przypadku reakcji **Fp-BM** z dwoma równoważnikami estru metylowego *N*-acetylocysteiny otrzymałam pochodną sukcyrimidową - **Fp-DTS-Cys**. Z kolei na drodze reakcji **DBM** oraz jego metalokarbonylowej pochodnej - **Fp-DBM** z **Cys**, otrzymałam ditiomaleimidy (**DTM-Cys** i **Fp-DTM-Cys**). Ponadto, zgodnie z doniesieniami opisanymi w literaturze pochodna **DTM-Cys**, podobnie jak inne ditiomaleimidy wykazuje fluorescencję.

Wybór **Cys** jako źródła wolnych grup tiolowych nie był przypadkowy - cysteina jest naturalnym budulcem łańcuchów peptydowych, a w strukturach peptydów oraz białek wolne grupy tiolowe tworzą mostki dwusiarczkowe. Reakcje te stanowiły podstawę do zaplanowania eksperymentów polegających na modyfikacji biomolekuł - łańcuchów peptydowych oraz białek przy użyciu bromopochodnych maleimidu.

Zaciekawiona reaktywnością bromomaleimidów w reakcjach substytucji postanowiłam przeprowadzić reakcje **DBM** i **Fp-DBM** z inną aktywną biologicznie cząsteczką, która zawiera grupę tiolową. Do dalszych modyfikacji wybrałam tetraoctan tioglukozy (**Gluc**), która jest związkiem szeroko przebadanym biologicznie. Związek ten ma większą zdolność do przenikania przez błony komórkowe i może ułatwiać transport do wnętrza komórki. Oprócz

tego, pochodne glukozy zawierające grupę tiolową reagują łatwo z pochodnymi dibromomaleimidami i były ostatnio wykorzystane bioobrazowania, np. hepatocytów myszy (*Molecules* **2023**, *28*, 7184).

Kolejną część badań rozpoczęłam od reakcji tetraoctanu tioglukozy (**Gluc**) z **DBM** i **Fp-DBM** (Schemat 29).

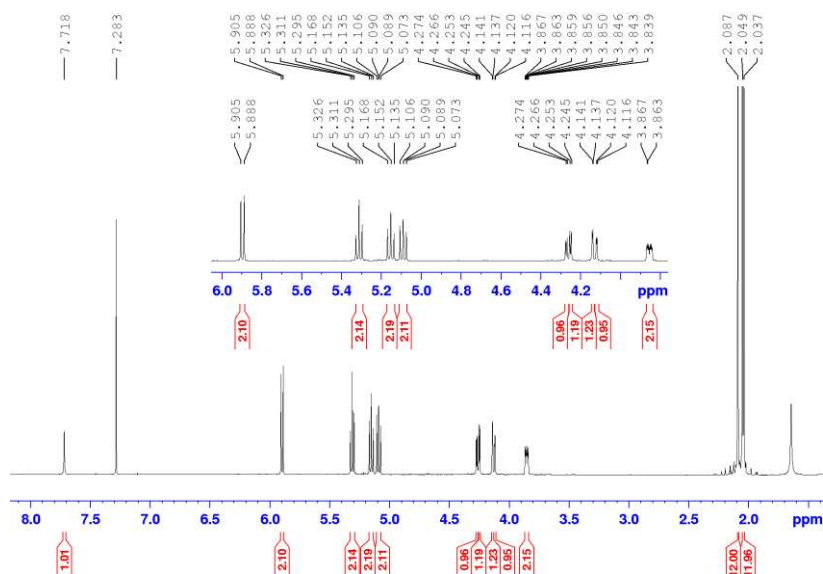


Schemat 29. Synteza **DTM-Gluc** i **Fp-DTM-Gluc**

W pierwszej kolejności przeprowadziłam reakcję **DBM** z tetraoctanem tioglukozy, w metanolu w obecności octanu sodu. Reakcje zakończyłam po około 10 minutach, gdy zaobserwowałam wypadanie żółtego osadu. Produkt reakcji oczyściłam chromatograficznie, a oczyszczony ditiomaleimid **DTM-Gluc** scharakteryzowałam metodami spektroskopowymi.

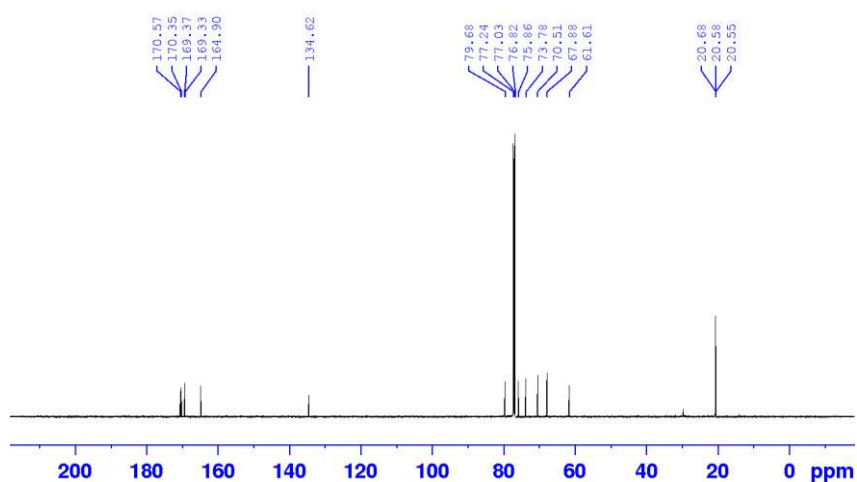
W widmie ^1H NMR związku **DTM-Gluc** (Rysunek 42) obecne są sygnały pochodzące od protonów grup acetylowych - singlet przy 2,09 ppm odpowiadający 12 protonom oraz dublet przy 2,04 ppm, o stałej sprzężenia $J = 7,2$ Hz odpowiadający dwunastu protonom. Kolejne obecne w widmie sygnały pochodzą od protonów pierścienia cukrowego: multiplet w zakresie 3,84-3,87 ppm od dwóch protonów; dublet przy 4,11 ppm o stałej sprzężenia $J = 2,4$ Hz odpowiada jednemu protonowi; dwa dublety przy 4,24 i 4,26 ppm o takiej samej wartości stałej sprzężenia $J = 4,8$ Hz każdy pochodzący od jednego protonu; multiplet w zakresie 5,07-5,11 ppm od dwóch protonów; dwa tryplety przy 5,14 i 5,30 ppm dla

których wartości stałych sprzężenia wynoszących odpowiednio $J = 9,9$ Hz i $J = 9,3$ Hz odpowiadają dwóm protonom każdy, oraz dublet przy 5,89 ppm o stałej sprzężenia $J = 10,2$ Hz od dwóch protonów. Najdalej przesuniętym sygnałem jest poszerzony singlet przy 7,72 ppm odpowiadający jednemu protonowi grupy -NH obecnej w pierścieniu maleimidowym.



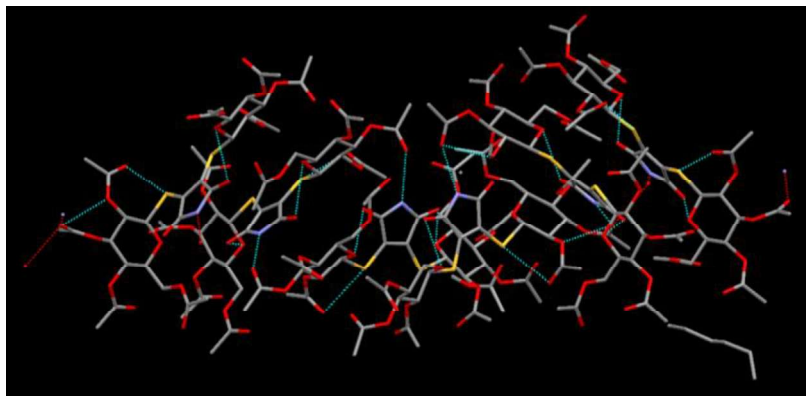
Rysunek 42. Widmo ^1H NMR **DTM-Gluc** CDCl_3 (600 MHz)

Widmo ^{13}C NMR **DTM-Gluc** (Rysunek 43) dostarczyło informacji m.in. dotyczących karbonylowych atomów węgla δ : 170,6, 170,3, 169,4, 169,3, 164,9 ppm. Sygnał pochodzący od atomów węgla tworzących wiązanie podwójne znajdował się przy 134,6 ppm, następne sygnały: δ 79,7, 75,9, 73,8, 70,5, 67,9, 61,6, 20,7, 20,6, 20,5 ppm pochodziły od alifatycznych atomów węgla. W widmie IR widoczne było pasmo drgań walencyjnych grupy -NH przy 3272 cm^{-1} oraz pasma drgań rozciągających pochodzące od grup karbonylowych przy 1743 i 1724 cm^{-1} .



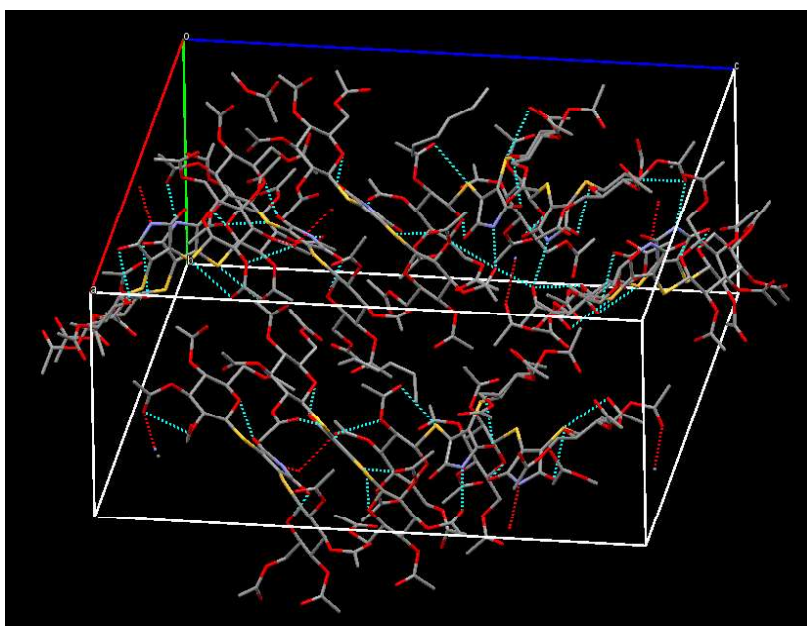
Rysunek 43. Widmo ^{13}C NMR **DTM-Gluc** CDCl_3 (600 MHz)

Ponadto, dla związku **DTM-Gluc** uzyskałam monokryształy, których analiza rentgenostrukturalna pozwoliła jednoznacznie potwierdzić strukturę uzyskanego produktu oraz dostarczyła informacji dotyczących oddziaływań występujących na poziomie molekularnym. W jednostce asymetrycznej związku **DTM-Gluc** znajduje się sześć niezależnych cząsteczek (Rysunek 44). Między cząsteczkami występują silne oddziaływania N-H...O przez co cząsteczki łączą się w dimery. Grupa -NH maleimidu jednej cząsteczki oddziałuje z grupami acylowymi acetylowanej tioglukozy drugiej cząsteczki oraz odwrotnie.



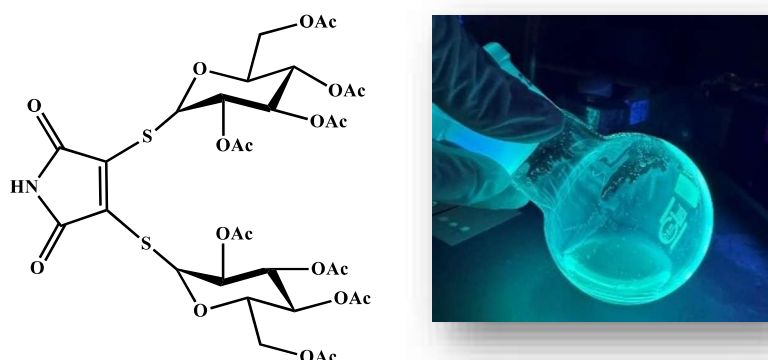
Rysunek 44. Struktura cząsteczkowa **DTM-Gluc**

W komórce elementarnej związku **DTM-Gluc** (Rysunek 45) znajduje się 12 cząsteczek między, którymi tworzą się liczne wiązania wodorowe. W komórce elementarnej widoczne są cząsteczki rozpuszczalnika - heksanu.



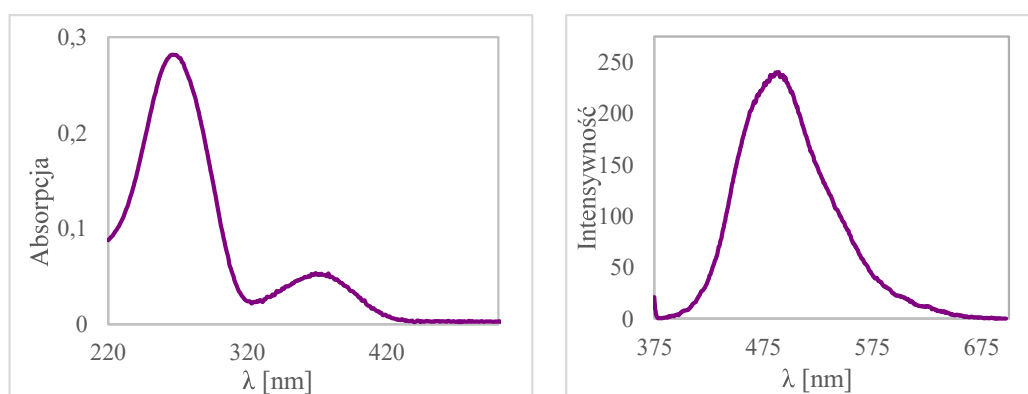
Rysunek 45. Upakowanie w komórce elementarnej **DTM-Gluc**

W reakcji tiocukru z **DBM** otrzymałam dipodstawioną pochodną, która podobnie jak **DTM-Cys** wykazuje fluorescencję w ciele stałym oraz roztworze (Rysunek 46).



Rysunek 46. Fluorescencja **DTM-Gluc** w roztworze acetonitrylu

W celu scharakteryzowania właściwości fotofizycznych zarejestrowałam widmo absorpcyjne i emisyjne związku **DTM-Gluc** w roztworze acetonitrylu (Rysunek 47). Związek ten wykazywał dużo bardziej intensywną fluorescencję niż pochodna z cysteina **DTM-Cys**.

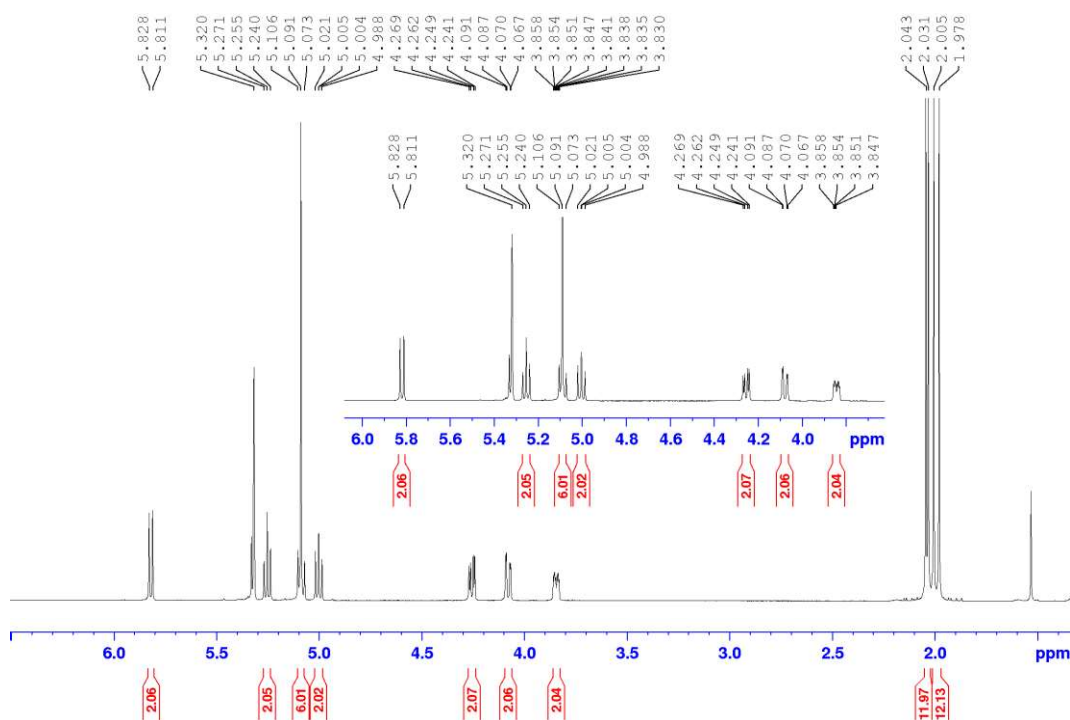


Rysunek 47. Widmo absorpcyjne i emisyjne **DTM-Gluc** w roztworze acetonitrylu ($c=10^{-5}$ mol/l)

W celu otrzymania **Fp-DTM-Gluc** przeprowadziłam reakcję **Fp-DBM** z **Gluc**, w obecności octanu sodu. Ze względu na słabą rozpuszczalność **Fp-DBM** w metanolu reakcję prowadziłam w acetonitrylu. Reakcję mieszałam 16 h w temperaturze pokojowej, następnie usunęłam rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, a surowy produkt oczyściłam chromatograficznie. Budowę związku otrzymanego na drodze wyżej opisaney reakcji potwierdziłam metodami spektroskopowymi.

W widmie ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) związku **Fp-DTM-Gluc** (Rysunek 48) obecne są charakterystyczne sygnały pochodzące od protonów grup acetylowych - singlet przy 2,02 ppm

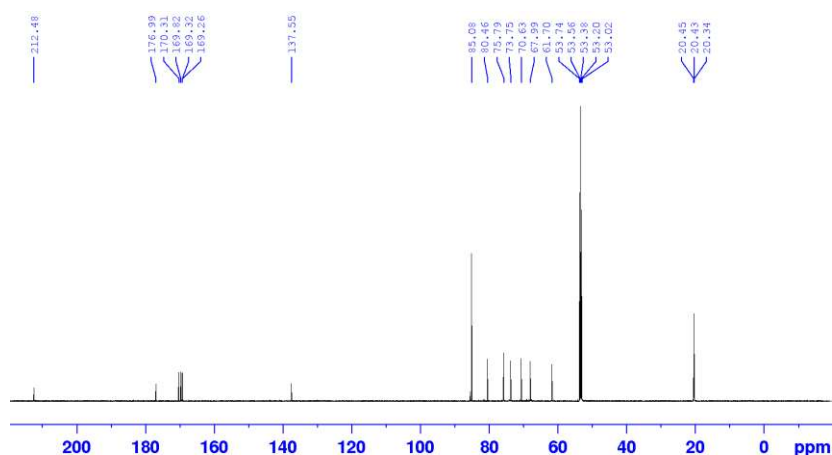
od sześciu protonów, singlet przy 2,05 ppm odpowiadający kolejnym sześciu protonom oraz dublet przy 2,07 ppm, o stałej sprzężenia $J = 7,2$ Hz od dwunastu protonów. Następnie w widmie obecne są sygnały pochodzące od protonów pierścienia cukrowego: multiplet w zakresie 3,87-3,89 ppm odpowiadający dwóm protonom; dwa dublety przy 4,10 i 4,12 ppm o stałych sprzężenia wynoszących $J = 1,8$ Hz odpowiadające jednemu protonowi każdy; dwa dublety przy 4,28 i 4,30 ppm o stałych sprzężenia $J = 4,8$ Hz pochodzące od jednego protonu każdy; multiplet w zakresie 5,03-5,06 ppm od dwóch protonów. Następnie widoczne są dwa nałożone na siebie sygnały - multiplet w zakresie 5,11-5,15 ppm odpowiadający dwóm protonom pierścienia cukrowego oraz singlet przy 5,09 ppm odpowiada 5 protonom pierścienia cyklopentadienylowego, który jest sygnałem potwierdzającym obecność fragmentu metalokarbonylowego w cząsteczce. Tryplet przy 5,28 ppm o stałej sprzężenia $J = 9,3$ Hz od dwóch protonów oraz dublet przy 5,85 ppm o stałej sprzężenia $J = 10,2$ Hz odpowiadający dwóm protonom.



Rysunek 48. Widmo ^1H NMR **Fp-DTM-Gluc** CD_2Cl_2 (600 MHz)

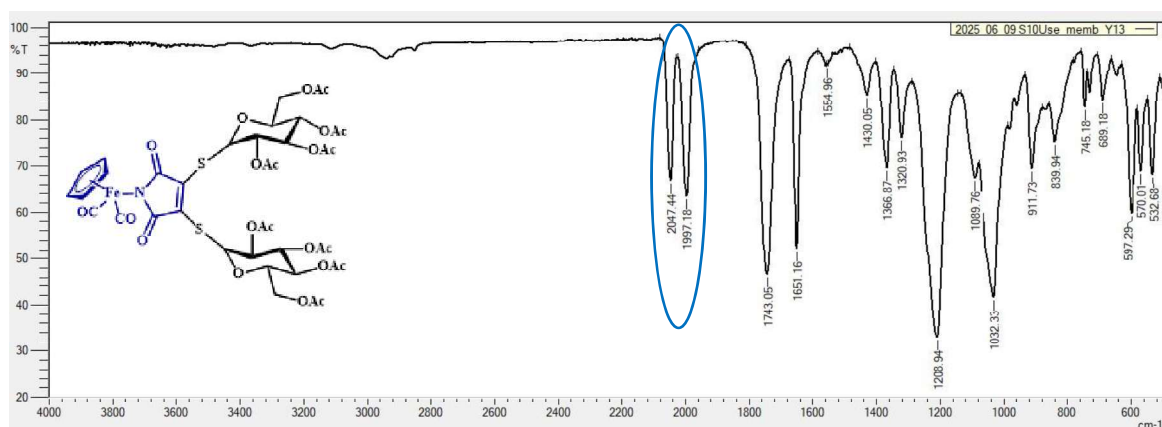
Analiza widma ^{13}C NMR (150MHz, CD_2Cl_2) **Fp-DTM-Gluc** (Rysunek 49) dostarczyła więcej informacji m.in. dotyczących obecnych w strukturze cząsteczki karbonylków - sygnał od atomów węgla grup $\text{C}\equiv\text{O}$ znajduje się przy δ 212,5 ppm, a karbonylowych atomów węgla przy δ : 177,0, 170,3, 169,8, 169,3, 169,2 ppm. Sygnał pochodzący od atomów węgla tworzących wiązanie $\text{C}=\text{C}$ obecny jest przy 137,6 ppm, a następnie sygnał pochodzący od

atomów węgla pierścienia Cp - 85,1 ppm. Następne sygnały: 80,5, 75,8, 73,8, 70,6, 68,0, 61,7, 20,5, 20,4, 20,3 ppm pochodziły od alifatycznych atomów węgla.



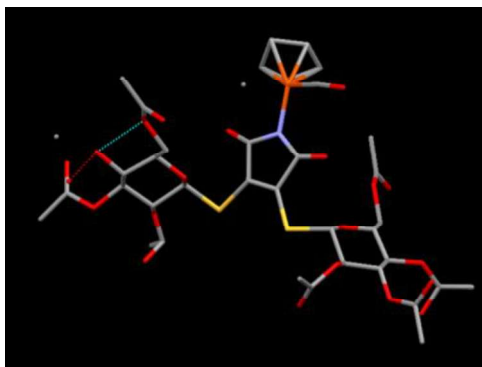
Rysunek 49. Widmo ^{13}C NMR **Fp-DTM-Gluc** CD_2Cl_2 (150 MHz)

W widmie IR **Fp-DTM-Gluc** (Rysunek 50) obecne są charakterystyczne dla pochodnych typu $\text{CpFe}(\text{CO})_2(\eta^1\text{-maleimidato})$ pasma drgań walencyjnych grup $-\text{CO}$ przy 2047 i 1997 cm^{-1} oraz pasma drgań pochodzące od grup karbonylowych przy 1743 cm^{-1} .



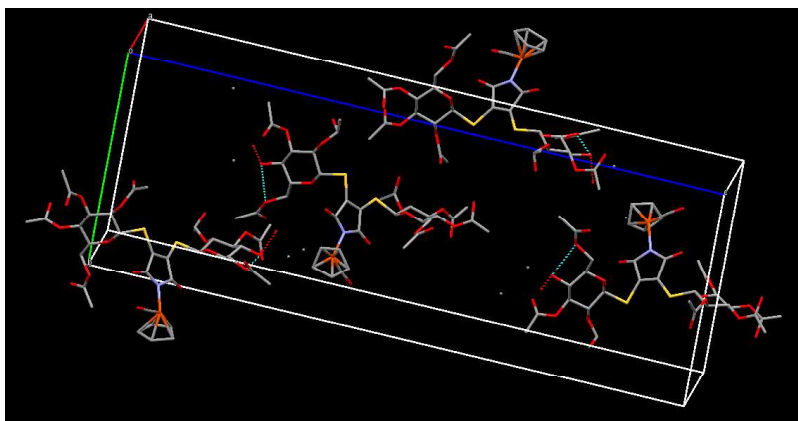
Rysunek 50. Widmo ATR-IR związku **Fp-DTM-Gluc**

Dla związku **Fp-DTM-Gluc** uzyskałam monokryształy, których analiza rentgenostrukturalna dostarczyła interesujących informacji. Analiza rentgenostrukturalna pozwoliła potwierdzić strukturę uzyskanego produktu. Niestety struktura ta nie jest kompletna, ponieważ nie obserwujemy w niej jednego z ligandów CO, którego położenia nie da się ustalić na podstawie otrzymanych wyników. Otrzymane dane nie pozwalają precyzyjnie udokładnić położenia atomów po jednej stronie cząsteczki, natomiast struktura cząsteczkowa jak najbardziej potwierdza otrzymanie koniugatu **Fp-DTM-Gluc** (Rysunek 51).



Rysunek 51. Struktura cząsteczkowa **Fp-DTM-Gluc**

W komórce elementarnej (Rysunek 52) obecne są cztery cząsteczki **Fp-DTM-Gluc** i w odróżnieniu do jej *N*-niepodstawionego analogu, nie obserwujemy tu oddziaływań międzycząsteczkowych.

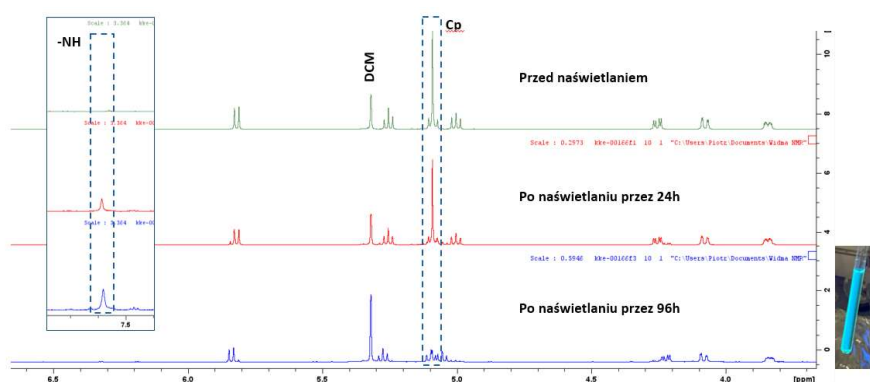


Rysunek 52. Upakowanie w komórce elementarnej **Fp-DTM-Gluc**

Związki metalokarbonylowe będące pochodnymi typu $\text{CpFe}(\text{CO})_2(\eta^1\text{-imidato})$ charakteryzują się dużą wrażliwością na światło. Aspekt ten został wykorzystany w zespole prof. Bogny Rudolf m.in. podczas fotolitycznej degradacji kompleksów metalokarbonylowych w celu otrzymania trudnych do zsyntezowania innymi metodami *N*-niepodstawionych sukcyminidów (*Organometallics*, 2021, 40). Z tego powodu podjęłam próbę sprawdzenia czy pochodna **Fp-DTM-Gluc** będzie również ulegać degradacji pod wpływem naświetlania światłem widzialnym, i czy w konsekwencji utraci grupę metalokarbonylową.

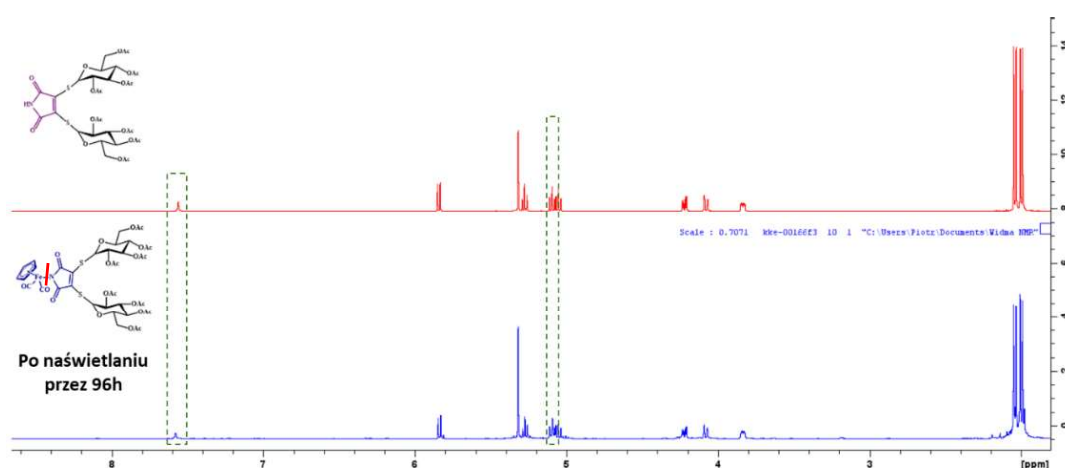
Eksperyment wykonałam na próbce przygotowanej w rurce do analizy spektroskopowej NMR - 0,008 mmol **Fp-DTM-Gluc** rozpuściłam w 60 μl CD_2Cl_2 , ($c=0,13$ mmol/ml) i zarejestrowałam widmo protonowe. Aby móc porównać widma ^1H NMR związku **Fp-DTM-Gluc** po naświetlaniu i zdefiniować produkt naświetlania, zarejestrowałam widmo protonowe **DTM-Gluc** w tym samym rozpuszczalniku. Następnie rurkę z **Fp-DBM-Gluc**

naświetlałam przez 96 godzin światłem widzialnym (żarówka o mocy 35 W (12V), zachowując stały 20 cm dystans między źródłem światła, a rurką) rejestrując widmo protonowe co 24 godziny (Rysunek 53).



Rysunek 53. Porównanie widm ^1H NMR Fp-DBM-Gluc w CD_2Cl_2 przed i w trakcie naświetlania (600 MHz)

Podczas naświetlania obserwowałam pojawienie się fluorescencji w roztworze. Po upływie 96 godzin od rozpoczęcia naświetlania, zarejestrowałam widmo ^1H NMR gdzie zaobserwowałam brak charakterystycznego sygnału od protonów pierścienia Cp (singletu przy 5,09 ppm), co sugeruje całkowitą degradację fragmentu metalokarbonylowego. Dodatkowo w widmie obecny jest nowy sygnał - poszerzony singlet przy 7,58 ppm od jednego protonu grupy -NH. Porównując widma protonowe pochodnej **DTM-Gluc** oraz produktu naświetlania stwierdziłam, że ich widma się nie różnią, zatem produktem otrzymanym w wyniku naświetlania **Fp-DTM-Gluc** jest **DTM-Gluc** (Rysunek 54).



Rysunek 54. Porównanie widm ^1H NMR **DTM-Gluc** z widmem produktu naświetlania **Fp-DTM-Gluc** CD_2Cl_2 (600 MHz)

Wyżej opisane pochodne zostały scharakteryzowane metodami spektroskopowymi - wartości λ_{\max} oraz molowe współczynniki ekstynkcji ϵ zostały zebrane w Tabeli 3. Dla **DTM-Cys** i **DTM-Gluc** zarejestrowałam widma elektronowej emisji. Roztwory **DTM-Cys** w acetonitrylu, metanolu i wodzie wykazywały słabą fluorescencję z maksimum emisji odpowiednio przy 501, 527 i 550 nm - dodatkowo związek ten wykazuje zjawisko solwatochromizmu, a wydajność kwantowa fluorescencji w acetonitrylu związku **DTM-Cys** wynosiła 0,04. **DTM-Gluc** w roztworze w acetonitrylu wykazywał fluorescencję z maksimum emisji przy 494 nm, a wydajność kwantowa fluorescencji w acetonitrylu wynosi 0,12. Metalokarbonyłowe pochodne - **Fp-DTM-Cys** i **Fp-DTM-Gluc** nie wykazują fluorescencji, co najprawdopodobniej związane jest z obecnością ciężkiego atomu we fragmencie metalokarbonylowym, który jest przyłączony do pierścienia ditiomaleimidowego. Ponadto, zaobserwowałam stopniowy wzrost intensywności emisji w czasie dla związków **Fp-DTM-Cys** i **Fp-DTM-Gluc**, zarówno dla roztworu w acetonitrylu, jak i w roztworze buforu PBS, co jest zgodne z postępującym rozkładem i przekształcaniem do organicznych pochodnych **DTM-Cys** i **DTM-Gluc**, co potwierdziłam przeprowadzając eksperyment naświetlania **Fp-DTM-Gluc**, którego produktem jest **DTM-Gluc**.

Związek	λ_{\max} (nm)	ϵ (L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹)
Fp-BM	369	730
Fp-DBM	367	830
Fp-TM-Cys	nietrwały	
Fp-DTS-Cys	brak λ_{\max}	
Fp-DTM-Cys	386	4260
	308	12840
Fp-DTM-Gluc	387	1450
	312	5850
BM	277	270
DBM	303	1910
TM-Cys	340	3370
DTM-Cys	394	3340
DTM-Gluc	371	3020
	250	6200

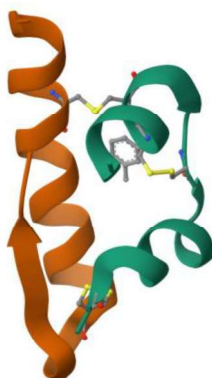
Tabela 3. Wartości λ_{\max} oraz molowego współczynnika ekstynkcji ϵ dla zsyntezowanych pochodnych

5.2. Zastosowanie *N*-niepodstawionych bromomaleimidów oraz ich metalokarbonylowych pochodnych w reakcjach modyfikacji biomolekuł

Poszukiwanie nowych metod detekcji biomolekuł, które ułatwiłyby śledzenie procesów zachodzących w żywych organizmach na poziomie molekularnym z punktu widzenia medycyny oraz biologii molekularnej jest wysoce pożądane. Techniki takie jak biodetekcja oraz bioobrazowanie umożliwiają badanie procesów biologicznych i patologicznych w żywych komórkach. Zaproponowane w projekcie znaczniki (*N*-niepodstawione bromomaleimidy) ze względu na silną fluorescencję powstających w wyniku substytucji bromu dtiomaleimidów oraz ich metalokarbonylowe pochodne ze względu na łatwą detekcję karbonylków przy użyciu spektroskopii IR wprowadzone do cząsteczek białek znacząco ułatwią detekcję zmodyfikowanych biomolekuł metodami spektroskopowymi.

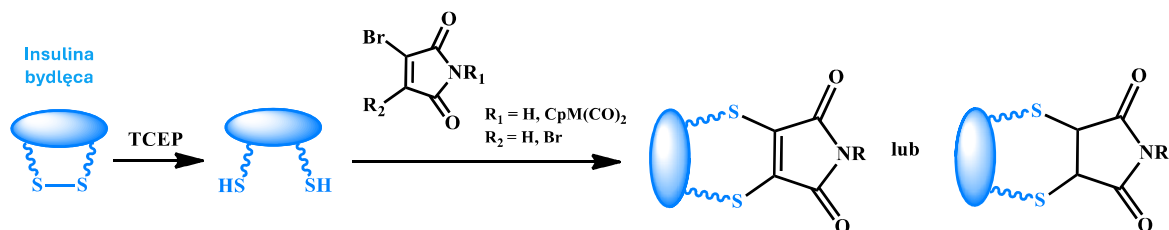
Opisane w poprzednim podrozdziale funkcjonalizacje prostych cząsteczek o znaczeniu biologicznym stanowiły dla mnie punkt wyjścia do dalszych badań, które polegały na modyfikacji mostków dwusiarczkowych peptydów oraz białek. Kolejnym etapem moich badań było otrzymanie biokoniugatów w reakcji z biomolekułami - insuliną oraz lizozymem. Tę część badań wykonałam pod opieką prof. Michèle Salmain oraz dr Nathalie Fischer-Durand podczas stażu w laboratorium Institut Parisien de Chimie Moléculaire.

W pierwszej kolejności podjęłam próbę modyfikacji hormonu peptydowego - insuliny bydlęcej (**Ins**), która w swej strukturze zawiera trzy mostki dwusiarczkowe (jeden wewnątrzłańcuchowy oraz dwa międzylańcuchowe) - Rysunek 55.



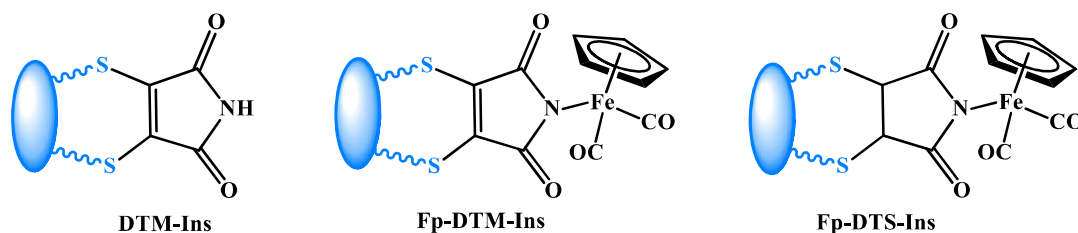
Rysunek 55. Struktura insuliny bydlęcej **Ins** (<https://www.rcsb.org/structure/4E7V>)

Każdorazowo procedurę rozpoczynałam od rozpuszczenia insuliny w 0,01M roztworze kwasu solnego, następnie regulowałam pH do ok. 7 używając 0,5M roztworu NaOH, a następnie dodawałam roztwór buforowy (NaPB, pH = 7,8) otrzymując klarowny roztwór insuliny. Do tak przygotowanego roztworu wprowadzałam tris(2-karboksyetylo)fosfinę rozpuszczoną w roztworze buforowym NaPB w celu redukcji mostka dwusiarczkowego, a następnie roztwór znacznika w DMSO (Schemat 30). Modyfikacje prowadziłam przez 24h w temperaturze 35°C w celu uniknięcia degradacji białka.



Schemat 30. Reakcja **Ins** z **DBM**, **Fp-BM** i **Fp-DBM**

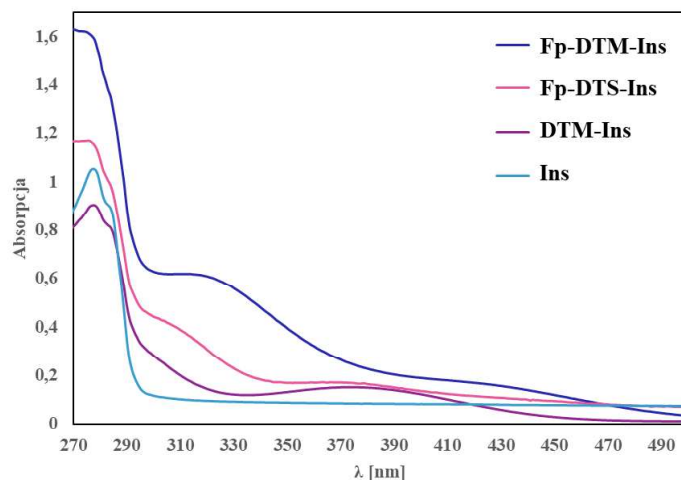
Na drodze modyfikacji przedstawionej na Schemacie 30 podjęłam próbę otrzymania trzech biokoniugatów insuliny bydlęcej przedstawionych na Rysunku 56. Otrzymane biokoniugaty oczyściłam stosując specjalistyczne kolumny pułapkowe HiTrap desalting columns, które umożliwiły mi rozdział związków małocząsteczkowych (nadmiaru nieprzereagowanego znacznika) od związków wysokocząsteczkowych. Przy użyciu HPLC oraz technik spektrometrii masowej MALDI-TOF podjęłam próbę charakterystyki otrzymanego biokoniugatu. Dla każdego otrzymanego produktu zarejestrowałam widmo UV/Vis w celu porównania z widmem niezmodyfikowanej insuliny bydlęcej, a dla biokoniugatów zawierających fragment metalokarbonylowy przeprowadziłam badania stężenia fragmentów metalokarbonylowych w biokoniugatach za pomocą spektroskopii IR.



Rysunek 56. Biokoniugaty **DTM-Ins**, **Fp-DTM-Ins**, **Fp-DTS-Ins**

Widma absorpcyjne (Rysunek 57) wszystkich trzech biokoniugatów różnią się nie tylko od widma absorpcyjnego niezmodyfikowanej insuliny bydlęcej, ale różnią się też od siebie. Dla

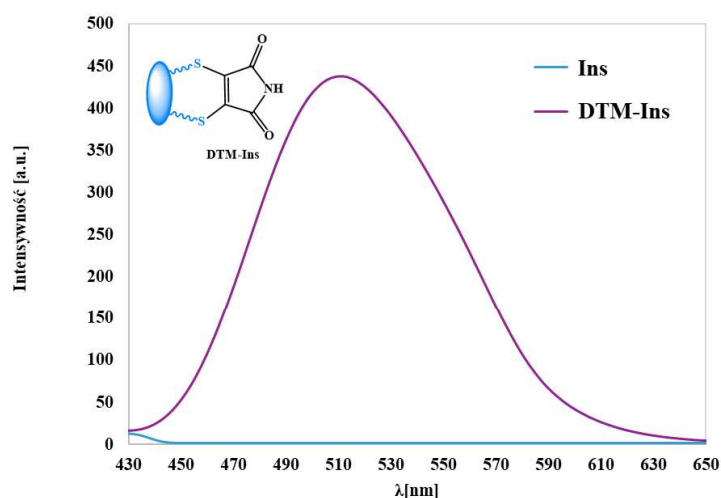
każdego ze związków zaobserwowałam maksimum absorpcji przy innej długości fali. Wynika to z różnicy w budowie zastosowanych znaczników.



Rysunek 57. Widma absorpcyjne **Ins** oraz biokoniugatów **DTM-Ins**, **Fp-DTM-Ins**, **Fp-DTS-Ins**

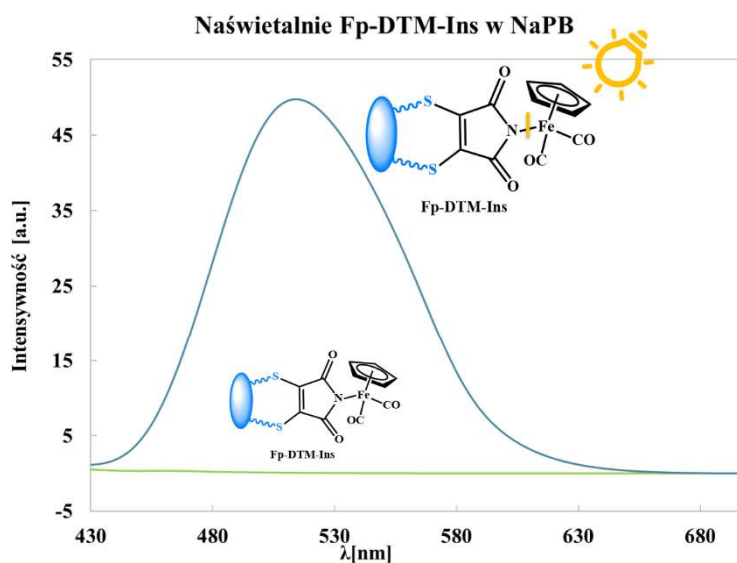
Podobnie jak w przypadku prostych biocząsteczek (pochodnej **Cys** i **Gluc**) na drodze modyfikacji biocząsteczki dibromomaleimdem otrzymałam biokoniugat **DTM-Ins**, który wykazuje fluorescencję - w tym przypadku żółtą. Obecność fragmentu metalokarbonylowego w cząsteczce biokoniugatu **Fp-DTM-Ins** w tym przypadku również skutkowałą brakiem fluorescencji.

Dla biokoniugatu **DTM-Ins** zarejestrowałam widmo elektronowe emisji (Rysunek 58). Związek ten w roztworze buforowym wykazywał fluorescencję z maksimum emisji przy 512 nm.



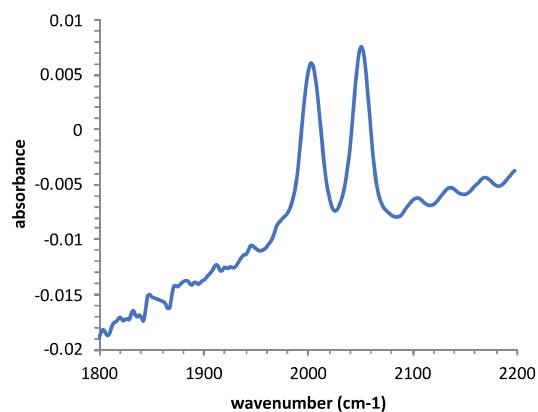
Rysunek 58. Widmo emisyjne **Ins** oraz **DTM-Ins**

Kolejnym eksperymentem jaki przeprowadziłam była próba naświetlenia biokoniugatu **Fp-DTM-Ins**. Biokoniugat zawierający fragment metalokarbonylowy naświetlałam przez 2 godziny światłem widzialnym. Kontrolę opisanego eksperymentu prowadziłam rejestrując widmo emisyjne naświetlanej próbki (Rysunek 59). Widma zarejestrowane przed i po naświetlaniu światłem widzialnym wskazują, że pod wpływem naświetlania tworzy się produkt wykazujący fluorescencję. Wiąże się to, podobnie jak w przypadku koniugatu **Fp-DBM-Gluc** z degradacją fragmentu metalokarbonylowego pod wpływem światła, dzięki czemu w procesie naświetlania powstaje biokoniugat **DTM-Ins**, który wykazuje fluorescencję ($\lambda_{\max}=516\text{nm}$).



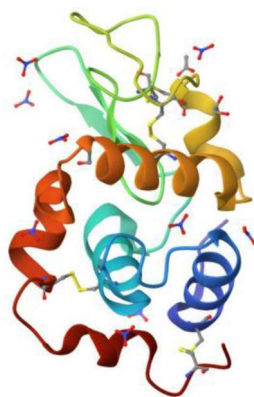
Rysunek 59. Widmo emisyjne biokoniugatu **Fp-DTM-Ins** przed i po naświetlaniu

Degradację fragmentu metalokarbonylowego w procesie naświetlania potwierdziłam rejestrując widmo IR koniugatu przed i po naświetlaniu światłem widzialnym. Próbkę do analizy jakościowej przygotowywałam rozcieńczając **Fp-DTM-Ins** w 20 mM AcONH₄, a następnie nanosiłam po 4 μL roztworu, w dwóch powtórzeniach, na membrany nitrocelulozowe. Membranę kontrolną przygotowywałam poprzez naniesienie 4 μL 20 mM AcONH₄. Tak przygotowane membrany pozostawiałam do wysuszenia na co najmniej 2 godziny w temperaturze pokojowej, w ciemności, a następnie rejestrowałam widma IR w zakresie 1800-2200 cm^{-1} stosując odpowiednią przystawkę. Początkowo dla biokoniugatu w widmie IR obecne były pasma drgań walencyjnych karbonylków połączonych z metalem (Rysunek 60). Po zakończeniu eksperymentu i powtórnym zarejestrowaniu widma IR produktu naświetlania pasma drgań walencyjnych karbonylków nie były obecne w widmie co świadczy o degradacji fragmentu Fp.



Rysunek 60. Widmo IR **Fp-DTM-Ins** przed naświetlaniem

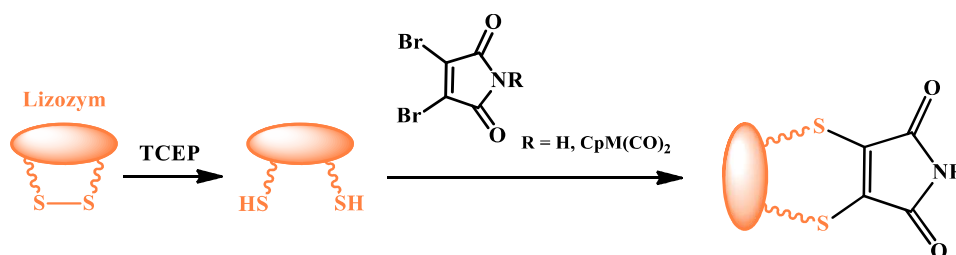
Następnie podjęłam próbę modyfikacji lizozymu (**Liz**), który zawiera cztery mostki dwusiarczkowe w swej strukturze (Rysunek 61).



Rysunek 61. Struktura lizozymu **Liz**

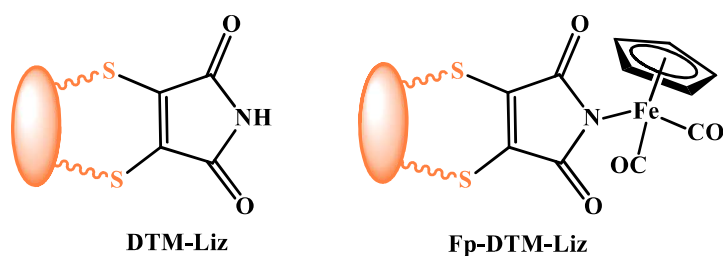
(<https://www.rcsb.org/structure/2VB1>)

Każdorazowo procedurę rozpoczynałam od rozpuszczenia białka w roztworze buforowym, a następnie do roztworu białka wprowadzałam odczynnik redukujący TCEP rozpuszczony w roztworze buforowym NaPB w celu redukcji mostka dwusiarczkowego, a następnie roztwór znacznika w DMSO (Schemat 31). Modyfikacje prowadziłam przez 24 h w temperaturze 35°C w celu uniknięcia degradacji białka.



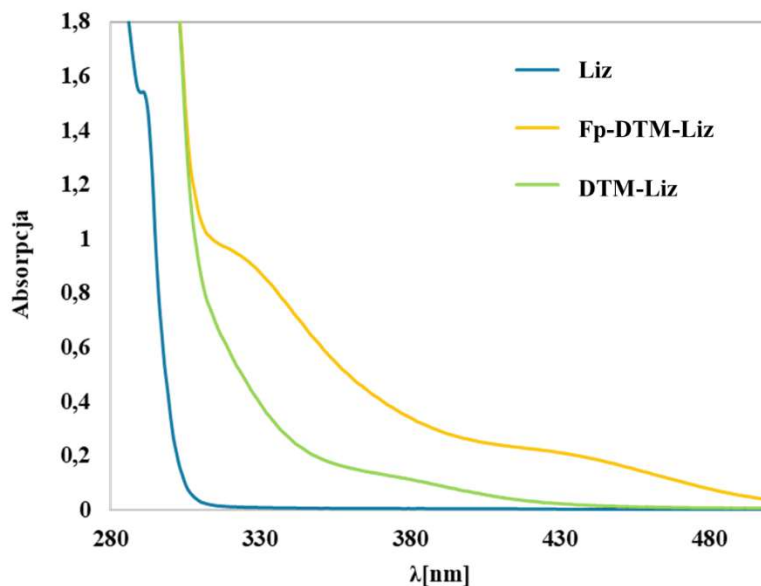
Schemat 31. Reakcja **Liz** z **DBM** i **Fp-DBM**

Na drodze modyfikacji przedstawionej na Schemacie 31 otrzymałam dwa biokoniugaty lizozymu przedstawionych na Rysunku 62. Otrzymane biokoniugaty oczyściłam stosując specjalistyczne kolumny pułapkowe HiTrap desalting columns. Przy użyciu technik HPLC oraz technik spektrometrii masowej MALDI-TOF podjęłam próbę charakterystyki mieszaniny biokoniugatu oraz niezmodyfikowanej biocząsteczki. Dla otrzymanych produktów modyfikacji zarejestrowałam widmo UV/Vis w celu porównania z widmem niezmodyfikowanego **Liz**, a dla biokoniugatu zawierającego fragment metalkarbonylowy przeprowadziłam badania stężenia fragmentu metalokarbonylowego w biokoniugacie za pomocą analizy IR.



Rysunek 62. Biokoniugaty **DTM-Liz** i **Fp-DTM-Liz**

Widma absorpcyjne (Rysunek 63) biokoniugatów różnią się od widma absorpcyjnego niezmodyfikowanego lizozymu długością fali, przy której znajduje się maksimum absorpcji. Wynika to z różnicy w budowie zastosowanych znaczników.

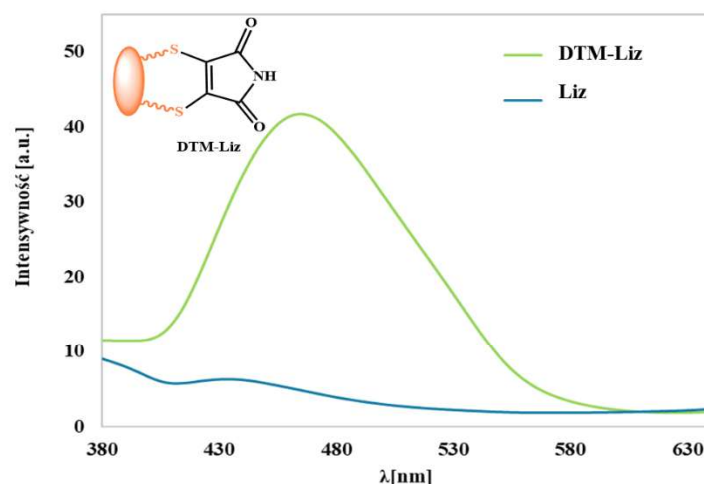


Rysunek 63. Widma absorpcyjne **Liz** oraz biokoniugatów **DTM-Liz**, **Fp-DTM-Liz**

Podobnie jak w przypadku biokoniugatów **Ins**, używając dibromomaleimidu jako znacznika otrzymałam produkt, który wykazuje żółtą fluorescencję, natomiast obecność

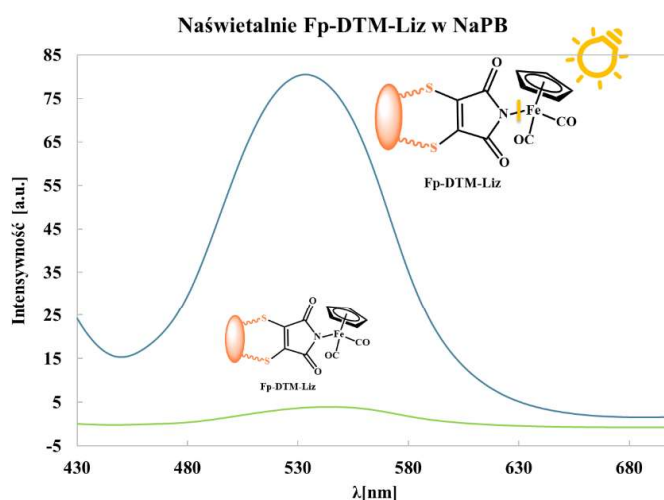
fragmentu metalokarbonylowego w strukturze białka skutkowała brakiem fluorescencji biokoniugatu.

Dla biokoniugatu **DTM-Liz** wykazującego fluorescencję zarejestrowałam widmo elektronowe emisji (Rysunek 64). Związek ten w roztworze buforowym wykazywał fluorescencję z maksimum emisji przy 469 nm.



Rysunek 64. Widmo emisyjne lizozymu oraz biokoniugatu **DTM-Liz**

Analogicznie jak dla biokoniugatu **Fp-DTM-Ins** przeprowadziłam próbę naświetlenia **Fp-DTM-Liz**. Biokoniugat zawierający fragment metalokarbonylowy naświetlałam przez 2 h światłem widzialnym otrzymując produkt wykazujący fluorescencję. Kontrolę opisanego eksperymentu prowadziłam używając metod spektroskopowych - analizując widmo emisyjne (Rysunek 65) przed i po naświetlaniu. Produkt naświetlania **Fp-DTM-Liz** wykazuje maksimum emisji przy 535 nm.



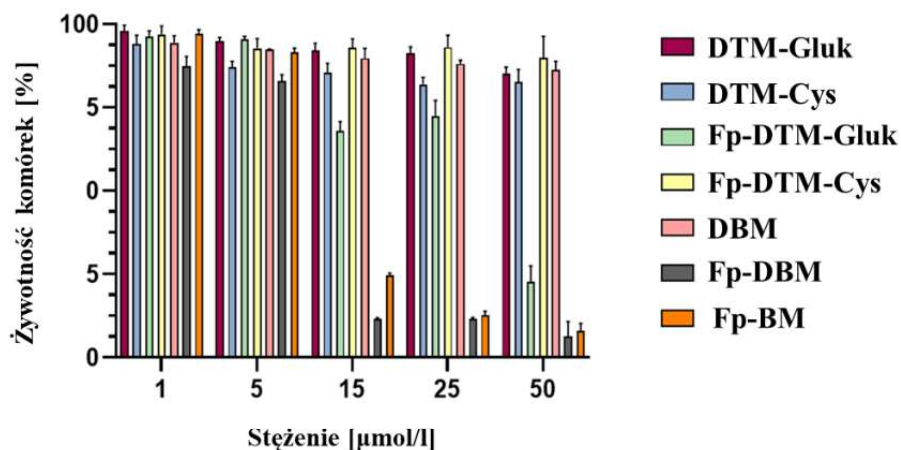
Rysunek 65. Widmo emisyjne biokoniugatu **Fp-DTM-Liz** przed i po naświetlaniu

W tym przypadku degradację fragmentu metalokarbonylowego w procesie naświetlania również potwierdziłam rejestrując widmo IR koniugatu przed i po naświetlaniu światłem widzialnym. W widmie IR **Fp-DTM-Liz** przed naświetlaniem obecne były pasma drgań rozciągających ligandów -CO, a po zakończeniu eksperymentu i powtórnym zarejestrowaniu widma IR produktu naświetlania pasma drgań walencyjnych karbonylków nie były obecne w widmie, co jest związane z degradacją fragmentu Fp.

5.3. Badania aktywności biologicznej bromomaleimidów oraz ich metalokarbonylowych pochodnych

Z wcześniej przeprowadzonych badań w Katedrze Chemii Organicznej wynika, że wśród badanych kompleksów żelazowych zawierających ligand maleimidato, **FpM** wykazuje najwyższą cytotoksyczność wobec komórek nowotworowych HL-60 (linia komórkowej ludzkiej białaczki promielocytowej), jak również nie jest toksyczny wobec komórek prawidłowych (S. Das, et al., *Scientific Reports*, **2024**, 14, 5634). Ciekawym wydawało się przeprowadzenie podobnych badań biologicznych dla pochodnych zsyntezowanych w ramach pracy doktorskiej.

W zespole dr hab. Sylwii Michlewskiej z Pracowni Obrazowania Mikroskopowego i Specjalistycznych Technik Biologicznych Wydziału BiOŚ UŁ został przebadany wpływ **DTM-Cys**, **Fp-DTM-Cys**, **DTM-Gluc**, **Fp-DTM-Gluc** oraz **DBM**, **Fp-DBM** i **Fp-BM** na żywotność komórek potrójnie negatywnego nowotworu piersi - MDA-MB-231. Komórki zostały wystawione na działanie 5 różnych stężeń każdego związku w ciemności, żywotność komórek została wyznaczona za pomocą testu MTT po 24 h (Rysunek 66). Oznaczono IC_{50} (stężenie, przy którym żywotność komórek jest zmniejszona o 50%) dla pochodnych **Fp-DBM**, **Fp-BM** i **Fp-DTM-Gluc**, a wartości zostały podane w Tabeli 4. Testy cytotoksyczności wykazały, że pochodne: **Fp-DBM**, **Fp-BM** i **Fp-DTM-Gluc** wywołały zależny od stężenia spadek żywotności badanych komórek (Tabela 4). W przypadku **DBM** oraz koniugatów **DTM-Cys** i **DTM-Gluc**, a także **Fp-DTM-Cys**, stwierdzono, że związki te nie wykazują toksyczności wobec komórek MDA-MB231 w testowanych warunkach.



Rysunek 66. Wartości cytotoksyczności związków po 24-godzinnej inkubacji względem komórek raka piersi MDA-MB-231

Związek	IC ₅₀ (µM)
Fp-DBM	8.4 ± 1.5
Fp-BM	10.5 ± 0.5
Fp-DTM-Gluc	17.4

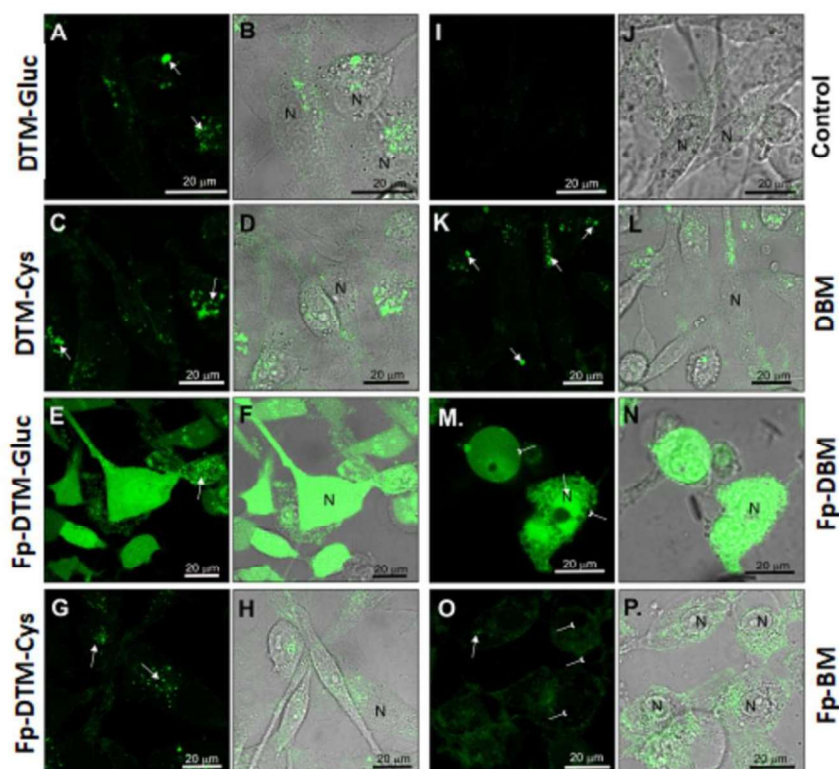
Tabela 4. Wartości IC₅₀ **Fp-DBM**, **Fp-BM** i **Fp-DTM-Gluc** dla komórek MDA-MB-231 po 24-godzinnej inkubacji

Prawdopodobnie, cytotoksyczność **Fp-DTM-Gluc** wobec komórek MDA-MB-231 wynika z obecności fragmentu Fp oraz jego zdolności do uwalniania tlenku węgla, ponieważ jego organiczny analog **DTM-Gluc** nie wykazuje cytotoksyczności. Obecność pierścienia cukrowego w strukturze związku **Fp-DTM-Gluc** może sprzyjać lepszemu wnikananiu tego związku do wnętrza komórki, analogiczna **Fp-DTM-Cys** nie wykazała cytotoksyczności względem komórek MDA-MB-231 nawet przy stężeniu 50 µM.

W przypadku pochodnych **DBM** oraz **Fp-DBM** zaobserwowano, że jedynie **Fp-DBM** wykazuje cytotoksyczność w stosunku do komórek MDA-MB-231. Chociaż obydwa te związki (**DBM**, **Fp-DBM**) wykazują wysoką reaktywność wobec tioli, co może wpływać na struktury organelli komórkowych. Wynik ten podkreśla rolę grupy Fp, która ułatwia wchłanianie związku przez komórki.

Ponadto, *N*-podstawienie grupą Fp zapobiega szybkiemu hydrolizowaniu pierścienia maleimidowego, który bez obecności fragmentu Fp połączonego z atomem azotu w roztworze ulega otwarciu.

Następnie w celu zobrazowania wpływu otrzymanych biokoniugatów na komórki MDA-MB-231 przeprowadzony został eksperyment bioobrazowania przy użyciu mikroskopii konfokalnej. Do komórek MDA-MB-231 wprowadzono po 15 μ M każdej pochodnej, a następnie komórki były inkubowane przez 2 godziny w ciemności. Po upływie czasu inkubacji wykonane zostały obrazy fluorescencyjne i transmisyjne komórek w kanale zielonym przy użyciu mikroskopu konfokalnego (Rysunek 67). Parametry wzbudzenia i emisji były identyczne dla próbki kontrolnej oraz dla próbek inkubowanych z badanymi związkami.



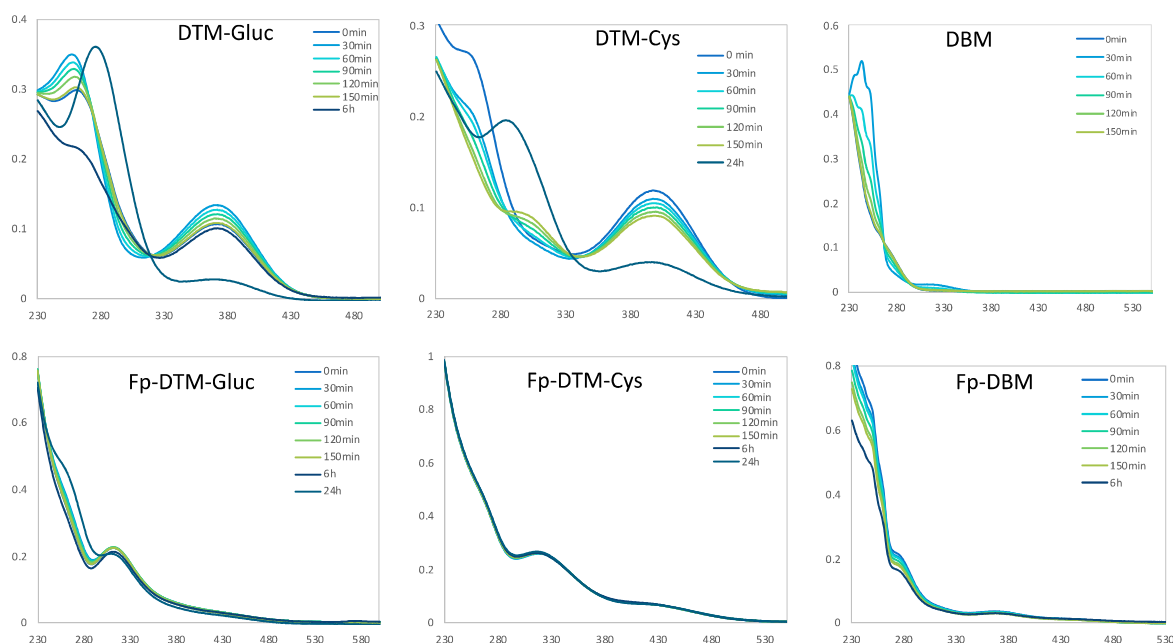
Rysunek 67. Porównanie fluorescencji badanych związków w komórkach MDA-MB-231 po 2- godzinnej inkubacji (stężenie **15 mM**)- Wzbudzenie - 405 nm, moc lasera 2%; Detekcja - 450-600 nm, PMT 900; strzałki - komórki oderwane od podłoża, odwrotne strzałki - komórki pęczniejące

Na podstawie wyników można zauważyć, że w komórkach inkubowanych z **DTM-Gluc**, **DTM-Cys**, **Fp-DTM-Cys** i **DBM** wykryto stosunkowo słaby wewnątrzkomórkowy sygnał fluorescencyjny, pochodzący głównie z owalnych i ziarnistych struktur, najprawdopodobniej mitochondriów. Z kolei, komórki inkubowane z **Fp-BM** wykazywały rozproszoną fluorescencję cytoplazmatyczną, a komórki traktowane **Fp-DTM-Gluc** i **Fp-DBM** wykazywały bardzo intensywny sygnał fluorescencyjny z maksimum około 520 nm, a wzór barwienia obejmował głównie jądro, cytoplazmę i mitochondria. Ponadto, dla komórek

inkubowanych z **Fp-DTM-Gluc**, **Fp-DBM** i **Fp-BM** zaobserwowano uszkodzenia błony komórkowej.

Fluorescencja w komórkach inkubowanych z **Fp-DTM-Gluc** i **Fp-DBM** była najwyższa (25-30 razy wyższa niż dla próby kontrolnej) mimo, że pierwotnie oba te związki nie wykazują emisji w roztworach. Oznacza to, że prawdopodobnie ulegają one przemianom chemicznym wewnątrz komórek. W przypadku **Fp-DTM-Gluc** intensywne fluorescencje wewnątrzkomórkowa najprawdopodobniej wynika z utraty fragmentu Fp po 2 godzinach inkubacji, prowadząc do powstania wykazującego fluorescencję **DTM-Gluc**. Prawdopodobnie, obecność fragmentu metalokarbonylowego, sprzyja przenikaniu związku przez błony komórkowe, ponieważ zablokowanie atomu azotu w pierścieniu maleimidowym zapobiega jego otwarciu na drodze hydrolizy. Słaba fluorescencja komórek inkubowanych z **DTM-Cys** i **DTM-Gluc** może więc wynikać z różnej trwałości pierścienia ditiomaleimidowego, który podstawiony fragmentem Fp (**Fp-DTM-Gluc**) nie ulega hydrolizie przy wejściu do komórki, a następnie traci fragment Fp i wykazuje fluorescencję. Wyjaśnieniem intensywnej fluorescencji komórek inkubowanych z **Fp-DBM** jest prawdopodobnie związane z przekształceniem **Fp-DBM** w **DTM**, na drodze reakcji z tiolami obecnymi w komórce, oraz utratą fragmentu metalokarbonylowego.

W celu potwierdzenia tezy, iż zablokowanie grupy -NH maleimidu fragmentem metalokarbonylowym hamuje hydrolizę i otwieranie się pierścienia maleimidowego przeprowadziłam eksperyment mający na celu określenie trwałości pochodnych **DBM**, **Fp-DBM**, **DTM-Cys**, **DTM-Gluc**, **Fp-DTM-Cys** i **Fp-DTM-Gluc**. Stabilność dibromomaleimidów oraz ditiomaleimidów w buforze PBS (pH 7,4) monitorowałam na drodze spektroskopii absorpcyjnej (Rysunek 68). Widmo absorpcyjne **DBM** ulegało zmianom w czasie, czemu towarzyszył stopniowy zanik pasma absorpcyjnego przy 243 nm. W przypadku **Fp-DBM** nie zaobserwowałam istotnych zmian widma absorpcyjnego w ciągu 24 h. Analogiczną tendencję zaobserwowałam dla pochodnych ditiomaleimidów: w widmach absorpcyjnych **DTM-Cys** oraz **DTM-Gluc** obserwowałam powolne zmiany w ciągu 150 min., natomiast w przypadku **Fp-DTM-Cys** i **Fp-DTM-Gluc** widma absorpcyjne nie uległy zmianie przez 24 h. Wyniki te wskazują, że przyłączenie fragmentu Fp do atomu azotu pierścienia maleimidowego skutecznie chroni zarówno pochodne dibromomaleimidu, jak i ditiomaleimidu przed hydrolizą.



Rysunek 68. Widma absorpcyjne rejestrowane w zmiennym czasie, w celu sprawdzenia trwałości **DBM**, **Fp-DBM**, **DTM-Cys**, **DTM-Gluc**, **Fp-DTM-Cys** i **Fp-DTM-Gluc** w roztworze PBS

Należy zauważyć, że eksperymenty dotyczące żywotności komórek i przenikaniu związku przez błony komórkowe przeprowadzono w ciemności, tak że utrata Fp i następujące uwolnienie -CO obserwowane dla pochodnych Fp zachodzi poprzez mechanizm niezależny od światła.

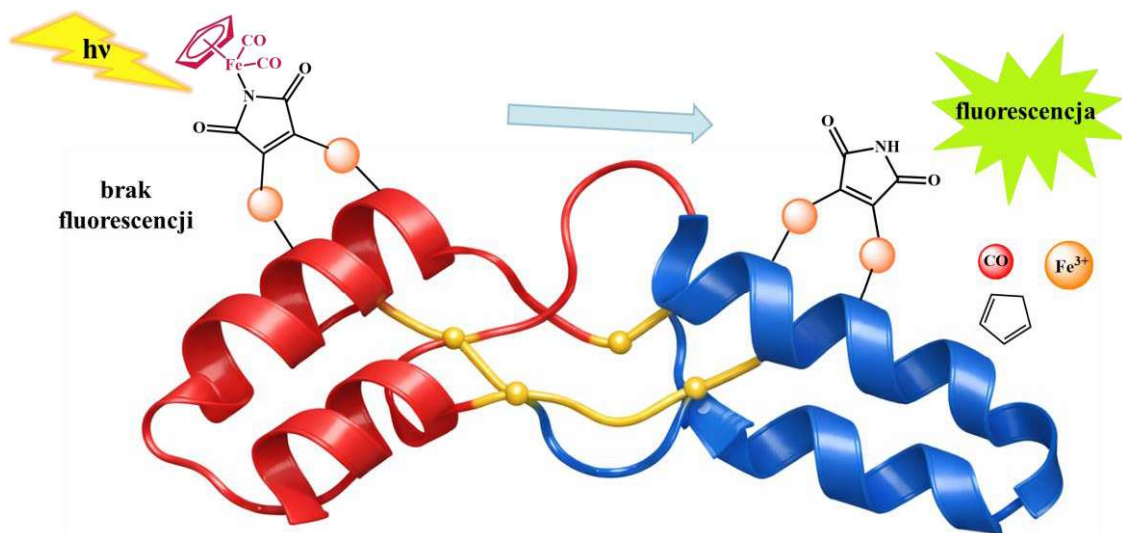
Dane uzyskane dzięki bioobrazowaniu na drodze mikroskopii konfokalnej dostarczają istotnych informacji na temat aktywności biologicznej badanych związków oraz specyficznej roli fragmentu metalokarbonylowego w przenikaniu do komórek. Ponadto, rozpad w komórce fragmentu metalokarbonylowego dostarcza do komórek dodatkowy czynnik - uwalnianie jest CO.

Bromopochodne maleimidu **BM** i **DBM** oraz ich metalokarbonylowe pochodne **Fp-BM** i **Fp-DBM**, łatwo reagują z tiolami (pochodnymi cysteiny i tioglukozy) i mogą pełnić funkcję związków stosowanych do modyfikacji typu rebridging mostków dwusiarczkowych w białkach (np. insuliny bydlęcej).

Badania biologiczne wykazały cytotoksyczność metalokarbonylowych pochodnych wobec komórek potrójnie negatywnego raka piersi, podczas gdy ich analogi organiczne nie wykazywały toksycznego wpływu na badane komórki. Można to wyjaśnić obecnością fragmentu Fp, który sprzyja przyswajaniu związku przez komórki, zapobiega otwarciu

pierścienia na drodze hydrolizy oraz uwalnia bioaktywne cząsteczki, takie jak tlenek węgla i jon Fe^{3+} . Właściwości fluorescencyjne **Fp-DBM** i **Fp-DTM-Gluc** okazały się niezwykle użyteczne do uzyskania informacji na temat ich przemian wewnątrzkomórkowych, co potwierdziły dane otrzymane na drodze eksperymentu bioobrazowania przy użyciu mikroskopii konfokalnej. Intensywna fluorescencja komórek po wprowadzeniu kompleksów wskazuje, że oba związki utraciły fragment metalokarbonylowy, a w przypadku **DBM**, zaszła reakcja z tiolami obecnymi w komórce, co skutkowało powstaniem pochodnej **DTM**, która wykazuje fluorescencję. Wpływ grupy Fp na aktywność biologiczną pochodnych **Fp-DTM** wydaje się niezwykle ciekawy, jednak mechanizm jej działania wymaga dalszych badań.

Otrzymane biokonjugaty maleimidowe **Fp-DTM-Cys**, **Fp-DTM-Gluc**, **Fp-DTM-Ins** oraz **Fp-DTM-Liz** wykazują typowe pasma absorpcji w zakresie średniej podczerwieni, związane z obecnością dwóch ligandów karbonylkowych, natomiast nie wykazują właściwości fluorescencyjnych. Ich organiczne analogi - **DTM-Cys**, **DTM-Gluc**, **DTM-Ins** oraz **DTM-Liz**, wykazują intensywną fluorescencję. Naświetlanie światłem widzialnym pochodnych metalokarbonylowych skutkuje degradacją fragmentu metalokarbonylowego i uwolnieniem -CO. Związki te są nowym przykładem związków typu „photo-CORMs”. Pod wpływem naświetlania światłem widzialnym pochodne **Fp-DTM-Cys**, **Fp-DTM-Gluc**, **Fp-DTM-Ins**, **Fp-DTM-Liz** zmieniają właściwości spektroskopowe ze znaczników IR na znaczniki fluorescencyjne, co wiąże się z utratą fragmentu metalokarbonylowego (Rysunek 69). Jest to pierwszy przykład związków, które uwalniają tlenek węgla i w tym samym czasie dochodzi do emisji fluorescencji. Ze względu na tę właściwość związki te wydają się szczególnie interesujące pod kątem aplikacyjności jako znaczniki biomolekuł. Ponadto, są łatwe do detekcji metodami spektroskopowymi co czyni je potencjalnymi kandydatami do dalszych badań.



Rysunek 69. Schemat działania nowych sond typu „photo-CORMs”

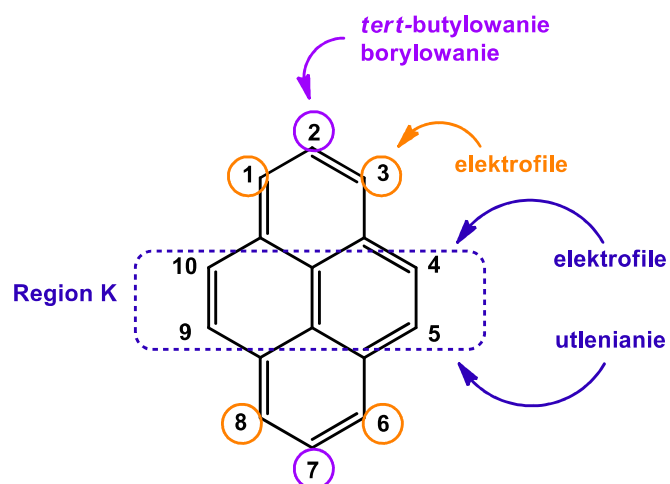
Opisane wyżej wyniki stanowiły postawę publikacji, której jestem współautorką, pt. „*Metallocarbonyl bromomaleimide derivatives for thiol bioconjugation and disulfide bridging: spectroscopic and biological properties*”, który został opublikowany w czasopiśmie Dalton Transactions (*Dalton Transactions*, **2025**, 54, 16864-16875).

5.4. Synteza nowych pochodnych pirenu zawierających fragment cyklooktynu

Znakowanie fluorescencyjne polega na reakcji grupy funkcyjnej znacznika luminescencyjnego z odpowiednią grupą funkcyjną biocząsteczki. Znajomość budowy biomolekuł, reaktywności grup funkcyjnych i mechanizmów zachodzących reakcji umożliwia inteligentne projektowanie znaczników, tak aby mogły z powodzeniem być wykorzystane w medycynie i biologii molekularnej. Istotnym przy projektowaniu znaczników jest niewielki rozmiar cząsteczki, trwałość chemiczna oraz wydajne łączenie się z biocząsteczkami w celu utworzenia biokoniugatów charakteryzujących się wysoką wydajnością kwantową fluorescencji.

Szczególnie interesującymi związkami, pod względem właściwości fluorescencyjnych, są wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, a w szczególności piren oraz jego pochodne. Wiele z pochodnych pirenu wykazuje silną fluorescencję zależną od środowiska otaczającego fluorofor, długie czasy życia fluorescencji oraz wysokie wydajności kwantowe fluorescencji zarówno w roztworze jak i w ciele stałym. Ponadto, istotną cechą układu pirenowego jest łatwość modyfikowania go na drodze reakcji chemicznych (Rysunek 24). Umożliwia to projektowanie nowych fluoroforów o zdefiniowanej strukturze i właściwościach

fotofizycznych. Warto też zwrócić uwagę na fakt, że ostatnie doniesienia literaturowe wskazują na niską toksyczność pochodnych pirenu, dzięki czemu mogą być stosowane w układach biologicznych.

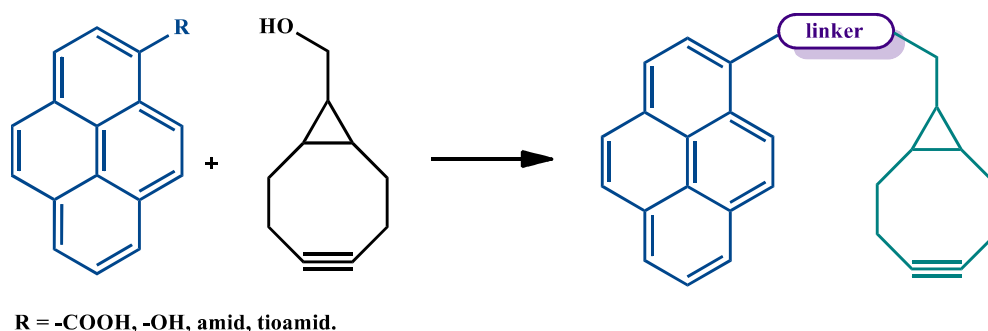


Rysunek 24. Możliwe modyfikacje układu pirenowego

Istnieje wiele strategii znakowania biomolekuł, ale szczególnym zainteresowaniem w ostatnich latach cieszą się opisane przez mnie w części literaturowej reakcje bioortogonalne. Charakteryzują się one wysoką wydajnością, dużym zakresem zastosowania, wysoką chemoselektywnością i szybkością oraz tym, że mogą zachodzić w warunkach fizjologicznych organizmu. Przykładem takiej reakcji jest niekatalityczny wariant reakcji azydków z alkinami SPAAC. Kolejnym wariantem jest ligacja tetrazyny zachodząca na drodze odwrotnej reakcji Dielsa-Aldera (iEDDA), gdzie tetrazyna pełni rolę ubogiego w elektrony dienu i reaguje z bogatym w elektrony dienofilem np. pochodną cyklooktynu. W tym przypadku znakowanie musi być poprzedzone aktywacją mostków dwusiarczkowych w reakcji za pomocą dichlorotetrazyny. Reakcje te umożliwiają znakowanie sfunkcjonalizowanych enzymów, białek czy komórek. Pochodne cyklooktynu ze względu na obecność wiązania potrójnego są układami reaktywnymi chemicznie przez co możliwa jest ich bezpośrednia biokoniugacja do biomolekuł na drodze reakcji addycji. W sprzedaży dostępnych jest wiele pochodnych cyklooktynu zawierających różne grupy funkcyjne. Jednym z takich związków jest endo-9-hydroksymetylbicyklonon-4-yn (**BCN-OH**). Związek ten, ze względu na obecność grupy hydroksylowej, może ulegać różnym modyfikacjom z jednoczesnym zachowaniem wiązania potrójnego.

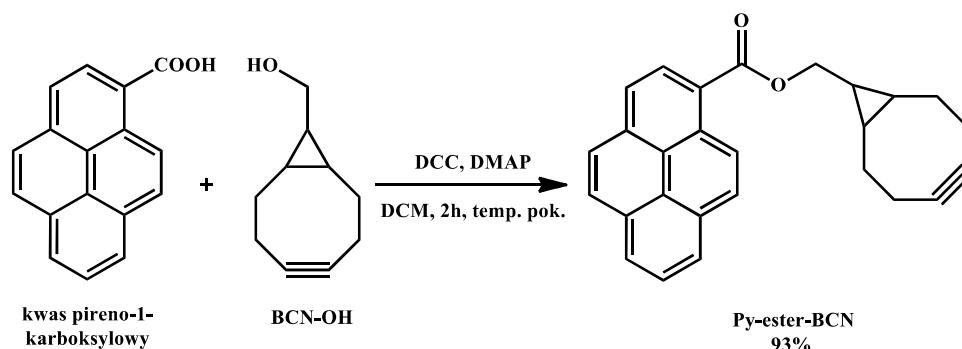
Podczas swojej pracy podjęłam próbę syntezy nowych znaczników fluorescencyjnych opartych na układzie piren-linker-cyklooktyn (Schemat 32), gdzie rolę linkera pełniłyby różne

grupy funkcyjne. W zaprojektowanych przeze mnie znacznikach obecność pierścienia pirenowego odpowiadać miała za właściwości fotofizyczne układu, natomiast obecność wiązania potrójnego w cyklooktynie, powinna wpływać na wysoką reaktywność wobec cząsteczek aktywnych biologicznie (także w warunkach fizjologicznych). W ramach projektu IDUB realizowanego w trakcie rozprawy doktorskiej zsyntezowałam nowe fluorescencyjne znaczniki, zbadałam ich właściwości fotofizyczne, biologiczne oraz ich użyteczność w znakowaniu biocząsteczek.



Schemat 32. Synteza znaczników opartych na układzie piren-linker-cyklooktyn

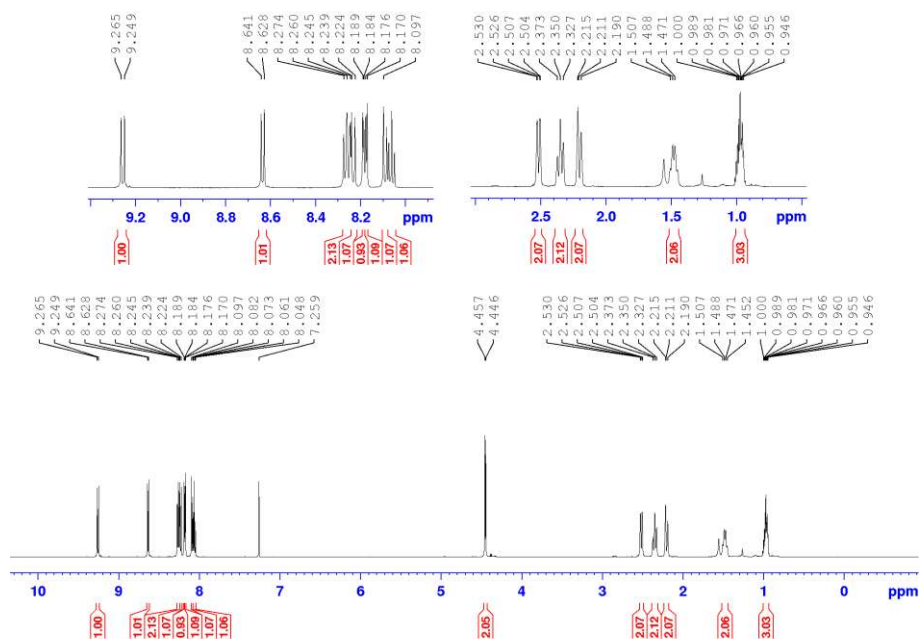
W pierwszej kolejności podjęłam próbę syntezy znacznika, w którym w pozycji linkera znajduje się grupa estrowa. Ze względu na konieczność zachowania łagodnych warunków reakcji, pochodną estrową otrzymałam na drodze reakcji estryfikacji Steglicha endo-9-hydroksymetylbicyklonon-4-ynu (**BCN-OH**) z kwasem pireno-1-karboksylowym - Schemat 33. Do reakcji zamiast silnego kwasu nieorganicznego, który stosowany jest w klasycznym wariacie estryfikacji, użyłam układ 4-dimetyloaminopirydyny (DMAP) oraz *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimid (DCC), w celu wiązania tworzącej się wody. DCC jest często wykorzystywany jako odczynnik kondensujący, a DMAP pełnił rolę katalizatora. Taki wybór odczynników umożliwił otrzymanie pochodnej estrowej z wysoką 93% wydajnością, przy jednoczesnym zachowaniu wiązania potrójnego **BCN-OH**.



Schemat 33. Synteza **Py-ester-BCN** na drodze estryfikacji Steglicha

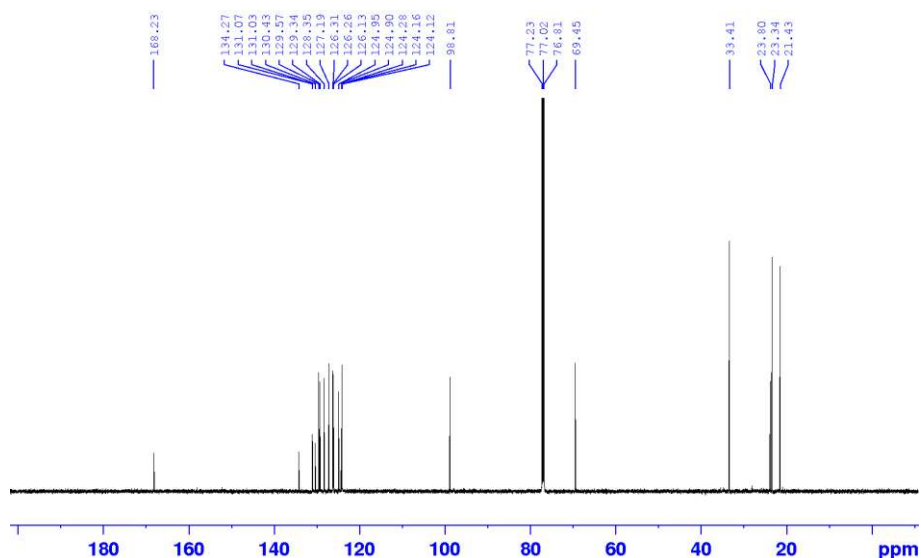
W celu otrzymania w/w estru DCC oraz DMAP rozpuściłam w bezwodnym chlorku metylenu, a następnie dodałam **BCN-OH** oraz kwas pirenokarboksyłowy. Reakcję prowadziłam w temperaturze pokojowej przez 2 h, reakcję zakończyłam dodając 1 ml wody, która spowodowała, że z mieszaniny wypadł osad *N, N'*-dicykloheksylomocznika (DCU). Produkt oczyściłam na drodze chromatografii kolumnowej, używając chloroformu jako eluent.

Strukturę otrzymanego związku potwierdziłam wykonując analizę spektroskopową. W widmie $^1\text{H NMR}$ (600MHz, CDCl_3) związku **Py-ester-BCN** (Rysunek 70) obecne są protony pochodzące od cyklopropanu - multiplet w zakresie 0,95-1,00 ppm odpowiada trzem protonom. Następne sygnały pochodzą od ośmiu protonów pierścienia cyklooktynowego. Cztery multiplety w zakresach: 1,45-1,51 ppm, 2,19-2,21 ppm, 2,33-2,37 ppm oraz 2,50-2,53 ppm, które odpowiadają dwóm protonom każdy. Dublet przy 4,46 ppm o stałej sprzężenia $J = 6,7$ Hz pochodzi od dwóch protonów grupy $-\text{OCH}_2$. Sygnały o największym przesunięciu chemicznym odpowiadają protonom pierścienia pirenowego - tryplet od jednego protonu przy 8,07 ppm o stałej sprzężenia $J = 7,6$ Hz, dublet od jednego protonu przy 8,10 ppm o stałej sprzężenia $J = 8,9$ Hz, kolejny dublet przy 8,18 ppm o stałej sprzężenia $J = 3,8$ Hz odpowiada jednemu protonowi układu aromatycznego. Kolejne sygnały to dublet przy 8,19 ppm o stałej sprzężenia $J = 3,0$ Hz oraz dublet przy 8,24 ppm o stałej sprzężenia $J = 9,4$ Hz każdy od jednego protonu. Tryplet przy 8,27 ppm o stałej sprzężenia $J = 8,5$ Hz odpowiada dwóm protonom aromatycznym, dublet przy 8,64 ppm o stałej sprzężenia $J = 8,0$ Hz pochodzi od jednego protonu, podobnie jak dublet przy 9,27 ppm o stałej sprzężenia $J = 9,4$ Hz od jednego protonu.



Rysunek 70. Widmo $^1\text{H NMR}$ **Py-ester-BCN** w CDCl_3 (600 MHz)

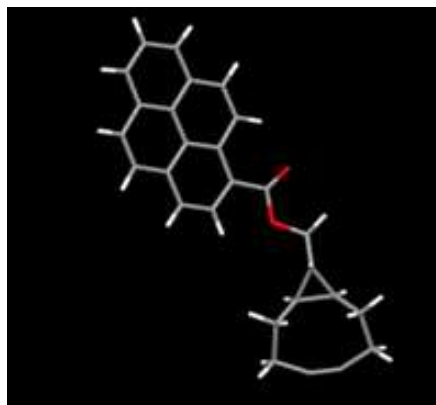
W widmie węglowym (150MHz, CDCl₃) **Py-ester-BCN** (Rysunek 71) obecny przy 168,2 ppm sygnał odpowiada karbonylowemu atomowi węgla. Sygnały δ 134,3, 131,1, 130,4, 129,6, 129,3, 128,3, 126,3, 126,2, 125,0, 124,9, 124,3, 124,2, 124,1 ppm pochodzą od atomów węgla pierścienia pirenowego. Sygnał przy 98,8 ppm pochodzi od atomów węgla tworzących wiązanie potrójne, a sygnały pochodzące od alifatycznych atomów węgla pierścienia cyklooktynowego i cyklopropanowego znajdują się przy 69,5, 33,4, 23,8, 21,4 ppm.



Rysunek 71. Widmo ¹³C NMR **Py-ester-BCN** w CDCl₃ (150 MHz)

W widmie IR związku **Py-ester-BCN** grupa estrowa (C=O) wykazuje charakterystyczne pasma drgań przy 1695 cm⁻¹. Dodatkowo otrzymanie omawianej pochodnej potwierdziło widmo masowe wysokiej rozdzielczości - m/z: obliczona dla C₂₇H₂₂NO₂H [M+H]⁺ wynosi 379,1698, natomiast wartość wyznaczona eksperymentalnie 379,1707.

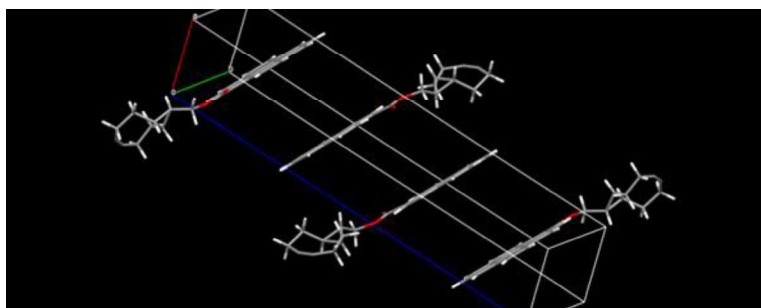
Ponadto, dla związku **Py-ester-BCN** uzyskałam monokryształy, których analiza rentgenostrukturalna została wykonana w zespole Prof. Anny Makal. Wykonanie badań rentgenostrukturalnych umożliwiło jednoznaczne potwierdzenie struktury uzyskanego produktu oraz dostarczyło informacji dotyczących oddziaływań występujących na poziomie molekularnym. W jednostce asymetrycznej związku **Py-ester-BCN** znajduje się jedna niezależna cząsteczka (Rysunek 72).



Rysunek 72. Struktura cząsteczkowa **Py-ester-BCN**

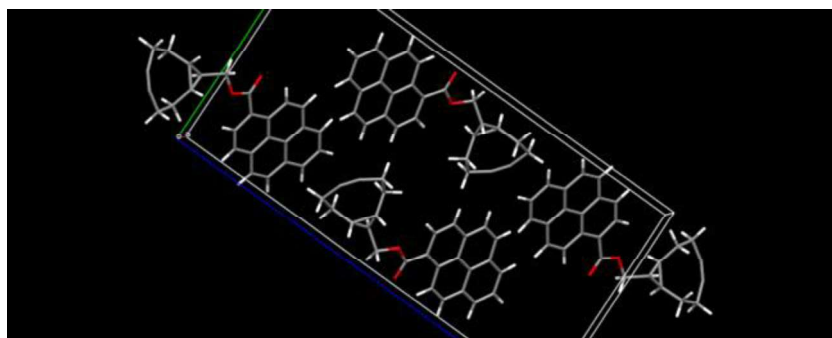
Przygotowując kryształy **Py-ester-BCN** zauważyłam, że w świetle UV część z nich emituje światło niebieskie, a część zielone. Emisja była zależna od rozpuszczalnika użytego do krystalizacji. Analiza rentgenostrukturalna wykazała, że jest to spowodowane obecnością różnych form polimorficznych różniących się upakowaniem w kryształach pochodnej estrowej (Rysunek 73 i 74).

W obu przypadkach w komórce elementarnej znajdują się cztery cząsteczki estru. W przypadku formy emitującej światło o barwie zielonej widoczne jest równoległe ułożenie fragmentów pirenowych, przy czym grupy estrowe ułożone są na przemian, po przeciwnych stronach cząsteczki. Pomiędzy pierścieniami pirenowymi występują oddziaływania typu π - π (π -stacking) (Rysunek 73).



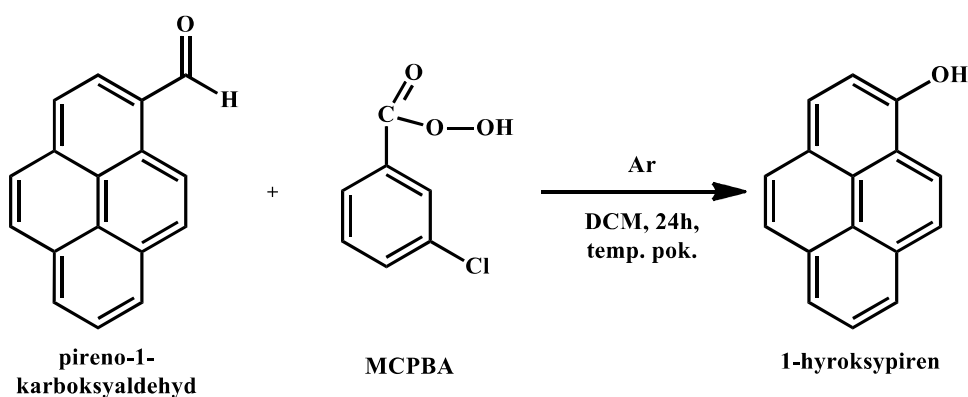
Rysunek 73. Upakowanie w komórce elementarnej **Py-ester-BCN**
- forma polimorficzna wykazująca zieloną emisję

W przypadku formy emitującej światło niebieskie pierścienie pirenowe nie oddziałują ze sobą (Rysunek 74).



Rysunek 74. Upakowanie w komórce elementarnej **Py-ester-BCN** - forma polimorficzna wykazująca niebieską emisję

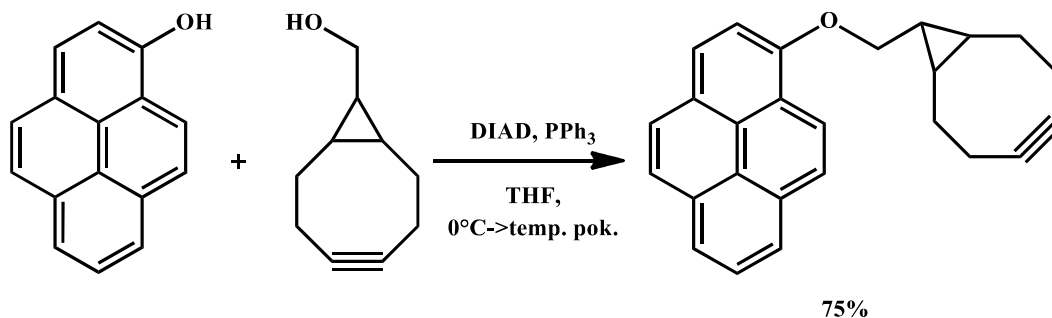
Podczas projektowania kolejnego znacznika postanowiłam otrzymać pochodną, w której rolę linkera między pirenem, a układem cyklooktynowym będzie pełnił grupa eterowa. W tym celu podjęłam próbę syntezy 1-hydroksypirenu (Schemat 34). Pireno-1-karboksyaldehyd oraz kwas meta-chloronadbenzoesowy (MCPBA) rozpuściłam w chlorku metylenu i pozostawiłam na 24 h w temperaturze pokojowej, w atmosferze gazu obojętnego. Produkt wydzieliłam z mieszaniny poreakcyjnej na drodze ekstrakcji. Następnie oczyściłam go za pomocą chromatografii kolumnowej. W celu potwierdzenia struktury otrzymanej pochodnej, wykonałam analizę spektroskopową - zarejestrowałam widmo ^1H NMR, a następnie porównałam je z danymi literaturowymi.



Schemat 34. Synteza 1-hydroksypirenu

Następnie przeprowadziłam syntezę pochodnej eterowej **Py-eter-BCN** (Schemat 35). W tym celu **BCN-OH** i 1-hydroksypiren rozpuściłam w tetrahydrofuranie, a następnie roztwór schłodziłam do 0°C , w atmosferze gazu obojętnego. Po schłodzeniu mieszaniny reakcyjnej dodałam kolejno PPh_3 oraz DIAD i kontynuowałam mieszanie w 0°C przez ok. 5 min., po tym czasie mieszaninę reakcyjną ogrzałam do temperatury pokojowej. Reakcję prowadziłam

45 min., produkt wydzieliłam z mieszaniny poreakcyjnej na drodze ekstrakcji, a następnie oczyściłam go stosując chromatografię kolumnową.



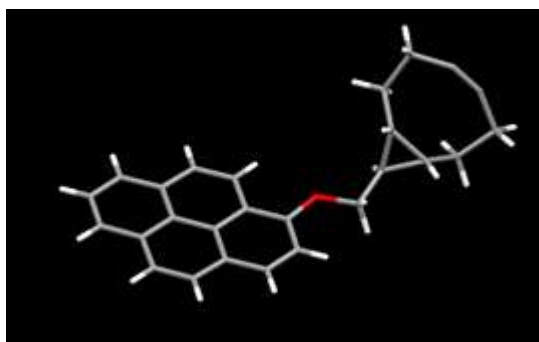
Schemat 35. Synteza **Py-eter-BCN** na drodze reakcji Mitsunobu

Wybrana przeze mnie reakcja Mitsunobu, należy do reakcji charakteryzujących się łagodnymi warunkami pozwalającymi m.in. na zachowanie wiązania potrójnego. Ponadto, reakcja ta cechuje się dużą uniwersalnością i może być stosowana dla różnych typów odczynników nukleofilowych.

Otrzymany produkt scharakteryzowałam metodami spektroskopowymi. W widmie $^1\text{H NMR}$ (600MHz, CDCl_3) związku **Py-eter-BCN** (Rysunek 75) w części alifatycznej obecne są sygnały od protonów pierścienia cyklopropanowego - multiplet w zakresie 0,95-0,98 ppm odpowiada dwóm protonom, a multiplet w zakresie 0,99-1,03 ppm jednemu protonowi. Kolejne sygnały pochodzą od ośmiu protonów pierścienia cyklooktynowego - cztery multiplety w zakresie 1,45-1,52 ppm, 2,19-2,22 ppm, 2,32-2,37 ppm oraz 2,50-2,52 ppm, które odpowiadają dwóm protonom każdy. Dublet przy 4,30 ppm o stałej sprzężenia $J = 6,4$ Hz pochodzi od dwóch protonów grupy $-\text{OCH}_2$. Sygnały o największym przesunięciu chemicznym pochodzą od protonów układu pirenowego - dublet przy 7,52 ppm o stałej sprzężenia $J = 8,3$ Hz oraz dublet przy 7,90 ppm o stałej sprzężenia $J = 8,9$ Hz każdy od jednego protonu. Multiplet w zakresie 7,95-7,98 ppm pochodzi od dwóch protonów. Następne sygnały to multiplet w zakresie 8,08-8,10 ppm od dwóch protonów, dwa dublety odpowiednio przy 8,13 ppm o stałej sprzężenia $J = 7,6$ Hz oraz przy 8,49 ppm o stałej sprzężenia $J = 9,1$ Hz pochodzące od jednego protonu każdy.

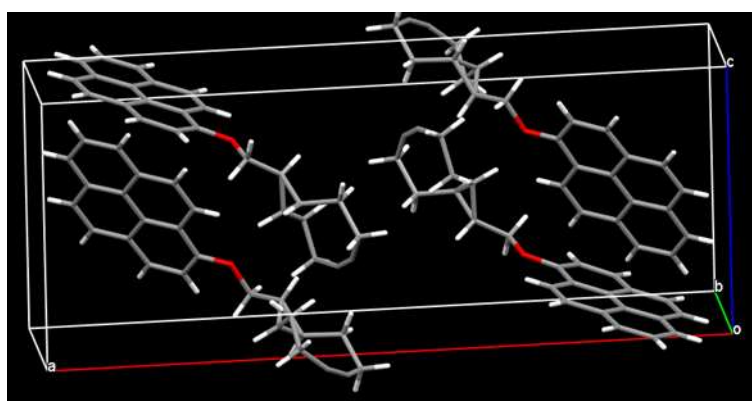
W widmie IR związku **Py-eter-BCN** obecne jest charakterystyczne pasmo absorpcji drgań rozciągających wiązania C-O przy 1252 cm^{-1} . Dla wyżej opisanej pochodnej została przeprowadzona analiza HRMS - m/z: wartość obliczona dla $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{OH}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ wynosi 351,1749, a wartość wyznaczona 351,1754.

Dla pochodnej eterowej uzyskałam monokryształy, których analiza rentgenostrukturalna umożliwiła jednoznaczne potwierdzenie struktury uzyskanego produktu oraz dostarczyła informacji dotyczących oddziaływań międzycząsteczkowych. W jednostce asymetrycznej związku **Py-eter-BCN** znajduje się jedna niezależna cząsteczka (Rysunek 77).



Rysunek 77. Struktura cząsteczkowa **Py-eter-BCN**

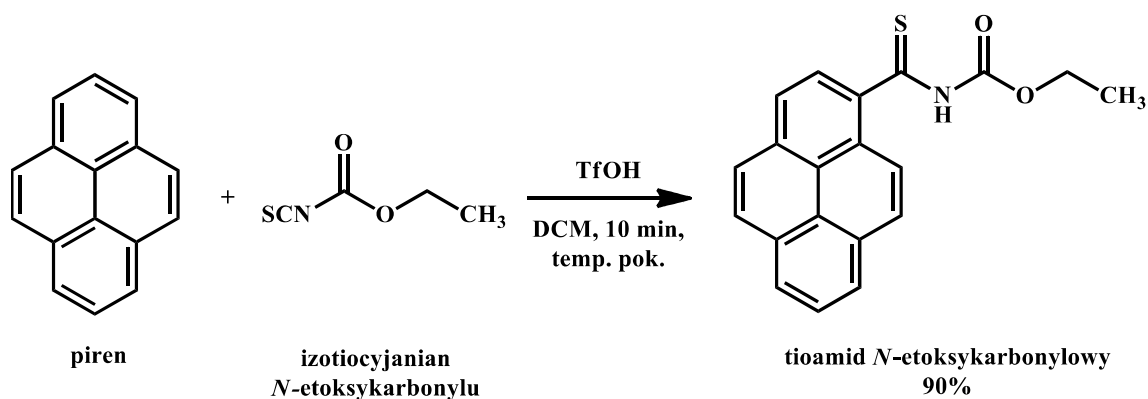
W pojedynczej komórce elementarnej **Py-eter-BCN** (Rysunek 78) znajdują się cztery cząsteczki związku. W przypadku pochodnej **Py-eter-BCN** fragmenty pirenowe sąsiadujących cząsteczek są ułożone prostopadle względem siebie, nie występuje zatem π -stacking. Nie zaobserwowałam tworzenia się wiązań wodorowych.



Rysunek 78. Upakowanie w komórce elementarnej **Py-eter-BCN**

Opisaną wcześniej reakcję Mitsunobu postanowiłam wykorzystać do otrzymania *S*- i *N*-alkilowych pochodnych (tio)amidów. Tę część prac badawczych rozpoczęłam od syntezy tioamidu *N*-etoksykarbonylowego (Schemat 36) stosując metodę opracowaną w KChO

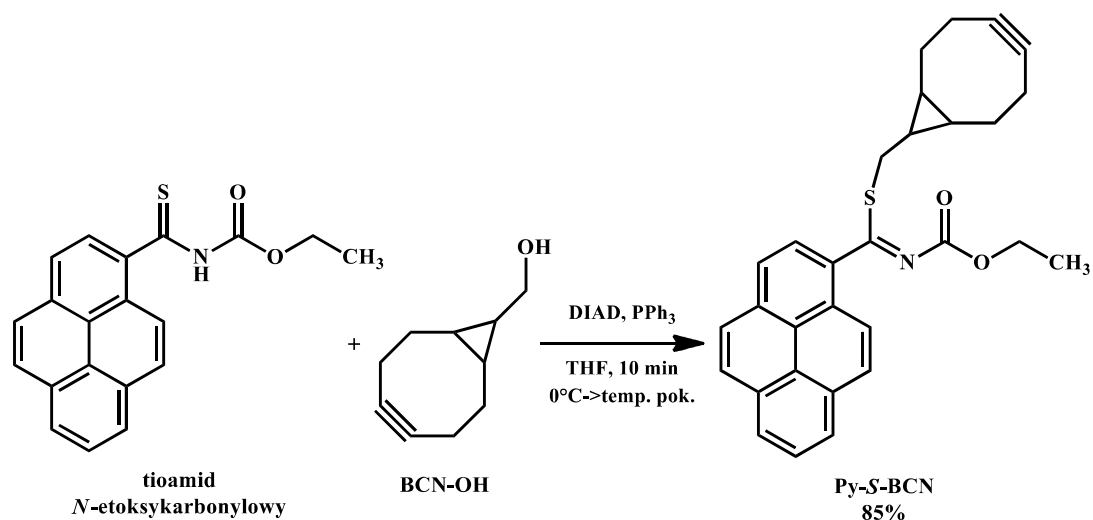
(*Arkivoc.*, **2012**, 6, 412-20). W tym celu piren poddałam reakcji z izotiocyanianem etoksykarbonylowym. Reakcję prowadziłam 10 min. w temperaturze pokojowej, w obecności kwasu tryflowego. Następnie mieszaninę poreakcyjną poddałam ekstrakcji. Surowy produkt oczyściłam chromatograficznie. Strukturę otrzymanego z 90% wydajnością tioamidu potwierdziłam porównując widmo protonowe z danymi literaturowymi.



Schemat 36. Synteza tioamidu *N*-etoksykarbonylowego

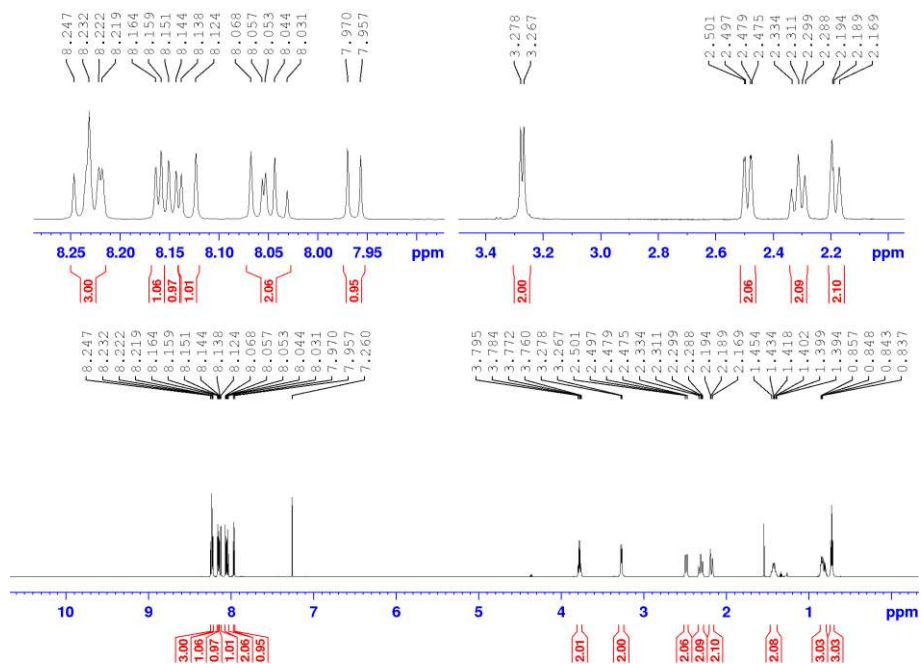
W kolejnym kroku postanowiłam tioamid poddać reakcji Mitsunobu z **BCN-OH**. W przypadku tioamidów obecność wiązania N-H w sąsiedztwie grupy tiokarbonylowej i karbonylowej wpływa na jego zwiększoną „kwasowość” dając jednocześnie możliwość tworzenia na skutek rezonansu *S,N*-anionów - potencjalnych pronukleofilów w reakcji Mitsunobu. Wiedząc jednak, że atom siarki jest silniej nukleofilowy niż atom azotu spodziewałam się tworzenia produktu *S*-alkilowania, a nie *N*-alkilowania.

Syntezę *S*-alkilowej pochodnej (Schemat 37) przeprowadziłam analogicznie jak w przypadku **Py-eter-BCN**. Tioamid *N*-etoksykarbonylowy oraz **BCN-OH** rozpuściłam w THFie, mieszaninę reagentów schłodziłam do 0°C w atmosferze argonu, a następnie dodałam PPh₃ oraz DIAD i kontynuowałam mieszanie w 0°C przez 10 min. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną ogrzałam do temperatury pokojowej i kontynuowałam mieszanie przez 4 h. Następnie przeprowadziłam ekstrakcję w układzie woda : chlorek metylenu, a surowy produkt oczyściłam na drodze chromatografii kolumnowej używając chlorku metylenu jako eluent.



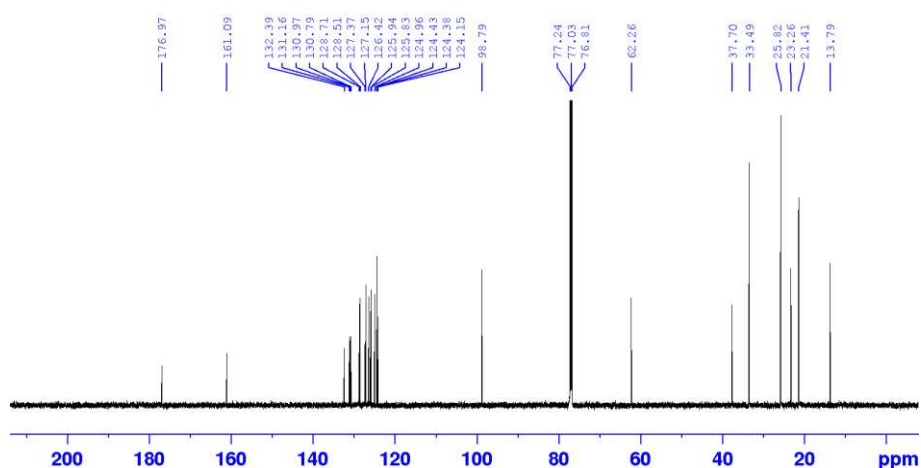
Schemat 37. Synteza **Py-S-BCN** na drodze reakcji Mitsunobu

Identyfikację produktu reakcji przedstawionej na Schemacie 38 dokonałam na podstawie analiz spektroskopowych. W widmie ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) związku **Py-S-BCN** (Rysunek 79) w części alifatycznej obecne są sygnały od protonów grupy metylowej - tryplet od trzech protonów grupy -CH₃ przy 0,74 ppm o stałej sprzężenia $J = 7,8$ Hz oraz protony pierścienia cyklopropanowego - multiplet w zakresie 0,79-0,86 ppm odpowiadający trzem protonom. Następnie w widmie obecne są sygnały od ośmiu protonów pierścienia cyklooktynowego - cztery multiplety w zakresie 1,39-1,45 ppm, 2,17-2,19 ppm, 2,29-2,33 ppm oraz 2,47-2,50 ppm, które odpowiadają dwóm protonom każdy. Dublet przy 3,28 ppm o stałej sprzężenia $J = 7,0$ Hz pochodzi od dwóch protonów grupy metylenowej związanej z atomem siarki, a kwartet przy 3,80 ppm o stałej sprzężenia $J = 7,1$ Hz pochodzi od dwóch protonów grupy -CH₂. Kolejne sygnały pochodzą od protonów układu pirenowego - dublet przy 7,97 ppm o stałej sprzężenia $J = 7,8$ Hz od jednego protonu, multiplet w zakresie 8,03-8,07 ppm od dwóch protonów. Kolejne sygnały to trzy dublety odpowiednio przy 8,14 ppm o stałej sprzężenia $J = 8,9$ Hz, przy 8,15 ppm o stałej sprzężenia $J = 4,6$ Hz oraz przy 8,16 ppm o stałej sprzężenia $J = 3,3$ Hz. Najdalej przesuniętym sygnałem jest multiplet w zakresie 8,22-8,25 ppm pochodzący od trzech protonów układu aromatycznego.



Rysunek 79. Widmo ^1H NMR **Py-S-BCN** w CDCl_3 (600 MHz)

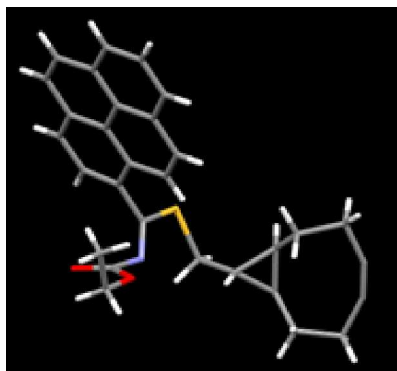
W widmie ^{13}C NMR (150MHz, CDCl_3) pochodnej **Py-S-BCN** (Rysunek 80) sygnały obecne przy 177,0 oraz 161,1 ppm odpowiadają karbonylowemu atomowi węgla i atomowi węgla S-C=N-. Sygnały przy 132,4, 131,2, 131,0, 130,8, 128,7, 128,5, 127,4, 127,2, 126,4, 125,9, 125,8, 125,0, 124,4, 124,1 ppm pochodzą od atomów węgla układu pirenowego. Sygnał przy 98,8 ppm pochodzi od atomów węgla tworzących wiązanie potrójne, sygnały pochodzące od alifatycznych atomów węgla znajdują się przy 37,7, 33,5, 25,8, 23,2, 21,4, 13,8 ppm.



Rysunek 80. Widmo ^{13}C NMR **Py-S-BCN** w CDCl_3 (150 MHz)

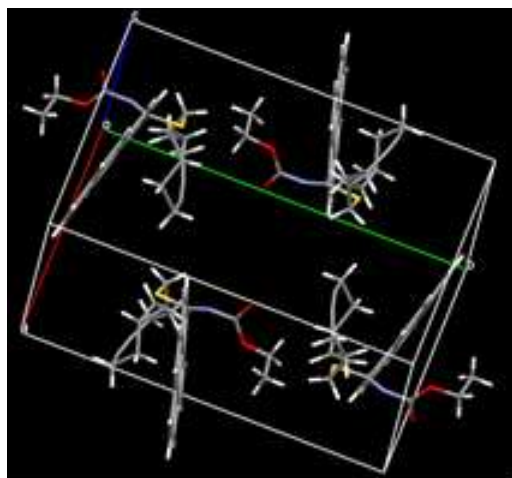
Oprócz widm magnetycznego rezonansu jądrowego otrzymanie **Py-S-BCN** potwierdziło widmo masowe wysokiej rozdzielczości HRMS (ESI) - m/z: wartość obliczona dla wzoru $\text{C}_{30}\text{H}_{27}\text{NO}_2\text{SH}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ wynosi 466,1841, a wyznaczona eksperymentalnie 466,1846.

Dla otrzymanego związku otrzymałam także monokryształy, co pozwoliło na przeprowadzenie badań rentgenostrukturalnych. Zostały one wykonane w zespole Prof. Anny Makal. Rysunek 81 przedstawia strukturę cząsteczkową *S*-alkilowej pochodnej. W jednostce asymetrycznej **Py-S-BCN** występuje tylko jedna cząsteczka związku.



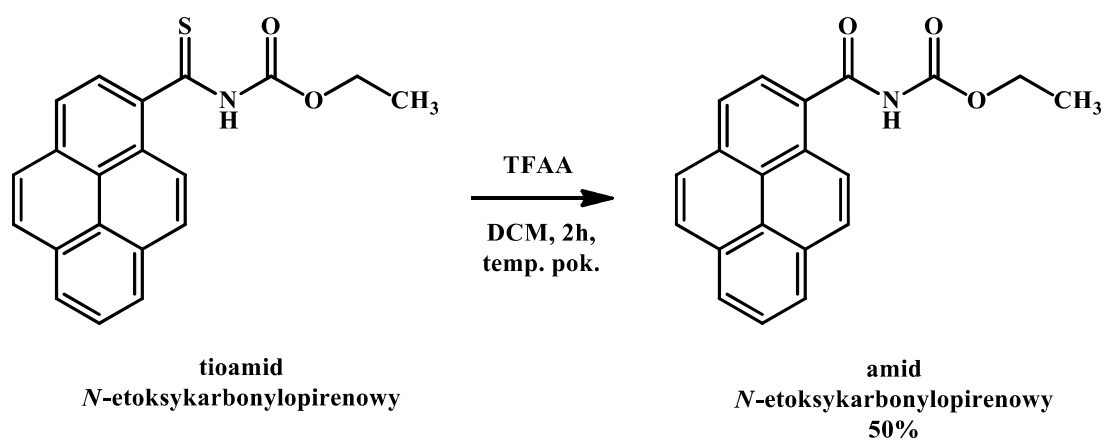
Rysunek 81. Struktura cząsteczkowa **Py-S-BCN**

Natomiast w komórce elementarnej **Py-S-BCN** (Rysunek 82) znajdują się cztery niezależne cząsteczki, między którymi nie występują oddziaływania typu π - π .



Rysunek 82. Upakowanie w komórce elementarnej **Py-S-BCN**

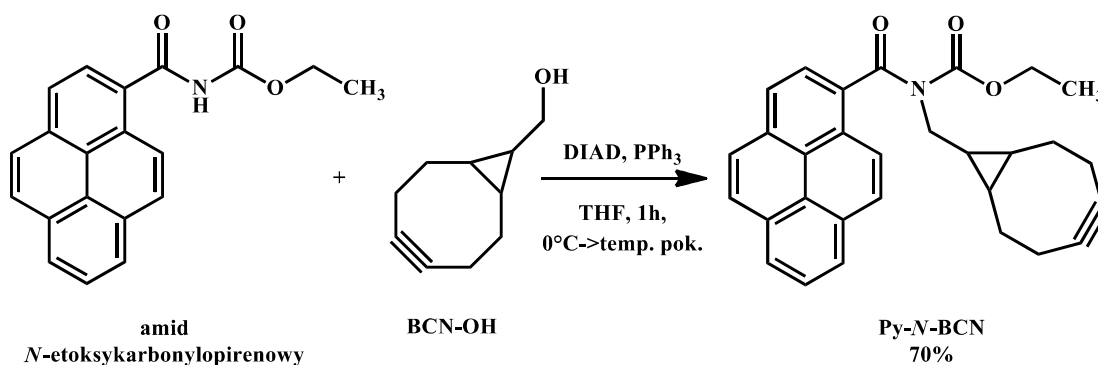
W kolejnym etapie postanowiłam poddać reakcji Mitsunobu amid *N*-etoksykarbonylowy. W tym celu zsyntezowany tioamid *N*-etoksykarbonylopirenowego rozpuściłam w bezwodnym chlorku metylenu, a następnie dodałam bezwodnik trifluorooctowy w celu utlenienia atomu siarki (Schemat 38). Reakcję prowadziłam 2 h w temperaturze pokojowej. Produkt wydzieliłam z mieszaniny poreakcyjnej na drodze ekstrakcji, a następnie oczyściłam na drodze chromatografii kolumnowej.



Schemat 38. Synteza amidu *N*-etoksykarbonylowego

Strukturę produktu potwierdziłam rejestrując widmo ^1H NMR oraz ^{13}C NMR. Dodatkowo dla amidu *N*-etoksykarbonylopirenowego wykonałam wysokorozdzielczą analizę masową - HRMS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ obliczona dla wzoru $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{N}$ wynosi 318,1130, a wyznaczona eksperymentalnie 318,140; wartość obliczona dla wzoru $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_3\text{N}$ $[\text{M}-\text{H}]^+$ wynosi 316,0974, a wartość wyznaczona 316,0976.

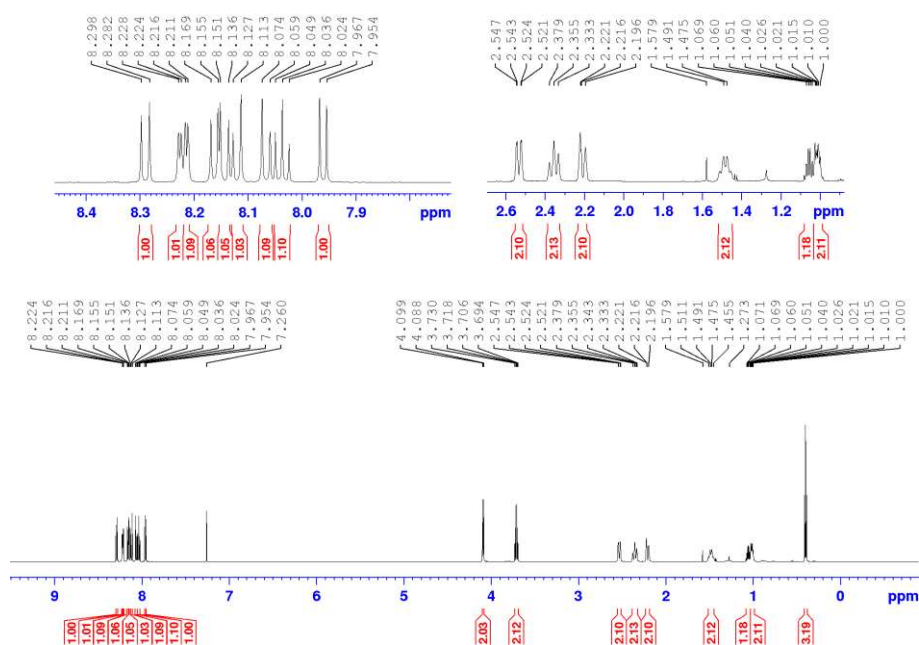
Następnie amid *N*-etoksykarbonylopirenowy wykorzystywałam jako prekursor do syntezy docelowego znacznika - *N*-alkilowej pochodnej (Schemat 39). **Py-*N*-BCN** otrzymałam w analogiczny sposób jak wyżej opisaną pochodną **Py-*S*-BCN**.



Schemat 39. Synteza **Py-*N*-BCN** na drodze reakcji Mitsunobu

W widmie ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) związku **Py-*N*-BCN** (Rysunek 83) obecne są sygnały od protonów grupy metylowej – tryplet od trzech protonów przy 0,42 ppm o stałej sprzężenia $J = 7,1$ Hz, sygnały od protonów pierścienia cyklopropanowego - multiplet w zakresie 1,00-1,03 ppm odpowiadający dwóm protonom oraz multiplet w zakresie 1,04-1,07 ppm od jednego protonu. Kolejne sygnały pochodzą od ośmiu protonów pierścienia cyklooktynowego - cztery multiplety w zakresie 1,46-1,51 ppm, 2,20-2,22 ppm, 2,33-2,38 ppm

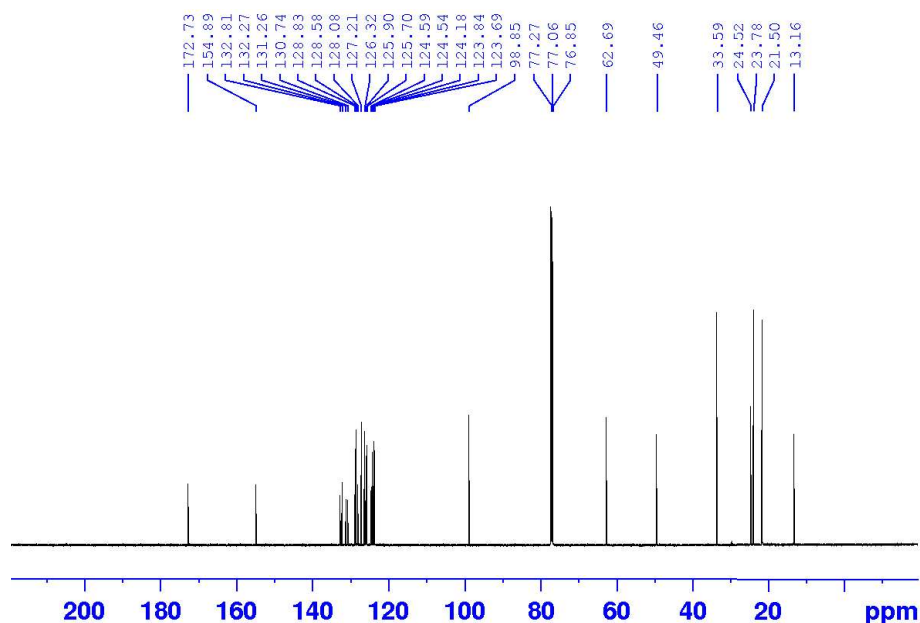
oraz 2,52-2,55 ppm, które odpowiadają dwóm protonom każdy. Kwartet przy 3,73 ppm o stałej sprzężenia $J = 7,1$ Hz pochodzi od dwóch protonów grupy $-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_3$, a dublet przy 4,10 ppm o stałej sprzężenia $J = 6,8$ Hz pochodzi od dwóch protonów grupy $-\text{CH}_2$ związanej z atomem azotu. Kolejne sygnały pochodzą od protonów pierścienia aromatycznego - dublet przy 7,97 ppm o stałej sprzężenia $J = 7,9$ Hz, tryplet przy 8,05 ppm o stałej sprzężenia $J = 7,6$ Hz, dwa dublety - przy 8,07 ppm o stałej sprzężenia $J = 8,9$ Hz i przy 8,13 ppm o stałej sprzężenia $J = 8,9$ Hz, każdy od jednego protonu układu aromatycznego. Kolejne sygnały to dublet przy 8,15 ppm o stałej sprzężenia $J = 9,2$ Hz, dublet przy 8,17 ppm o stałej sprzężenia $J = 7,9$ Hz, oraz trzy dublety: pierwszy przy 8,22 ppm o stałej sprzężenia $J = 2,8$ Hz, drugi przy 8,23 ppm o stałej sprzężenia $J = 2,8$ Hz oraz trzeci dublet przy 8,30 ppm o stałej sprzężenia $J = 9,2$ Hz, każdy od jednego protonu.



Rysunek 83. Widmo ^1H NMR **Py-N-BCN** w CDCl_3 (600 MHz)

Analiza widma ^{13}C NMR (150MHz, CDCl_3) pochodnej **Py-N-BCN** dodatkowo potwierdziła strukturę otrzymanego produktu (Rysunek 84). W widmie obecne są sygnały przy 172,7 i 154,9 ppm odpowiadają karbonylowym atomom węgla. Sygnały od atomów węgla pierścienia pirenowego obecne są przy 132,8, 132,3, 131,3, 130,7, 128,8, 128,6, 128,1, 127,2, 126,3, 125,9, 125,7, 124,6, 124,2, 123,8 ppm. Sygnał przy 98,9 ppm pochodzi od atomów węgla tworzących wiązanie $\text{C}\equiv\text{C}$, a sygnał przy 62,6 ppm pochodzi od atomów węgla grupy $-\text{CH}_2$ związanej z atomem azotu. Następnie w widmie obecne są sygnały od alifatycznych atomów węgla pierścienia cyklooktynowego, pierścienia cyklopropanowego oraz grupy $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ - przy 49,5, 33,6, 24,5, 23,8, 21,5 i 13,2 ppm.

Dla w/w produktu wykonałam także analizę masową HRMS (ESI) związku **Py-N-BCN** m/z: obliczona dla $C_{30}H_{27}NO_3H [M+H]^+$: 450,2069, wartość wyznaczona eksperymentalnie 450,2075.



Rysunek 84. Widmo ^{13}C NMR **Py-N-BCN** w $CDCl_3$ (150 MHz)

Otrzymane przeze mnie znaczniki są związkami nowymi, nieopisanymi wcześniej w literaturze. Istotnym zatem było określenie właściwości fotofizycznych otrzymanych związków, które mają duży wpływ na możliwości aplikacyjne, w tym na zastosowanie ich jako znaczników fluorescencyjnych biocząsteczek.

5.5. Badania fotofizyczne - właściwości absorpcyjne oraz emisyjne zsyntezowanych znaczników fluorescencyjnych

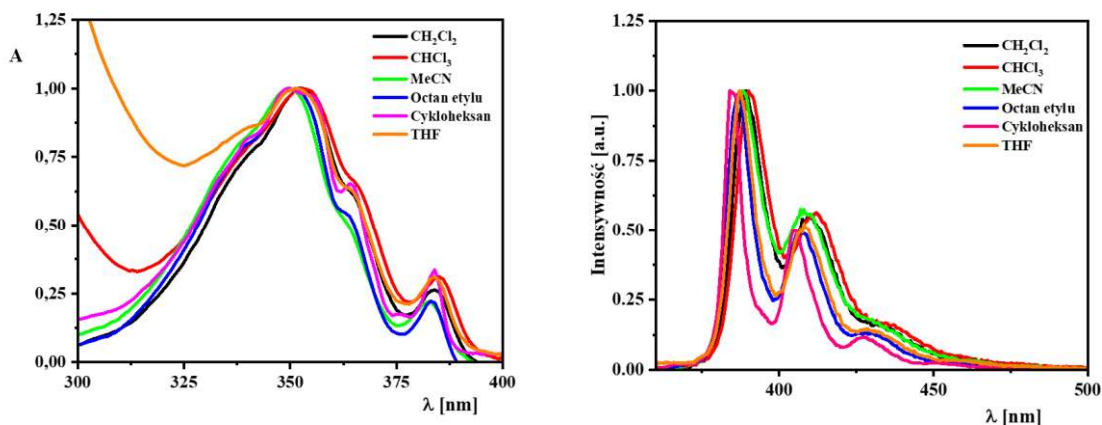
Trzy zsyntezowane w ramach rozprawy doktorskiej pochodne pirenu z fragmentem cyklooktynu wykazują fluorescencję (**Py-ester-BCN**, **Py-eter-BCN** i **Py-N-BCN**) jedynie *S*-alkilowa pochodna **Py-S-BCN** nie wykazywała emisji w roztworze i ciele stałym. Brak właściwości fluorescencyjnych w przypadku *S*-alkilowej pochodnej jest związany z efektem atomu ciężkiego, który prowadzi do wygaszania fluorescencji. Związek ten może jednak w różnych warunkach, np. biologicznych ulegać utlenianiu do silnie fluorescencyjnego amidu, co byłoby interesującym od strony aplikacyjnej.

Na właściwości luminescencyjne duży wpływ ma m. in. struktura cząsteczki. Każda zsyntezowana pochodna zawiera inne ugrupowanie (linker) łączące układ pirenowy z fragmentem cyklooktynu. Obecność różnych grup funkcyjnych w strukturze cząsteczki

powinna mieć wpływ na właściwości fotofizyczne zaprojektowanych związków, w tym na barwę emitowanego światła, wydajność kwantową fluorescencji i czas życia fluorescencji. Wszystko to przekłada się na możliwości aplikacyjne otrzymanych związków m.in. daje możliwość zastosowania jako biomarkery, sondy środowiska, czy znaczniki luminescencyjne do bioobrazowania itp. Aby określić właściwości fotofizyczne oraz potencjał aplikacyjny otrzymanych znaczników przeprowadziłam szereg badań zarówno w roztworach jak i w ciele stałym. Część z nich wykonałam w KChO Uniwersytetu Łódzkiego, a część w trakcie wyjazdu naukowo-badawczego do PPSM ENS-Universite Paris-Saclay we Francji.

Badania fotofizyczne rozpoczęłam od zarejestrowania widm absorpcyjnych i emisyjnych otrzymanych znaczników w serii rozpuszczalników różniących się polarnością (DCM, CHCl_3 , MeCN, octan etylu, cykloheksan, THF). Pozwoliło mi to określić wpływ środowiska otaczającego fluorofor na właściwości fluorescencyjne badanych związków. Wszystkie widma rejestrowałam dla roztworów o stężeniu 5×10^{-6} mol/l, tak aby uniknąć agregacji cząsteczek.

Na Rysunku 85 przedstawiłam znormalizowane widma absorpcji i emisji związku **Py-ester-BCN**. W tym przypadku nie obserwowałam zależności fluorescencji od rodzaju rozpuszczalnika. Kształt krzywej emisji każdorazowo był typowy dla monomeru pirenu (Schemat 21).



Rysunek 85. Znormalizowane widma elektronowe absorpcji i emisji związku **Py-ester-BCN** w różnych rozpuszczalnikach

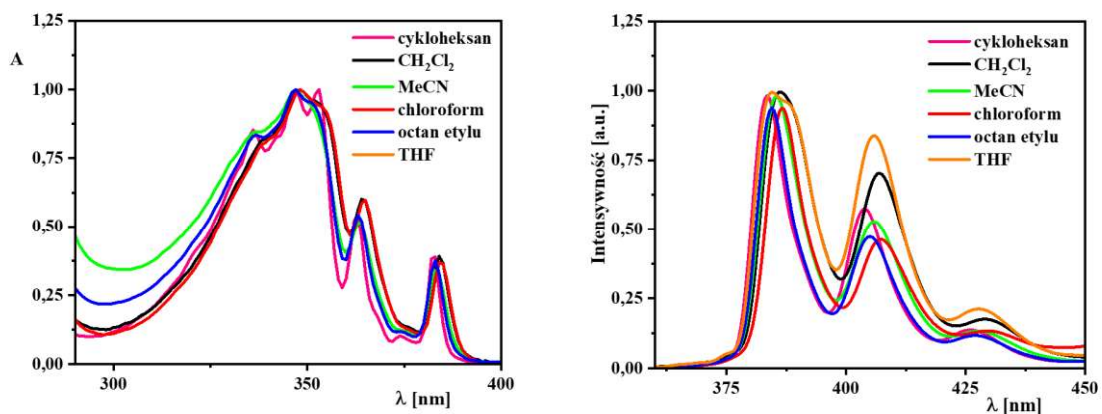
Dla otrzymanego estru wyznaczyłam również wydajność kwantową fluorescencji w wymienionych wcześniej rozpuszczalnikach oraz obliczyłam molowe współczynniki ekstynkcji. Uzyskane dane zebrałam w Tabeli 5. Wydajność kwantową fluorescencji wyznaczyłam metodą pośrednią, stosując jako odnośnik siarczan chininy.

Rozpuszczalnik	$\lambda_{ab}[\text{nm}]/\varepsilon$	$\lambda_{em} [\text{nm}]$	Stokes shift [cm^{-1}]	Q_F
CH_2Cl_2	$\frac{352}{\varepsilon_1} = 3 \times 10^4$ $\frac{384}{\varepsilon_2} = 7,74 \times 10^3$	$\lambda_1 = \underline{389}$ $\lambda_2 = 410$	2702,2	89,8%
CHCl_3	$\frac{352}{\varepsilon_1} = 3,34 \times 10^4$ $\frac{385}{\varepsilon_2} = 1,074 \times 10^4$	$\lambda_1 = \underline{390}$ $\lambda_2 = 411$	2768,1	85,2%
MeCN	$\frac{349}{\varepsilon_1} = 2,96 \times 10^4$ $\frac{382}{\varepsilon_2} = 6,26 \times 10^4$	$\lambda_1 = \underline{389}$ $\lambda_2 = 408$	3012,3	90,5%
Octan etylu	$\frac{350}{\varepsilon_1} = 3,08 \times 10^4$ $\frac{383}{\varepsilon_2} = 7,1 \times 10^3$	$\lambda_1 = \underline{389}$ $\lambda_2 = 407$	2864,5	84,5%
Cykloheksan	$\frac{352}{\varepsilon_1} = 3,06 \times 10^4$ $\frac{363}{\varepsilon_2} = 1,978 \times 10^4$ $\frac{384}{\varepsilon_3} = 10^3$	$\lambda_1 = \underline{385}$ $\lambda_2 = 405$ $\lambda_3 = 428$	2435,1	77,5%
THF	$\frac{352}{\varepsilon_1} = 4,14 \times 10^4$ $\frac{383}{\varepsilon_2} = 1,44 \times 10^4$	$\lambda_1 = \underline{386}$ $\lambda_2 = 407$ $\lambda_3 = 430$	2502,4	86,7%

Tabela 5. Wybrane dane fizykochemiczne wyznaczone dla związku **Py-ester-BCN**

Związek ten charakteryzuje się wysoką wydajnością kwantową fluorescencji różniącą się tylko nieznacznie w zależności od rozpuszczalnika. Najwyższą wydajność kwantową fluorescencji związek **Py-ester-BCN** wykazuje rozpuszczony w roztworze acetonitrylu i wynosi ona 90,5%. W pozostałych rozpuszczalnikach mieści się ona w przedziale od 77,5% dla cykloheksanu do 89,8% dla roztworu w dichlorometanie. Otrzymane wyniki jednoznacznie wskazują, że otrzymany przeze mnie znacznik luminescencyjny ma silne właściwości emisyjne, co może być korzystne przy znakowaniu biocząsteczek i ich detekcji.

W kolejnym etapie zarejestrowałam widma absorpcyjne i emisyjne dla **Py-eter-BCN**. Na Rysunku 86 przedstawiłam wyniki badań fotofizycznych uzyskane dla pochodnej eterowej. Analogicznie jak dla estru do badań użyłam roztworów o stężeniu $5 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$ w sześciu różnych rozpuszczalnikach.



Rysunek 86. Znormalizowane widma elektronowe absorpcji i emisji związku **Py-eter-BCN** w różnych rozpuszczalnikach

Uzyskane dane eksperymentalne pozwoliły mi na wyznaczenie wydajności kwantowej fluorescencji w różnych rozpuszczalnikach oraz na obliczenie molowych współczynników ekstynkcji (Tabela 6). W tym przypadku wydajność kwantową fluorescencji również wyznaczyłam metodą pośrednią, stosując jako odnośnik siarczan chininy.

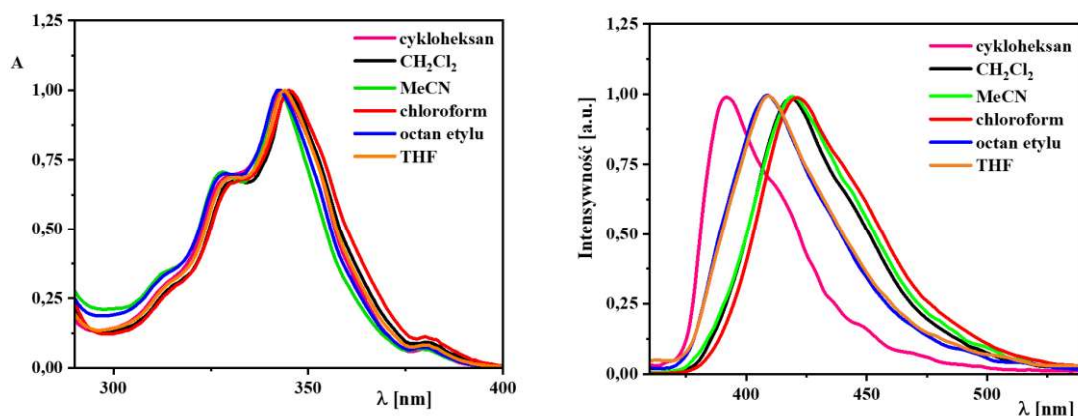
Rozpuszczalnik	$\lambda_{ab}[\text{nm}]/\epsilon$	$\lambda_{em} [\text{nm}]$	Stokes shift [cm^{-1}]	Q_F
CH_2Cl_2	$347/\epsilon_1 = 2,33 \times 10^4$	$\lambda_1 = \underline{386}$	2911,7	82,1%
	$364/\epsilon_2 = 1,36 \times 10^4$	$\lambda_2 = 406$		
	$384/\epsilon_2 = 8,38 \times 10^3$	$\lambda_3 = 428$		
CHCl_3	$347/\epsilon_1 = 3,04 \times 10^4$	$\lambda_1 = \underline{386}$	2911,7	28%
	$365/\epsilon_1 = 1,79 \times 10^4$	$\lambda_2 = 407$		
	$384/\epsilon_2 = 1,07 \times 10^4$	$\lambda_3 = 430$		
MeCN	$346/\epsilon_1 = 2,38 \times 10^4$	$\lambda_1 = \underline{385}$	2927,7	58,6%
	$363/\epsilon_1 = 1,25 \times 10^4$	$\lambda_2 = 406$		
	$382/\epsilon_2 = 8,08 \times 10^3$	$\lambda_3 = 428$		
Octan etylu	$346/\epsilon_1 = 2,03 \times 10^4$	$\lambda_1 = \underline{385}$	2927,7	52,8%
	$362/\epsilon_1 = 2,40 \times 10^4$	$\lambda_2 = 405$		
	$382/\epsilon_2 = 8,08 \times 10^3$	$\lambda_3 = 427$		
Cykloheksan	$336/\epsilon_1 = 2,61 \times 10^4$	$\lambda_1 = \underline{383}$	2299,4	62,6%

	$346/\varepsilon_2 = 2,42 \times 10^4$	$\lambda_2 = 404$		
	$352/\varepsilon_3 = 2,44 \times 10^4$	$\lambda_3 = 426$		
	$363/\varepsilon_4 = 1,33 \times 10^4$			
	$382/\varepsilon_5 = 9,22 \times 10^3$			
	$347/\varepsilon_1 = 2,02 \times 10^4$	$\lambda_1 = 386$		
THF	$364/\varepsilon_2 = 1,20 \times 10^4$	$\lambda_2 = 405$	2708,7	93%
	$383/\varepsilon_3 = 7,22 \times 10^3$	$\lambda_3 = 428$		

Tabela 6. Wybrane dane fizykochemiczne wyznaczone dla związku **Py-eter-BCN**

W przeciwieństwie do estru wydajność kwantowa fluorescencji eteru była zależna od użytego rozpuszczalnika. Znacznik **Py-eter-BCN** najwyższą wydajność kwantową fluorescencji wykazuje w roztworze tetrahydrofuranu i wynosi ona 93%. W pozostałych rozpuszczalnikach jest ona również dosyć wysoka i mieści się w przedziale od 82,1% dla chlorku metylenu do 52,8% dla roztworu w octanie etylu. Najniższą wydajność kwantową fluorescencji związek wykazuje w chloroformie. Związane jest prawdopodobnie z jego kwasowym charakterem, co może powodować degradację związku. Związek ten mimo wysokiej wydajności kwantowej fluorescencji w większości rozpuszczalników jest mniej atrakcyjny dla zastosowań biologicznych ze względu na wrażliwość na środowisko kwasowe.

W sposób analogiczny przeprowadziłam badania dla *N*-alkilowej pochodnej. Na Rysunku 87 przedstawiłam znormalizowane widma absorpcji i emisji związku **Py-N-BCN**. Do rejestracji widm również przygotowałam roztwory o stężeniu 5×10^{-6} mol/l w sześciu rozpuszczalnikach, różniących się polarnością. Po zarejestrowaniu widm elektronowej absorpcji i emisji dla pochodnej *N*-alkilowej wyznaczyłam metodą pośrednią wydajność kwantową fluorescencji w omówionych rozpuszczalnikach, a dane zebrałam w Tabeli 7.



Rysunek 87. Znormalizowane widma elektronowe absorpcji i emisji związku **Py-N-BCN** w różnych rozpuszczalnikach organicznych

Rozpuszczalnik	$\lambda_{ab}[\text{nm}]/\epsilon$	$\lambda_{em} [\text{nm}]$	Stokes shift [cm^{-1}]	Q_F
CH_2Cl_2	$332/\epsilon_1 = 1,92 \times 10^4$ $345/\epsilon_2 = 2,81 \times 10^4$	$\lambda_1 = 420$	5176,0	37,7%
CHCl_3	$332/\epsilon_1 = 1,50 \times 10^4$ $345/\epsilon_2 = 2,37 \times 10^4$	$\lambda_1 = 422$	5288,8	67,8%
MeCN	$328/\epsilon_1 = 1,78 \times 10^4$ $342/\epsilon_2 = 2,42 \times 10^4$	$\lambda_1 = 422$	5288,8	16,1%
Octan etylu	$328/\epsilon_1 = 2,30 \times 10^4$ $342/\epsilon_2 = 3,18 \times 10^4$	$\lambda_1 = 409$	4789,7	7,3%
Cykloheksan	$329/\epsilon_1 = 2,06 \times 10^4$ $343/\epsilon_2 = 3,01 \times 10^4$	$\lambda_1 = 391$	4819,7	4,9%
THF	$330/\epsilon_1 = 1,76 \times 10^4$ $343/\epsilon_2 = 2,74 \times 10^4$	$\lambda_1 = 409$	4704,6	9,8%

Tabela 7. Wybrane dane fizykochemiczne wyznaczone dla związku **Py-N-BCN**

Znacznik **Py-N-BCN** wykazywał niższe wydajności kwantowe fluorescencji w roztworach w porównaniu z dwoma opisanymi wyżej znacznikami. W przypadku związku **Py-N-BCN** najwyższą wydajność kwantową fluorescencji obserwowałam dla roztworu chloroformu i wynosiła ona 67,3%. Niska wydajność kwantowa fluorescencji została wyznaczona dla roztworów w cykloheksanie, octanie etylu oraz tetrahydrofuranie wynosiła ona kolejno 4,9%, 7,3% oraz 9,8%. W pozostałych rozpuszczalnikach jest ona wyższa i mieści się w przedziale od 16,1% dla roztworu w acetonitrylu do 37,7% dla roztworu w chlorku metylenu.

Wykonanie pomiarów fotofizycznych w roztworach umożliwiło mi zbadanie wpływu linkera na właściwości fotofizyczne otrzymanych pochodnych. Z wyżej opisanych danych jednoznacznie wynika, iż zmiana ugrupowań łączących fluorofor (układ pirenowy) z cząsteczką cyklooktynu ma bezpośredni wpływ na właściwości fluorescencyjne projektowanych znaczników. Najciekawsze właściwości luminescencyjne oraz wydajność kwantową fluorescencji w roztworach wykazuje pochodna estrowa.

Dla otrzymanych związków przeprowadziłam także badanie w ciele stałym. Podczas prac syntetycznych oraz przygotowywaniu monokryształów związku **Py-ester-BCN** zaobserwowałam zjawisko solwatochromizmu. Po krystalizacji związku **Py-ester-BCN** w chlorku metylenu obserwowałam zieloną fluorescencję w ciele stałym, natomiast po krystalizacji w cykloheksanie - niebieską fluorescencję (Rysunek 88).

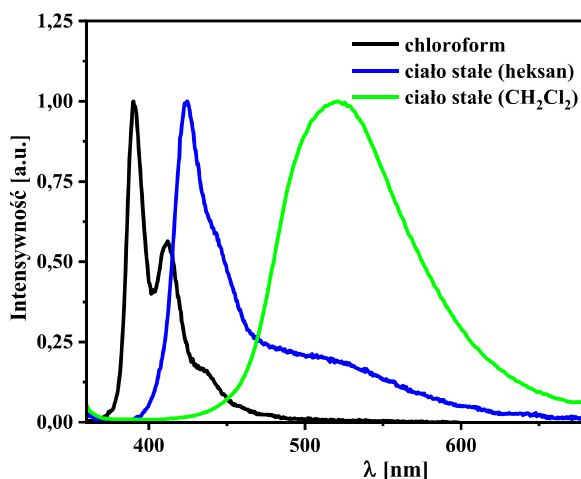


Rysunek 88. Fluorescencja związku **Py-ester-BCN** kolejno w roztworze chloroformu, w ciele stałym po krystalizacji z cykloheksanu i w ciele stałym po krystalizacji z chlorku metylenu

Dodatkowo badania rentgenostrukturalne wykonane w zespole Prof. Anny Makal potwierdziły możliwość układania się cząsteczek w komórce elementarnej w różny sposób. Gdy pierścienie pirenowe układają się w jednej linii to pomiędzy pierścieniami pirenowymi występują oddziaływania typu π - π (π -stacking) (Rysunek 73) co skutkuje zieloną barwą emisji typową dla ekscymerów pirenowych. Natomiast gdy pierścienie pirenowe nie oddziałują ze

sobą (Rysunek 74) obserwujemy niebieski kolor fluorescencji charakterystyczny dla monomeru.

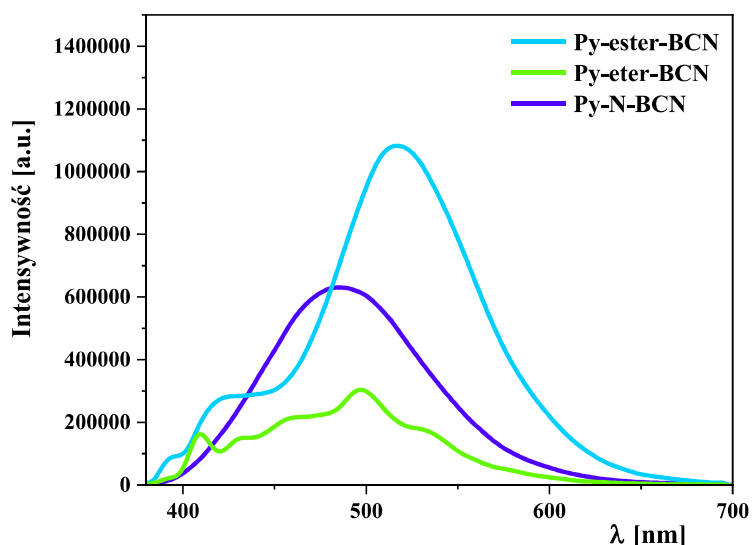
Potwierdzają to także zarejestrowane przeze mnie widma emisji w ciele stałym. Otrzymane widma emisyjne związku **Py-ester-BCN** po krystalizacji z chlorku metylenu oraz cykloheksanu przedstawiłam na Rysunku 89.



Rysunek 89. Znormalizowane widma emisyjne związku **Py-N-BCN** w roztworze chloroformu, w ciele stałym po krystalizacji z cykloheksanem i w ciele stałym po krystalizacji z chlorku metylenu

Uzyskane dane zachęciły mnie do dalszych badań właściwości fotofizycznych w ciele stałym. Przeprowadziłam je podczas trzech staży naukowych w laboratorium PPSM (ENS Paris-Saclay) we Francji w grupie dr Rémi Métévier. Jednostka ta posiada bardzo dobrze wyposażone laboratorium fotofizyczne oraz specjalizuje się w zaawansowanych badaniach z pogranicza fizyki i chemii.

Podczas stażu miałam możliwość zarejestrowania widm elektronowych emisji w ciele stałym (Rysunek 90) i wyznaczenia wydajności kwantowej fluorescencji w ciele stałym otrzymanych znaczników metodą bezpośrednią z wykorzystaniem sfery całkującej. Otrzymane wyniki zebrałam w Tabeli 8.



Rysunek 90. Widma elektronowe emisji związków **Py-ester-BCN**, **Py-eter-BCN** oraz **Py-N-BCN** w ciele stałym

Związek	Py-ester-BCN	Py-eter-BCN	Py-N-BCN
$Q_{c.st}$	36,4%	13,9%	26,8%

Tabela 8. Wydajność kwantowa fluorescencji w ciele stałym związków **Py-ester-BCN**, **Py-eter-BCN** oraz **Py-N-BCN**

Wykonane badania fotofizyczne znaczników luminescencyjnych w ciele stałym w PPSM potwierdzają wpływ ugrupowania łączącego fluorofor (układ pirenowy) z fragmentem cyklooktynowym na właściwości fluorescencyjne w ciele stałym projektowanych znaczników. Związki różnią się znacząco wyglądem widm emisyjnych oraz wykazują różną wydajność kwantową fluorescencji w ciele stałym. Najwyższa wartość $Q_{c.st}$ została wyznaczona dla **Py-ester-BCN** i wynosiła 36,4%, następnie dla pochodnej **Py-N-BCN** - 26,8%, a najniższa dla pochodnej **Py-eter-BCN** - 13,9%.

Dodatkowo, podczas stażu w grupie dr Rémięgo Métivier wyznaczyłam czasy życia fluorescencji w ciele stałym oraz w roztworach dla wyżej wymienionych związków. Otrzymane wyniki zebrałam w Tabeli 9, w której oprócz czasów życia fluorescencji w chlorku metylenu i acetonitrylu oraz ciele stałym, umieściłam dane dotyczące wydajności kwantowej fluorescencji.

Związek	Q_{yDCM}	τ [ns]	kr [10^7s^{-1}]	knr [10^7s^{-1}]	Q_{yMeCN}	τ [ns]	kr [10^7s^{-1}]	knr [10^7s^{-1}]	Q_{ysolid}	τ [ns]
Py- ester- BCN	89,8%	5,44	16,4	1,86	90,5%	6,82	13,2	1,39	36,4%	10,75
Py-eter- BCN	82,1%	10,23	7,98	1,74	58,6%	8,79	6,67	4,74	13,9%	15,32
Py-N- BCN	37,7%	1,13	53,1	87,7	16,1%	0,92	24,4	127,1	26,8%	0,76

Tabela 9. Wybrane dane fizykochemiczne wyznaczone dla związków **Py-ester-BCN**, **Py-eter-BCN** oraz **Py-N-BCN**

Analizując wyniki badań fotofizycznych w roztworach i w ciele stałym dla trzech otrzymanych przeze mnie znaczników stwierdziłam, że najciekawszym związkiem w tej grupie jest ester **Py-ester-BCN**. Jest on stabilny w środowisku kwasowym, wykazuje wysokie wydajności kwantowe fluorescencji zarówno w roztworach jak i w ciele stałym, co może być znaczące przy zastosowaniach praktycznych. Związek ten postanowiłam użyć jako modelowy do znakowania wybranych biocząsteczek.

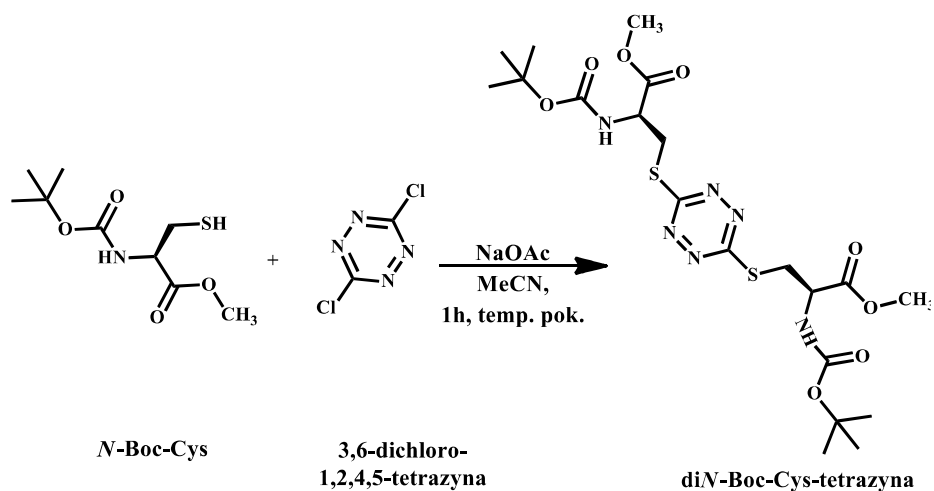
5.6. Zastosowanie pochodnej Py-ester-BCN w reakcjach z cząsteczkami biologicznie aktywnymi

Kolejnym etapem moich badań realizowanych w ramach rozprawy doktorskiej było sprawdzenie reaktywności wiązania potrójnego pierścienia cyklooktynu względem cząsteczek o znaczeniu biologicznym. Ze względu na najciekawsze właściwości fotofizyczne jako związek modelowy do reakcji z cząsteczkami biologicznie aktywnymi wybrałam znacznik **Py-ester-BCN**. Badania rozpoczęłam od funkcjonalizacji najprostszego aminokwasu zawierającego grupę -SH, tj. cysteiny. Do modyfikacji postanowiłam wykorzystać reakcję typu IEDDA.

W pierwszym etapie podjęłam próbę syntezy prostego analogu zmodyfikowanego mostka dwusiarczkowego, aby w drugim etapie móc przeprowadzić reakcję typu „click” między wiązaniem potrójnym obecnym w cząsteczce modelowego znacznika fluorescencyjnego oraz układem azotowym cząsteczki tetrazyny. Przeprowadzenie tej reakcji miało na celu zasymulowanie reakcji typu „click” zachodzących podczas modyfikacji biomolekuł na drodze reakcji bioortogonalnych.

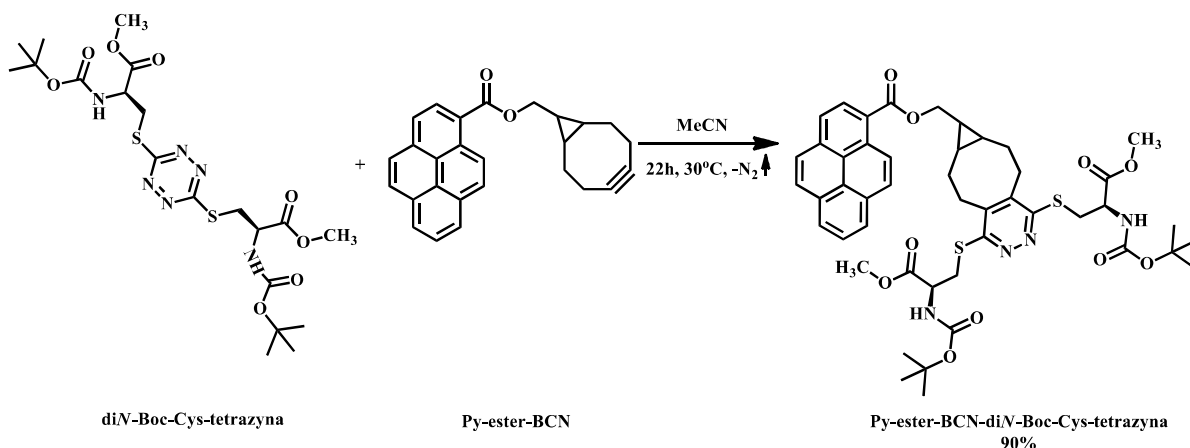
W pierwszym etapie podjęłam próbę syntezy prostego analogu zmodyfikowanego mostka dwusiarczkowego, aby w drugim etapie móc przeprowadzić reakcję typu „click” między wiązaniem potrójnym obecnym w cząsteczce modelowego znacznika fluorescencyjnego oraz układem azotowym cząsteczki tetrazyny. Przeprowadzenie tej reakcji miało na celu zasymulowanie reakcji typu „click” zachodzących podczas modyfikacji biomolekuł na drodze reakcji bioortogonalnych.

W pierwszym etapie (Schemat 40) ester metylowy N-Boc-L-cysteiny (**N-Boc-Cys**) oraz octan sodu rozpuściłam w acetonitrylu następnie do mieszaniny reakcyjnej dodałam porcjami rozpuszczoną w acetonitrylu dichlorotertazynę. Reakcję prowadziłam w temperaturze pokojowej, obserwując po 20 min. zmianę barwy mieszaniny reakcyjnej z malinowej na pomarańczowo-różową. Reakcję prowadziłam przez 1 h, kontrolując (TLC) zanik plamki pochodzącej od 3,6-dichloro-1,2,4,5-tetrazyny. Powstałą **diN-Boc-Cys-tetrazynę** użyłam do dalszej reakcji bez dodatkowego oczyszczania.



Schemat 40. Synteza **diN-Boc-Cys-tetrazyna**

Do mieszaniny reakcyjnej uzyskanej w I etapie dodałam porcjami rozpuszczony w acetonitrylu **Py-ester-BCN** (Schemat 41). Po ok. 30 min roztwór zrobił się intensywnie pomarańczowy i zaobserwowałam wypadanie białego osadu. Mieszaninę reakcyjną ogrzałam do 30°C i pozostawiłam na 22 h. Produkt wydzieliłam z mieszaniny poreakcyjnej na drodze ekstrakcji, a następnie oczyściłam go za pomocą chromatografii kolumnowej.



Schemat 41. Synteza **Py-ester-BCN-diN-Boc-Cys-tetrazyny**

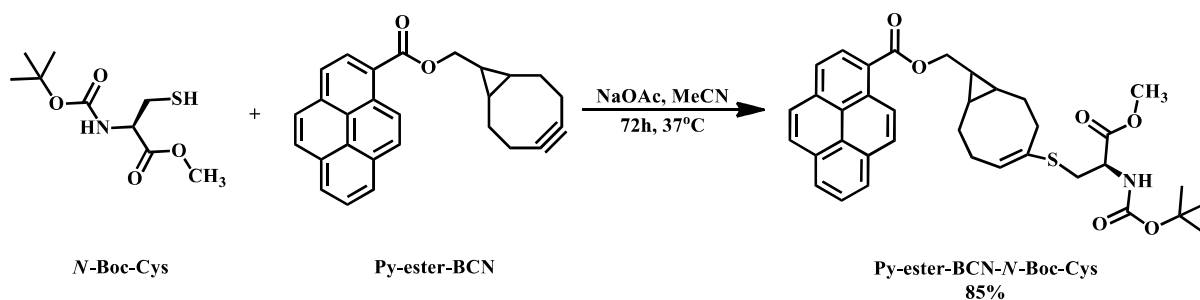
W widmie $^1\text{H NMR}$ (600MHz, CDCl_3) związku **Py-ester-BCN-diN-Boc-Cys-tetrazyna** obecne są sygnały protonów pierścienia cyklopropanowego - multiplet w zakresie 0,87-0,91 ppm odpowiada dwóm protonom, a multiplet w zakresie 1,06-1,09 ppm odpowiada jednemu protonowi. Multiplet 18 protonów w zakresie 1,41-1,42 ppm odpowiada protonom dwóch grup *tert*-butylowych. Multiplet w zakresie 2,63-2,68 ppm odpowiada dwóm protonom pierścienia cyklooktynowego, multiplet w zakresie 2,82-2,92 ppm odpowiada czterem protonom pierścienia cyklooktynowego. Następnie obecny jest multiplet w zakresie 3,73-3,79 od

12 protonów - sygnał od sześciu protonów dwóch grup $-CH_3$ nałożył się z sygnałem od czterech protonów dwóch grup $-CH_2$ związanych z atomami siarki oraz sygnałem od dwóch protonów pierścienia cyklooktynowego. Dublet przy 4,26 ppm o stałej sprzężenia $J = 7,3$ Hz pochodzi od dwóch protonów grupy $-CH_2$ związanej z atomem tlenu grupy estrowej, multiplet w zakresie 4,59-4,66 ppm pochodzi od dwóch protonów dwóch grup $-CH$ związanych z atomem azotu, a poszerzony singlet przy 5,69 ppm odpowiada dwóm protonom grup $-NH$. Najdalej przesunięte sygnały odpowiadają protonom pierścienia pirenowego - tryplet jednego protonu przy 8,05 ppm o stałej sprzężenia $J = 6,6$ Hz, dublet jednego protonu przy 8,08 ppm o stałej sprzężenia $J = 8,9$ Hz, multiplet w zakresie 8,22-8,28 ppm pochodzi od trzech protonów układu aromatycznego. Następnie obecne są dwa dublety - dublet jednego protonu przy 8,59 ppm o stałej sprzężenia $J = 8,0$ Hz oraz dublet pochodzący od jednego protonu przy 9,20 ppm o stałej sprzężenia $J = 9,4$ Hz.

W widmie ^{13}C NMR (150MHz, $CDCl_3$) związku **Py-ester-BCN-diN-Boc-Cys-tetrazyna** obecne są sygnały obecnych w cząsteczce atomów węgla grup karbonylowych oraz $C=N$, odpowiednio przy 171,4, 171,3, 168,1, 158,1, 155,3. Sygnały pochodzące od atomów węgla układów aromatycznych znajdują się przy: 138,8, 134,3, 131,0, 129,6, 129,4, 128,3, 127,2, 126,4, 126,3, 126,2, 124,9, 124,2, 124,1, 123,9, natomiast alifatyczne atomy węgla obecne w cząsteczce znajdują się przy 68,5, 53,3, 52,6, 32,7, 28,3, 27,6, 27,2, 26,8, 21,5.

Zachęcona wyżej opisanymi wynikami postanowiłam podjąć próbę bezpośredniej addycji tiolu do wiązania potrójnego obecnego w cząsteczce cyklooktynu (Schemat 42). Możliwość bezpośredniej funkcjonalizacji mogłaby stanowić nową prostą metodę znakowania biocząsteczek zawierających wolne grupy $-SH$ w warunkach fizjologicznych. Ważne wydało mi się także dobranie warunków reakcji tak, aby były jak najbardziej zbliżone do fizjologicznych.

W tym celu **N-Boc-Cys** oraz octan sodu rozpuściłam w acetonitrylu, a następnie dodałam porcjami **Py-ester-BCN** i mieszaninę reakcyjną podgrzałam do $37^\circ C$ (warunki temperaturowe zbliżone do fizjologicznych). Reakcję prowadziłam 72 h kontrolując jej przebieg za pomocą chromatografii cienkowarstwowej. Następnie surowy produkt wydzieliłam z mieszaniny poreakcyjnej stosując ekstrakcję i oczyściłam go chromatograficznie.



Schemat 42. Synteza **Py-ester-BCN-*N*-Boc-Cys**

Analiza widma protonowego umożliwiła mi potwierdzenie struktury produktu **Py-ester-BCN-*N*-Boc-Cys** - w wyniku wyżej opisanej reakcji otrzymałam produkt monoaddycji. W widmie ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) związku **Py-ester-BCN-*N*-Boc-Cys** obecne są sygnały protonów pierścienia cyklopropanowego - multiplet w zakresie 1,02-1,04 ppm odpowiada jednemu protonowi, a multiplet w zakresie 1,06-1,13 ppm odpowiada dwóm protonom. Multiplet pochodzący od 11 protonów w zakresie 1,44-1,46 ppm odpowiada dziewięciu protonom grupy *tert*-butylowej oraz dwóm protonom pierścienia cyklooktynowego. Następne sygnały pochodzą od protonów pierścienia cyklooktynowego - multiplet w zakresie 2,15-2,21 ppm odpowiada jednemu protonowi, multiplet w zakresie 2,28-2,34 ppm odpowiada dwóm protonom, multiplet w zakresie 2,34-2,40 ppm odpowiada jednemu protonowi, multiplet w zakresie 2,42-2,47 ppm odpowiada jednemu protonowi, multiplet w zakresie 2,52-2,58 ppm odpowiada jednemu protonowi. Multiplet w zakresie 2,99-3,14 ppm odpowiada dwóm protonom grupy $-\text{CH}_2$ związanej z atomem siarki. Kolejnymi sygnałami w widmie są dublet przy 3,75 ppm o stałej sprzężenia $J = 8,4$ Hz pochodzący od trzech protonów grupy $-\text{OCH}_3$ i tryplet przy 4,37 ppm o stałej sprzężenia $J = 7,2$ Hz pochodzący od dwóch protonów grupy $-\text{CH}_2$ związanej z atomem tlenu. Multiplet jednego protonu przy 4,58 ppm pochodzi od grupy $-\text{CH}$ związanej z atomem azotu, a poszerzony singlet przy 5,30 ppm odpowiada protonowi grupy $-\text{NH}$. Multiplet w zakresie 5,88-5,91 ppm pochodzi od protonu przyłączonego do atomu węgla wiązania podwójnego obecnego w pierścieniu cyklooktynowym. Najdalej przesunięte sygnały odpowiadają protonom układu pirenowego – tryplet od jednego protonu przy 8,07 ppm o stałej sprzężenia $J = 7,6$ Hz, dublet od jednego protonu przy 8,10 ppm o stałej sprzężenia $J = 8,9$ Hz, dublet od dwóch protonów przy 8,18 ppm o stałej sprzężenia $J = 9,6$ Hz, dublet od jednego protonu przy 8,23 ppm o stałej sprzężenia $J = 9,4$ Hz, a tryplet przy 8,27 ppm o stałej sprzężenia $J = 8,7$ Hz pochodzi od dwóch protonów układu aromatycznego. Ostatnie sygnały obecne w widmie związku **Py-ester-BCN-*N*-Boc-Cys** to dublet od jednego protonu przy 8,62 ppm

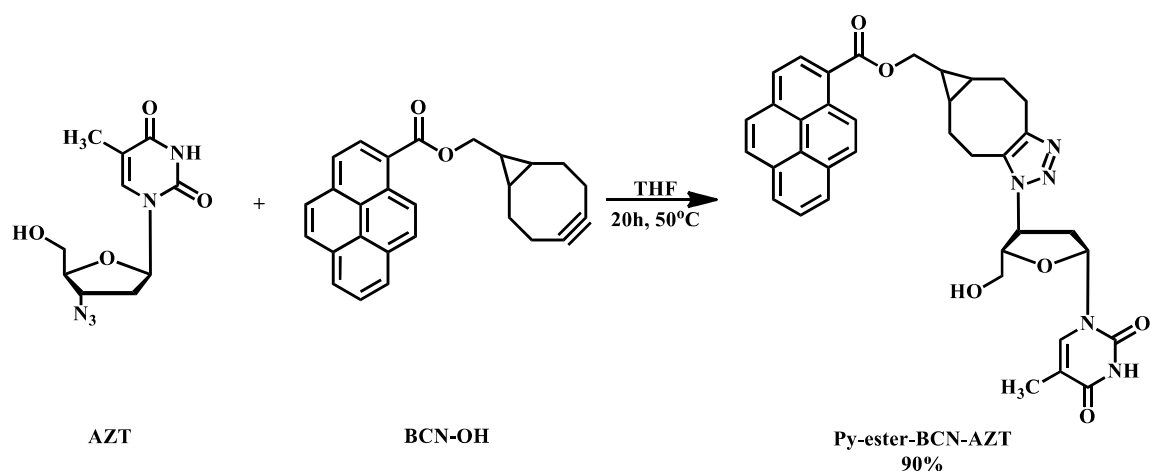
o stałej sprzężenia $J = 7,8$ Hz oraz dublet odjednego protonu przy 9,24 ppm o stałej sprzężenia $J = 9,6$ Hz.

W widmie ^{13}C NMR (150MHz, CDCl_3) związku **Py-ester-BCN-N-Boc-Cys** znajdują się sygnały obecnych w cząsteczce atomów węgla grup karbonylowych oraz $\text{C}=\text{N}$, odpowiednio przy: 171,4, 171,3, 168,1, 158,1, 155,3, sygnały atomów węgla układów aromatycznych znajdują się przy: 138,8, 134,3, 131,0, 129,6, 129,4, 128,3, 127,2, 126,4, 126,3, 126,2, 124,9, 124,2, 124,1, 123,9, a sygnały od alifatycznych atomów węgla obecne są przy: 69,3, 52,4, 33,9, 31,6, 29,4, 29,2, 28,3, 28,3, 27,4, 26,4, 23,3, 23,0, 22,1.

Wyniki przeprowadzonej reakcji są obiecujące w kontekście możliwości aplikacyjnych.

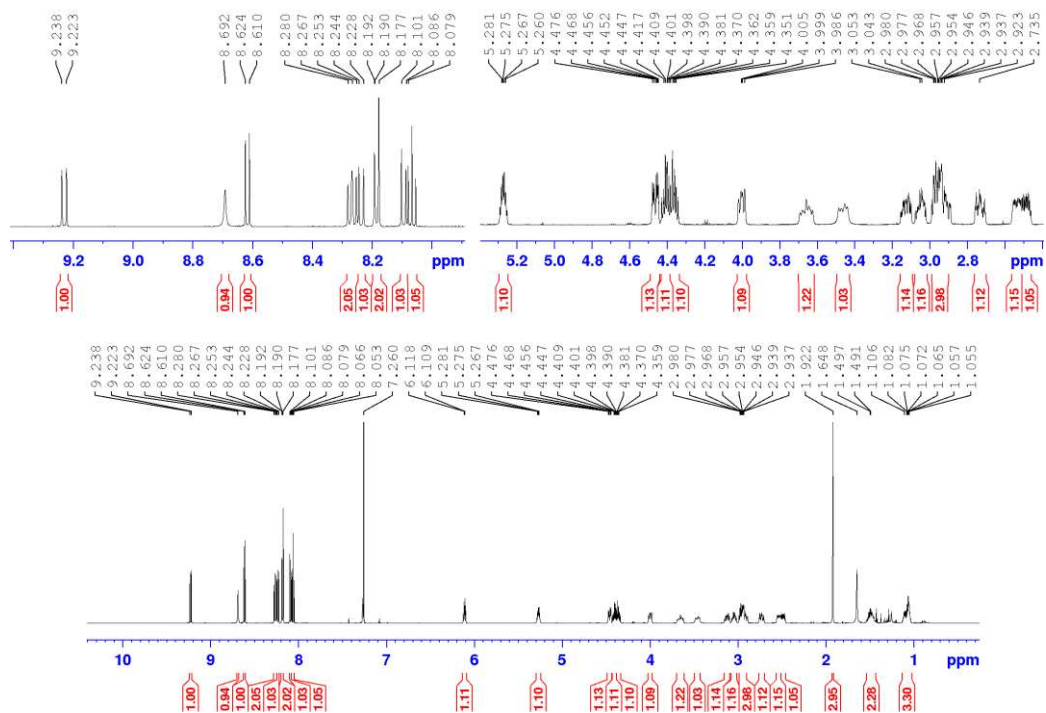
Znaczniki fluorescencyjne mogą być stosowane nie tylko do znakowania określonych elementów komórkowych, takich jak w/w grupy $-\text{SH}$. Ich stosowanie pozwala także na nieinwazyjne śledzenie procesów zachodzących w żywych organizmach. Jednym z takich procesów jest monitorowanie postępów terapii, szczególnie ważne przy leczeniu chorób nowotworowych. Przyłączenie znacznika fluorescencyjnego do cząsteczki farmaceutyku może pomóc w lepszym zrozumieniu procesu jego wchłaniania, ścieżki metabolicznej i jego oddziaływania na organizm. Interesującym zatem wydało mi się sprawdzenie czy możliwe jest użycie opracowanego przeze mnie znacznika do znakowania leków. Pozostając w obrębie reakcji bioortogonalnych uznałam, że **Py-ester-BCN** powinien być reaktywny w reakcjach cykloaddycji typu SPAAC. Aby można było przeprowadzić taką reakcję z w/w związkiem drugi reagent powinien zawierać ugrupowanie azydkowe. Ugrupowanie takie posiada 3'-azydo-3'-deoksytymidyna (**AZT**), która jest stosowana jako lek antyretrowirusowy (*Zidovudinum*), np. w leczeniu zakażeń wirusem HIV. Interesującym wydało mi się zatem przeprowadzenie reakcji „click” **Py-ester-BCN** z **AZT**.

W tym celu **Py-ester-BCN** rozpuściłam w THF w 50°C , a następnie do mieszaniny dodałam **AZT** rozpuszczone w niewielkiej ilości wody. Reakcję prowadziłam w 50°C przez 20 h (Schemat 43). Następnie odparowałam rozpuszczalnik, a surowy produkt oczyściłam za pomocą chromatografii kolumnowej, stosując jako układ rozwijający mieszaninę chloroform : metanol 99:1.



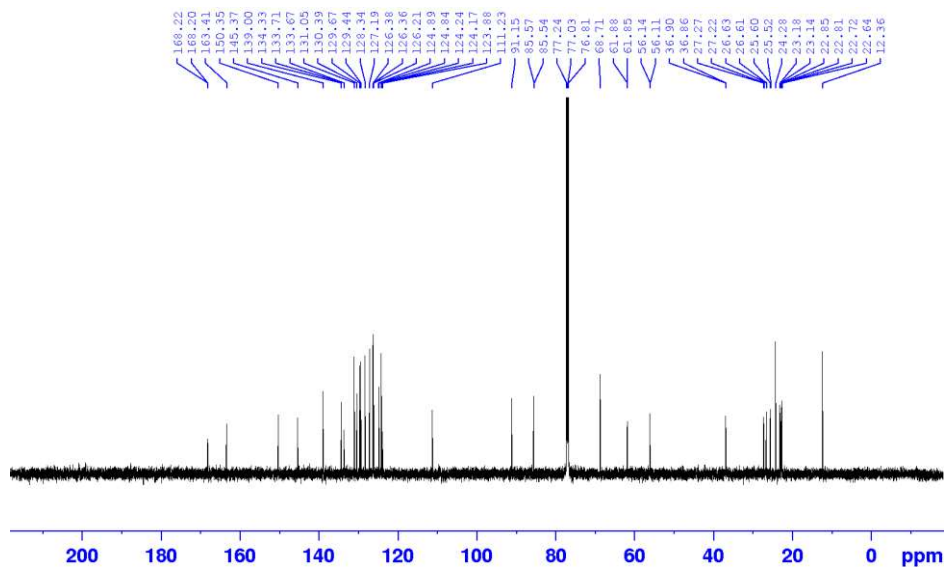
Schemat 43. Synteza **Py-ester-BCN-AZT**

Strukturę otrzymanego związku potwierdziłam wykonując analizę spektroskopową. W widmie $^1\text{H NMR}$ (600MHz, CDCl_3) związku **Py-ester-BCN-AZT** (Rysunek 91) obecny jest multiplet w zakresie 1,03-1,13 ppm pochodzący od trzech protonów cyklopropanu. Singlet przy 1,92 ppm odpowiada trzem protonom grupy CH_3 . Następne sygnały pochodzą od protonów pierścienia cyklooktynowego oraz układu cyklicznego AZT są to multiplety w zakresach: 2,46-2,51, 2,70-2,76, 2,91-2,99, 3,02-3,07, 3,09-3,15, 3,44-3,49, 3,62-3,69, 3,99-4,02, 4,34-4,38, 4,39-4,42, 4,44-4,48 oraz 5,25-52,8 odpowiadające jednemu protonowi każdy. Kwartet przy 6,13 ppm o stałych sprzężenia $J_1 = 5,2$ Hz i $J_2 = 6,7$ Hz odpowiada jednemu protonowi. Kolejne sygnały odpowiadają protonom pierścienia pirenowego - tryplet od jednego protonu przy 8,08 ppm o stałej sprzężenia $J = 7,6$ Hz, dublet od jednego protonu przy 8,10 ppm o stałej sprzężenia $J = 8,8$ Hz, a dublet przy 8,19 ppm o stałej sprzężenia $J = 8,8$ Hz odpowiada dwóm protonom. Kolejne sygnały to dublet jednego protonu przy 8,24 ppm o stałej sprzężenia $J = 9,4$ Hz, tryplet dwóch protonów przy 8,28 ppm o stałej sprzężenia $J = 8,3$ Hz oraz dublet jednego protonu przy 8,62 ppm o stałej sprzężenia $J = 8,0$ Hz. Przy 8,69 ppm obecny jest poszerzony singlet pochodzący od protonu grupy $-\text{OH}$, a najdalej przesunięty sygnał przy 9,24 ppm to dublet jednego protonu o stałej sprzężenia $J = 9,4$ Hz.



Rysunek 91. Widmo ¹H NMR **Py-ester-BCN+AZT** w CDCl₃ (600 MHz)

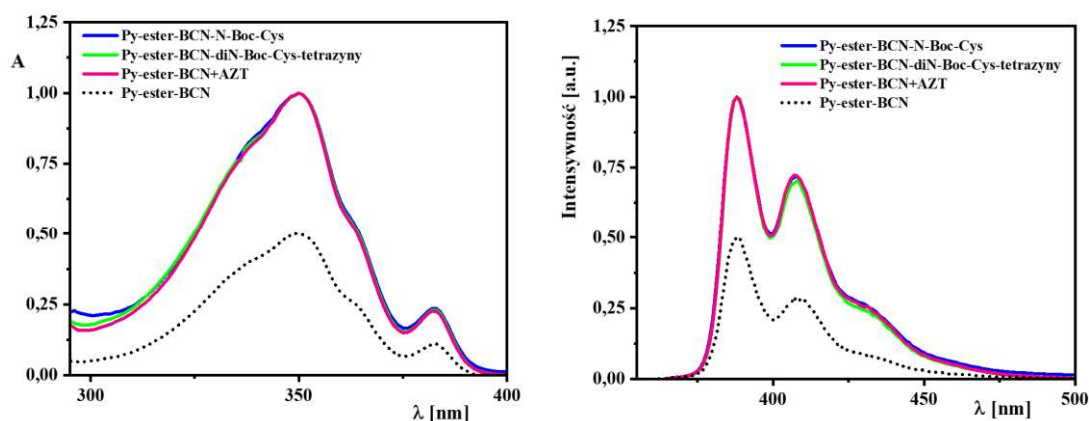
W widmie ¹³C NMR (150MHz, CDCl₃) **Py-ester-BCN+AZT** (Rysunek 92) sygnały przy 168,2, 163,4, 150,3 ppm odpowiadają karbonylowym atomom węgla. Sygnały δ: 145,4, 139,0, 134,3, 133,7, 133,6, 131,1, 130,4, 129,7, 129,4, 128,3, 127,2, 126,4, 126,2, 124,9, 124,2, 123,9 ppm pochodzą od atomów węgla pierścienia pirenowego. Sygnały pochodzące od alifatycznych atomów węgla pierścienia cukrowego AZT, cyklooktynowego i cyklopropanowego znajdują się przy 111,2, 91,1, 85,6, 85,5, 68,7, 61,9, 61,8, 56,2, 36,9, 36,8, 27,3, 26,6, 25,6, 25,5, 24,3, 23,2, 22,9, 22,7, 22,6, 12,4 ppm.



Rysunek 92. Widmo ¹³C NMR **Py-ester-BCN-AZT** w CDCl₃ (150 MHz)

5.7. Badania fotofizyczne koniugatów uzyskanych w reakcjach Py-ester-BCN z cząsteczkami o znaczeniu biologicznym

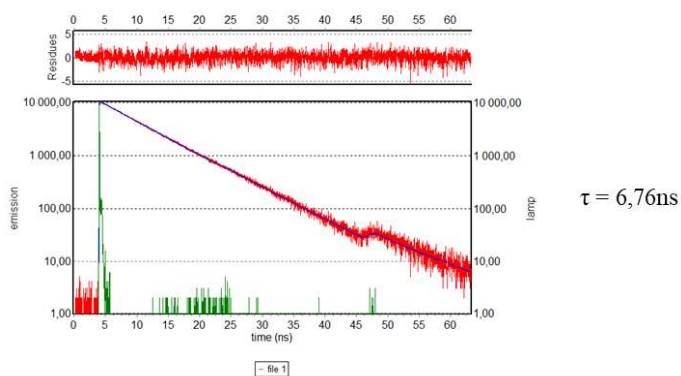
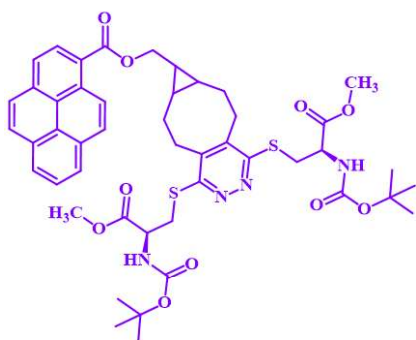
Podczas stażu naukowego w laboratorium PPSM (ENS Paris-Saclay) w grupie dr Rémiego Métivier oraz dr Clémence Allain, zbadalam właściwości fotofizyczne opisanych w poprzednim podrozdziale koniugatów. Zarejestrowalam widma elektronowej absorpcji oraz emisji w roztworze acetonitrylu (Rysunek 93). Widma zostały zarejestrowane dla roztworów, dla których absorbancja wynosiła 0,1 dla λ_{\max} .



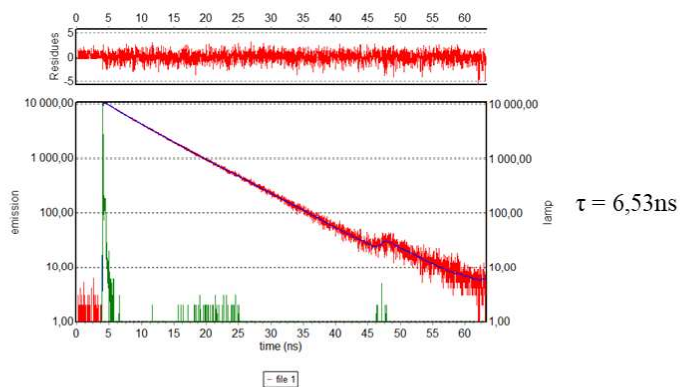
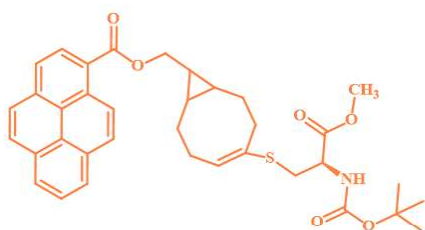
Rysunek 93. Widma elektronowe absorpcji i emisji otrzymanych koniugatów w roztworze acetonitrylu

Kształt krzywych potwierdza, że za właściwości luminescencyjne otrzymanych koniugatów odpowiada układ pirenowy znacznika **Py-ester-BCN**. Maksima absorpcji i emisji koniugatów pokrywają się z wartościami λ_{\max} znacznika (linia przerywana).

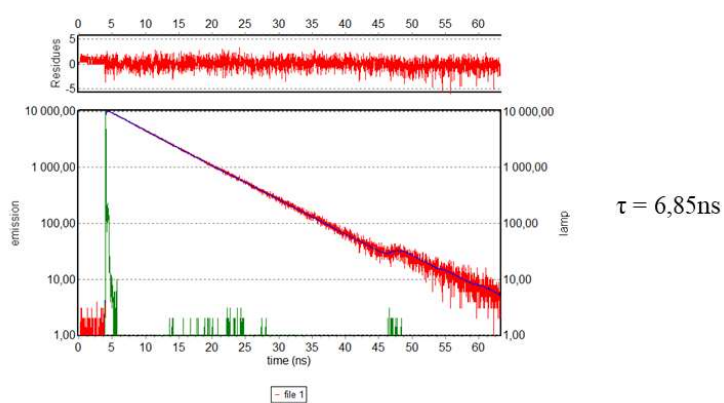
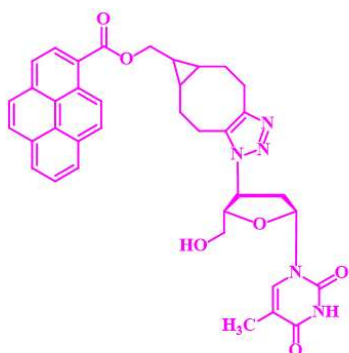
Dodatkowo, podczas stażu wykonałam badania mające na celu wyznaczenie czasów życia fluorescencji oraz wydajności kwantowej fluorescencji zsyntezowanych biokoniugatów w roztworze acetonitrylu. Pomiar krzywych zaniku fluorescencji wykonałam metodą zliczania pojedynczych fotonów skorelowanych czasowo (metoda TCSPC - *time correlated single photon counting*). Zarejestrowane krzywe zaniku fluorescencji dla poszczególnych koniugatów zostały przedstawione przeze mnie na Rysunkach 94-96.



Rysunek 94. Krzywa zaniku fluorescencji koniugatu **Py-ester-BCN-diN-Boc-Cys-tetrazyny** w roztworze acetonitrylu



Rysunek 95. Krzywa zaniku fluorescencji koniugatu **Py-ester-BCN-N-Boc-Cys** w roztworze acetonitrylu



Rysunek 96. Krzywa zaniku fluorescencji koniugatu **Py-ester-BCN+AZT** w roztworze acetonitrylu

Związek	Q_{yMeCN}	τ [ns]
Py-ester-BCN-diN-Boc-Cys-tetrazyny	86,2%	6,76
Py-ester-BCN-N-Boc-Cys	83,7%	6,85
Py-ester-BCN+AZT	91,4%	6,65

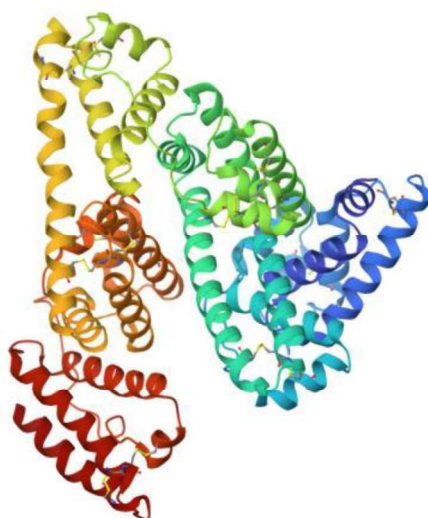
Tabela 10. Wybrane dane fizykochemiczne wyznaczone dla związków **Py-ester-BCN-diN-Boc-Cys-tetrazyny**, **Py-ester-BCN-N-Boc-Cys** oraz **Py-ester-BCN+AZT**

Otrzymane przez mnie koniugaty wykazują silną fluorescencję w roztworze acetonitrylu. Wartości wydajności kwantowej mieszczą się w przedziale 83,7% do 91,4% i są porównywalne z wydajnością kwantową użytego znacznika **Py-ester-BCN** (90,5%). Wyznaczone wartości wydajności kwantowej fluorescencji oraz czasy życia fluorescencji w acetonitrylu zostały zebrane w Tabeli 10.

Uzyskane wyniki pokazują, że otrzymany przez mnie znacznik **Py-ester-BCN** ma duży potencjał aplikacyjny. Może on zostać wykorzystany zarówno do znakowania, na drodze reakcji bioortogonalnych, biocząsteczek zawierających grupy -SH jak i mostki dwusiarczkowe. Ponadto, związek ten może być wykorzystany do znakowania fluorescencyjnego leków, czego przykładem jest przeprowadzona przez mnie reakcja z AZT. Znakowanie takie może stanowić nowe narzędzie diagnostyczne pozwalające na monitorowanie procesu leczenia z wykorzystaniem nieinwazyjnej spektroskopii fluorescencyjnej.

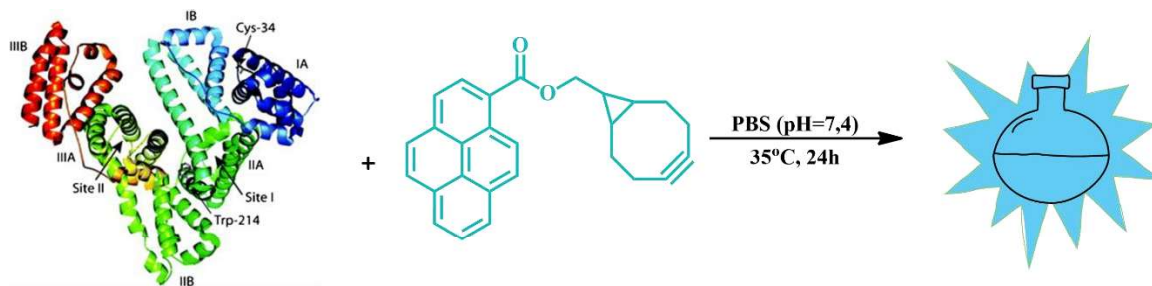
5.8. Zastosowanie pochodnej Py-ester-BCN w reakcjach z biomolekułami

Wyżej opisane syntezy koniugatów potwierdziły reaktywność modelowego znacznika fluorescencyjnego - **Py-ester-BCN** wobec prostych cząsteczek takich jak: ester metylowy *N*-Boc-L-cysteiny (**N-Boc-Cys**) czy **AZT** (3'-Azydo-3'-deoksytymidyna), a otrzymane koniugaty wykazywały interesujące właściwości fotofizyczne. Wysoka wydajność kwantowa otrzymanych koniugatów charakterystyczna dla **Py-ester-BCN** zachęciła mnie do sprawdzenia działania tego znacznika względem bardziej skomplikowanych układów. Do eksperymentu tego postanowiłam użyć białka HSA - albuminy surowicy ludzkiej (Rysunek 97), która jest najobficiej występującym białkiem w ludzkim osoczu.



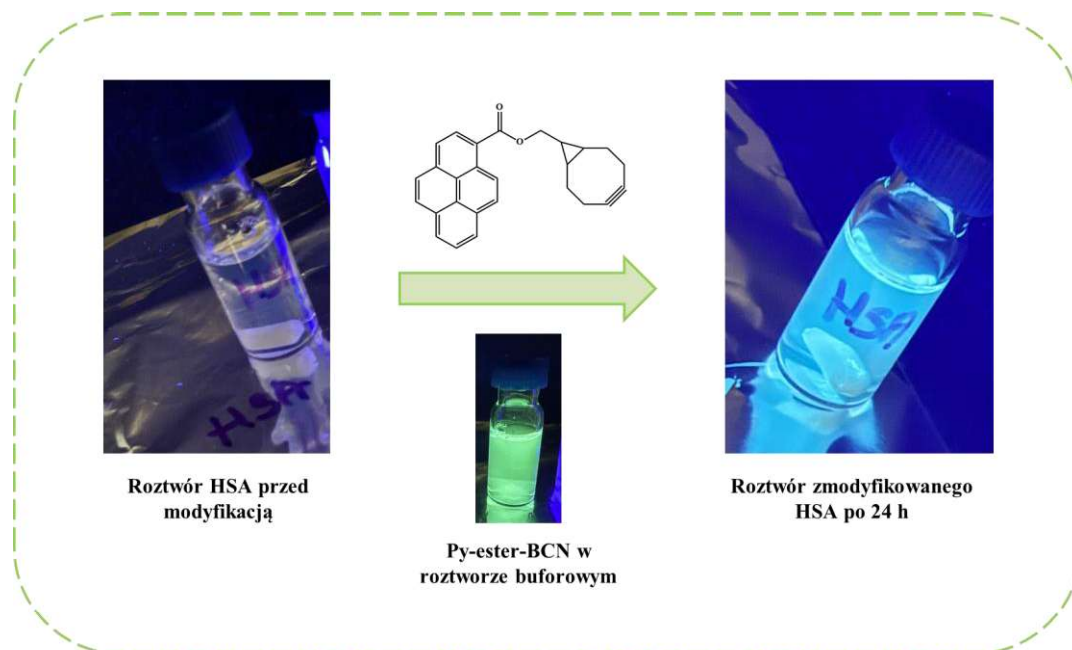
Rysunek 97. Struktura albuminy surowicy ludzkiej
(Pobrana ze strony <https://www.rcsb.org/structure/1AO6>)

Wybór HSA jako modelowego białka nie był przypadkowy, ponieważ w jego strukturze 34 z 35 reszt cysteiny tworzy mostki dwusiarczkowe, a jedna reszta cysteiny (Cys-34) pozostaje niezwiązana. Obecność wolnej grupy tiolowej reszty cysteiny w pozycji Cys-34 jest kluczowa dla modyfikacji strukturalnych tego białka. Dodatkowo, w 2014 roku ukazała się praca (*J. Am. Chem. Soc.*, 2014, 136, 13233-13239), w której opisane zostało selektywne znakowanie HSA w pozycji Cys-34 i detekcja otrzymanego koniugatu za pomocą spektroskopii UV-VIS i emisyjnej. Tak jak wykazałam we wcześniejszej części pracy znacznik **Py-ester-BCN** reaguje, w warunkach zbliżonych do fizjologicznych, z grupą -SH cysteiny. Postanowiłam zatem sprawdzić czy znacznik ten będzie reagował z HSA i czy możliwym będzie bezpośrednie śledzenie zachodzących zmian za pomocą spektroskopii fluorescencyjnej (Schemat 44).



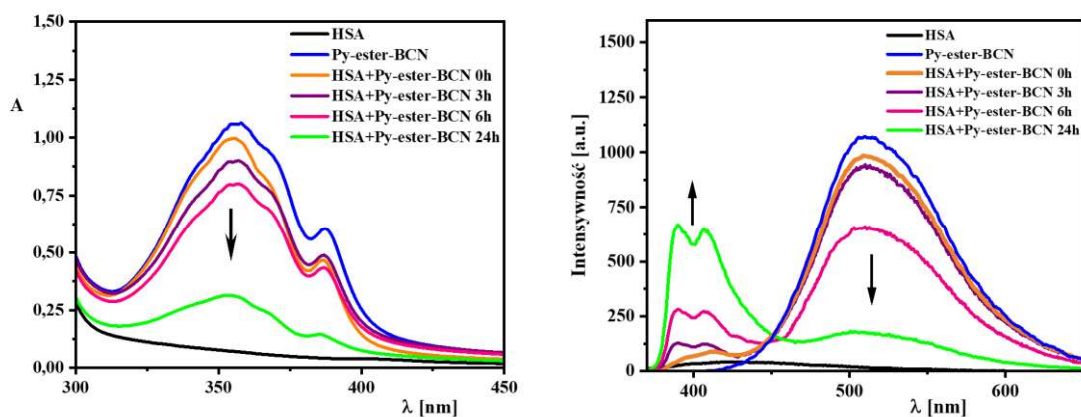
Schemat 44. Znakowanie HSA za pomocą **Py-ester-BCN**

W tym celu przygotowałam roztwór HSA (0,060 μmol) w buforze PBS (1 ml) – aby odwzorować warunki fizjologiczne, do którego dodałam roztwór **Py-ester-BCN** (0,066 μmol) w mieszaninie woda + DMSO (0,9 ml:100 μl). Dodatek DMSO miał na celu zwiększenie rozpuszczalności znacznika fluorescencyjnego w mieszaninie reakcyjnej. Następnie całość ogrzałam do 35°C (warunki zbliżone do fizjologicznych) i mieszałam przez 24 h. W celu obserwacji zachodzących zmian i kontroli przebiegu reakcji rejestrowałam widma absorpcji i emisji. Podczas reakcji HSA z pochodną estrową cyklooktynu widoczna jest zmiana barwy fluorescencji roztworu. Niezmodyfikowana albumina wykazywała bardzo słabą fluorescencję. Dodanie znacznika fluorescencyjnego początkowo wywołało zwiększenie fluorescencji roztworu - sam znacznik w roztworze wodnym wykazuje zieloną fluorescencję, natomiast po 24 h mieszanina reakcyjna zmieniła kolor emisji na jasnoniebieską (Rysunek 98), co może sugerować zakończenie reakcji.



Rysunek 98. Zdjęcia roztworów reagentów i mieszaniny poreakcyjnej (**HSA+ Py-ester-BCN**) w świetle UV ($\lambda=365\text{ nm}$)

Na Rysunku 99 zamieściłam widma absorpcji i emisji pokazujące zmiany zachodzące w czasie 24 h w mieszaninie **HSA+ Py-ester-BCN**.

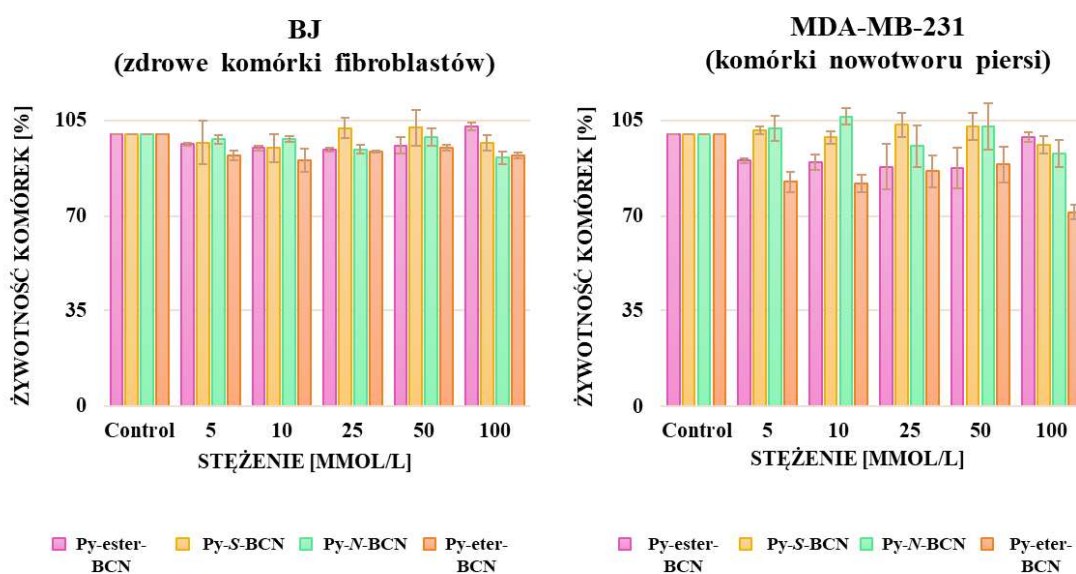


Rysunek 99. Widma absorcyjne i emisyjne zarejestrowane podczas znakowania HSA ludzkiej znacznikiem fluorescencyjnym **Py-ester-BCN**

Samo niezmodyfikowane białko wykazywało bardzo słabą fluorescencję (linia czarna), a roztwór znacznika wykazuje zieloną fluorescencję, co potwierdza widmo elektronowe emisji zarejestrowane w zakresie 400 – 630 nm (linia niebieska - $\lambda_{\text{max}} = 510$ nm). Rejestracja zmian emisji zachodzących po 3 h, 6 h, 24 h pozwala na obserwację zmian zachodzących w mieszaninie reakcyjnej. Wraz z upływem czasu zmniejsza się intensywność fluorescencji w wyżej wymienionym obszarze. Jednocześnie widoczne jest pojawienie się nowych pasm emisji w obszarze fal krótszych. Po 24 h następuje zmiana barwy emitowanego światła z zielonej na niebieską. Zmiany te mogą być związane z addycją znacznika **Py-ester-BCN** do wolnej grupy -SH Cys34 znajdującej się w HSA. Przeprowadzony eksperyment pokazuje, że opracowany znacznik fluorescencyjny może oddziaływać z większymi białkami, a zmiany wywołane jego obecnością w układzie mogą być monitorowane za pomocą spektroskopii fluorescencyjnej.

5.9. Badania aktywności biologicznej zsyntezowanych znaczników fluorescencyjnych

Dla zsyntezowanych znaczników - **Py-ester-BCN**, **Py-eter-BCN**, **Py-N-BCN** oraz **Py-S-BCN** we współpracy z zespołem dr hab. Sylwii Michlewskiej zostały przeprowadzone badania biologiczne. Dla w/w związków przeprowadzono testy cytotoksyczności wobec dwóch różnych linii komórkowych - komórek zdrowych (BJ) oraz komórek potrójnie negatywnego nowotworu piersi (MDA-MB-231). Z uzyskanych wyników zebranych na Rysunku 100 wynika, iż badane znaczniki nie są cytotoksyczne po 24 h zarówno dla komórek prawidłowych jak i nowotworowych.



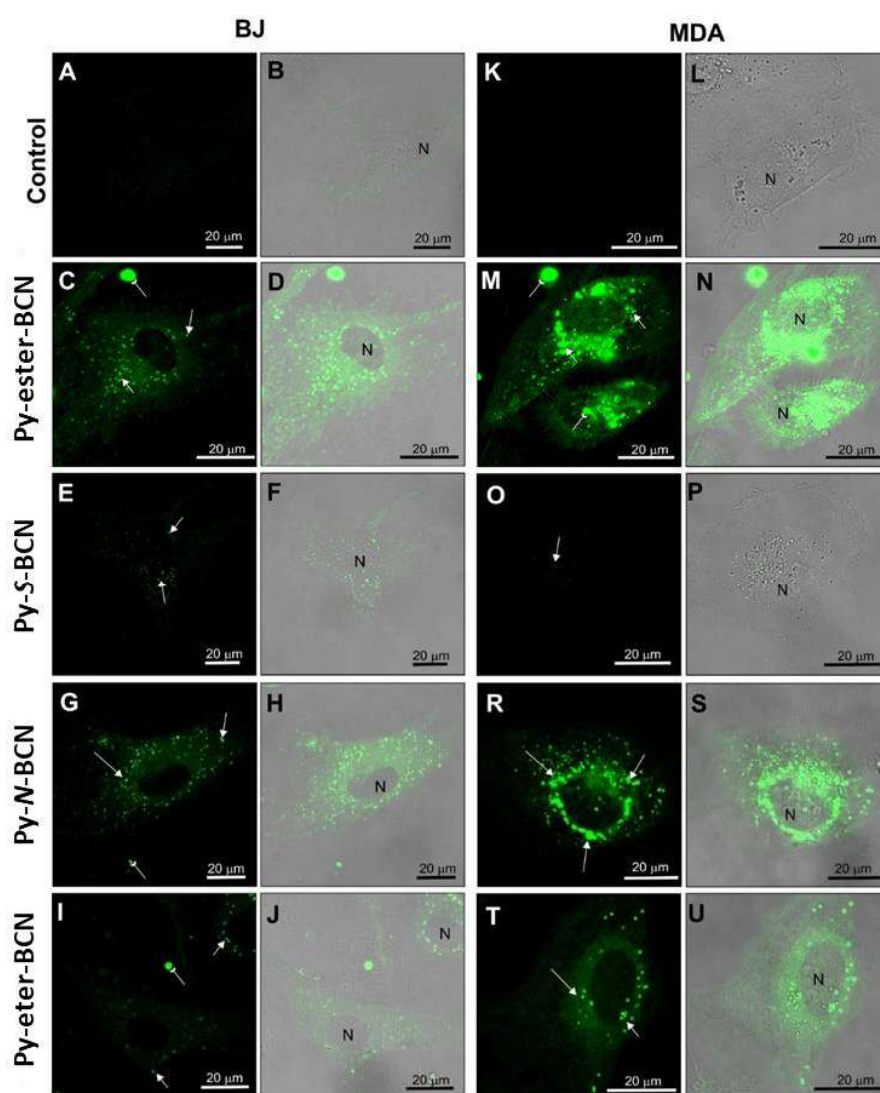
Rysunek 100. Cytotoksyczność badanych związków względem komórek fibroblastów (BJ) oraz komórek nowotworowych (MDA-MB-231)

Nawiązując do pierwotnego założenia mojej rozprawy doktorskiej, iż zsyntezowane przeze mnie znaczniki fluorescencyjne miałyby znaleźć zastosowanie w znakowaniu biomolekuł, bioobrazowaniu, czy monitorowaniu procesu leczenia, to uzyskane wyniki badań biologicznych są bardzo obiecujące i potwierdzają wysoki potencjał aplikacyjny otrzymanych związków.

Oprócz wyżej opisanych badań biologicznych, które zostały przeprowadzone we współpracy z zespołem dr hab. Sylwii Michlewskiej, wykonane zostało obrazowanie za pomocą mikroskopii konfokalnej. Rezultaty wprowadzenia znaczników do komórek prawidłowych oraz nowotworowych zostały przedstawione na Rysunku 101.

Do badań mikroskopowych zostały wykorzystane te same linie komórkowe, dla których zostały przeprowadzone badania cytotoksyczności - prawidłowe komórki fibroblastów (BJ)

i komórki nowotworowe raka piersi MDA-MB-231. Wśród badanych związków, zarówno w przypadku komórek prawidłowych, jak i nowotworowych znaczniki **Py-ester-BCN**, **Py-eter-BCN**, **Py-N-BCN** wykazywały intensywne sygnały fluorescencyjne. W przypadku komórek MDA-MB-231 fluorescencja badanych związków była intensywniejsza, co prawdopodobnie wynika z ich większej aktywności metabolicznej. Wzór barwienia komórek był podobny niezależnie od badanych znaczników luminescencyjnych i linii komórkowych. Oprócz niewielkich, intensywnie fluorescencyjnych osadów wewnątrz komórki (biała strzałka), znaczniki zabarwiają błony komórkowe w cytoplazmie, szczególnie w okolicy jądra komórkowego, czyli w obszarze bogatym w retikulum endoplazmatyczne.



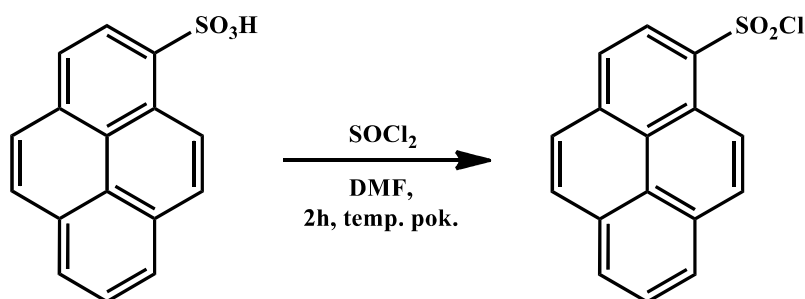
Rysunek 101. Porównanie fluorescencji badanych związków w komórkach BJ oraz komórkach nowotworowych MDA-MB-231 po 2- godzinnej inkubacji (stężenie **10 μM**)

5.10. Synteza nowych pochodnych maleimidu zawierających fragment pirenowy

Wykonane w ramach rozprawy doktorskiej badania potwierdziły reaktywność bromopochodnych maleimidu wobec biologicznie istotnych tioli oraz ich szerokie zastosowanie w reakcjach biokoniugacji. Próba zastosowania pochodnych pirenu, które wykazują szereg ciekawych właściwości fizykochemicznych, podczas projektowania nowych znaczników fluorescencyjnych zakończyła się sukcesem. W literaturze znajduje się wiele doniesień, że maleimid może być podstawiony zarówno w pozycjach alkenylowych, jak i w grupie imidowej, co umożliwiła syntezowanie mono-, di- i trójfunkcyjnych podstawionych pochodnych. (*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2024**, *21*, 63). Ponadto, w 2011 roku została opublikowana praca, w której opisano różne warianty wprowadzania aromatycznych podstawników w pozycjach alkenylowych maleimidu na drodze reakcji sprzęgania Hecka i Suzuki katalizowanych palladem (*J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 9, 3122-3130). Zainteresowana otrzymanymi wynikami podjęłam próbę zaprojektowania oraz syntezy znaczników, które będą zawierać w swej strukturze układ pirenowy przyłączony do pierścienia maleimidowego.

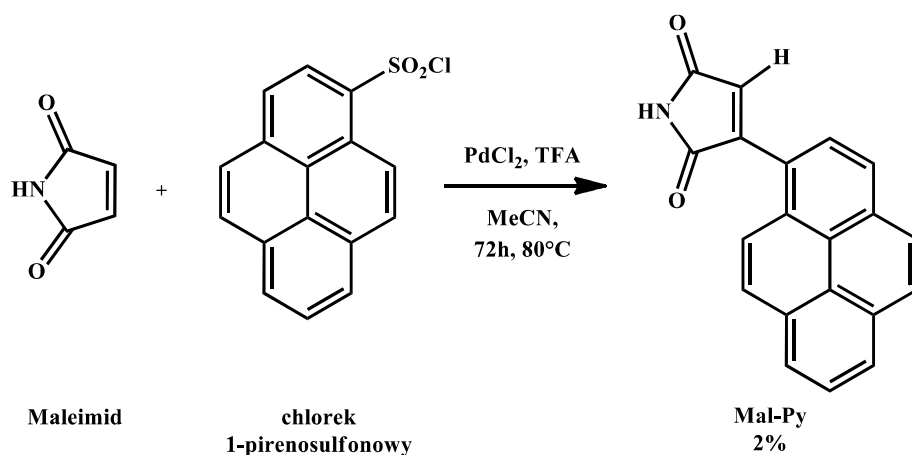
W pierwszej kolejności postanowiłam zmodyfikować niepodstawiony maleimid w pozycji alkenylowej na drodze reakcji katalizowanej związkami palladu.

Pracę rozpoczęłam od syntezy chlorku pirenosulfonowego (Schemat 45). W celu jego otrzymania kwas pirenosulfonowy rozpuściłam w DMF i mieszałam w temperaturze 0°C przez 30 min., a następnie porcjami dodałam chlorek tionylu obserwując wypadanie brunatno-żółtego osadu. Po 2 h mieszaninę poreakcyjną wylałam na lód i przesączyłam, a produkt oczyściłam na drodze chromatografii kolumnowej. Strukturę oraz czystość chlorku pirenosulfonowego określiłam na podstawie widma ¹H NMR.



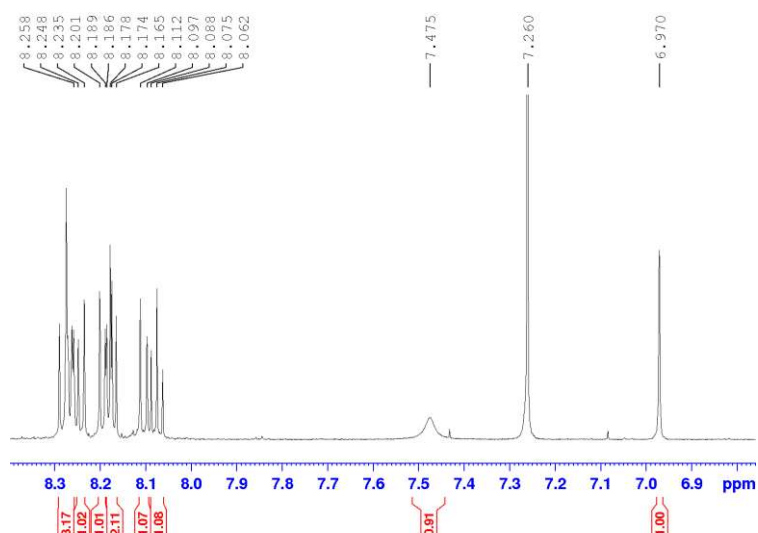
Schemat 45. Synteza chlorku pireno-1-sulfonowego

Podjęłam wiele prób otrzymania **Mal-Py**, modyfikując warunki reakcji maleimidu z chlorkiem pirenosulfonowym. Produkt otrzymałam jedynie w przypadku gdy chlorek kwasu pirenosulfonowego, maleimid oraz chlorek palladu (II) rozpuściłam w acetonitrylu, i reakcję prowadziłam 1 h w 80°C. Niestety produkt otrzymałam z bardzo niską wydajnością (Schemat 46). Wynika ona prawdopodobnie z niskiej reaktywności *N*-niepodstawionego maleimidu.



Schemat 46. Synteza **Mal-Py**

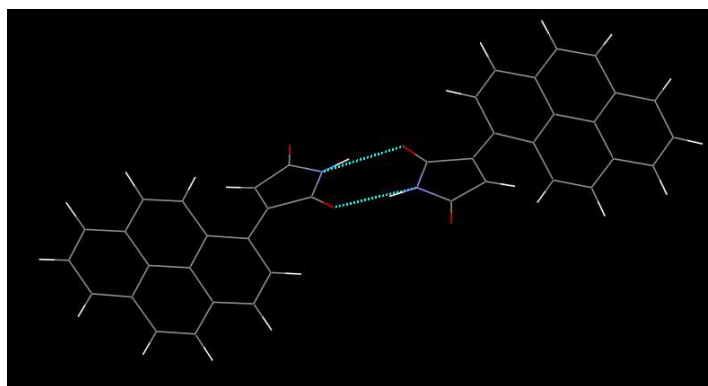
Identyfikację **Mal-Py** dokonałam na podstawie widma ¹H NMR (Rysunek 102). W widmie protonowego rezonansu magnetycznego związku (600MHz, aceton-d₆) obecny jest singlet przy 6,97 ppm od jednego protonu przyłączonego do atomu węgla wiązania podwójnego obecnego w pierścieniu maleimidowym. Następny sygnał - poszerzony singlet przy 7,48 ppm odpowiada jednemu protonowi grupy -NH obecnej w pierścieniu maleimidowym. Kolejne sygnały pochodzą od protonów pierścienia pirenowego - tryplet przy 8,09 ppm o stałej sprzężenia $J = 7,6$ Hz odpowiada jednemu protonowi, dublet przy 8,11 ppm o stałej sprzężenia $J = 8,8$ Hz odpowiada jednemu protonowi, multiplet w zakresie 8,16-8,18 ppm od dwóch protonów, dublet przy 8,20 ppm o stałej sprzężenia $J = 7,3$ Hz pochodzi od jednego protonu, kolejny dublet przy 8,25 ppm o stałej sprzężenia $J = 8,0$ Hz również odpowiada jednemu protonowi, a ostatni sygnał - multiplet w zakresie 9,29-8,25 ppm pochodzi od trzech protonów układu pirenowego.



Rysunek 102. Widmo ^1H NMR **Mal-Py** w acetonie- d_6 (600 MHz)

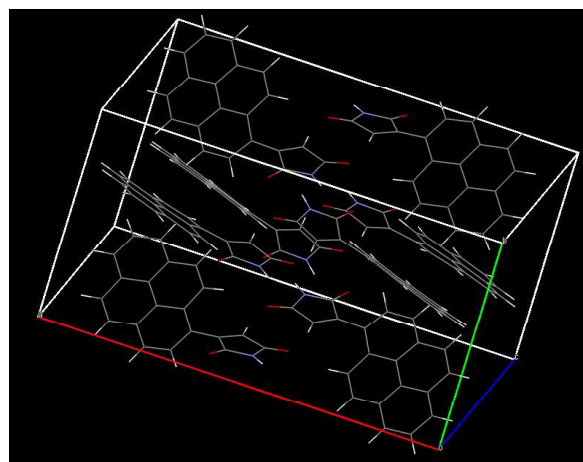
Niska wydajność syntezy oraz śladowe ilości zsyntezowanego produktu uniemożliwiły mi zarejestrowanie dobrej jakości widma ^{13}C NMR. W celu dodatkowego potwierdzenia struktury związku **Mal-Py** została wykonana analiza HRMS (ESI) m/z : m/z : obliczona dla wzoru $\text{C}_{20}\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{H}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 298,0868 wyznaczona eksperymentalnie 298,0874. Zarejestrowałam również widmo w podczerwieni, w którym obecne są charakterystyczne pasma drgań walencyjnych grupy $-\text{NH}$ przy 3447 cm^{-1} oraz grup karbonylowych przy 1768 oraz 1719 cm^{-1} .

Ponadto, dla związku **Mal-Py** uzyskałam monokryształy, których analiza rentgenostrukturalna pozwoliła jednoznacznie potwierdzić strukturę uzyskanego produktu. W pojedynczej komórce elementarnej obecne są dwie cząsteczki **Mal-Py** (Rysunek 103). Ponadto, można zaobserwować tworzenie się wiązań wodorowych między atomami wodoru grupy $-\text{NH}$ obecnej w układzie maleimidowym jednej cząsteczki, a atomami tlenu grupy karbonylowej podstawnika cysteinowego drugiej cząsteczki.



Rysunek 103. Struktura cząsteczkowa **Mal-Py**

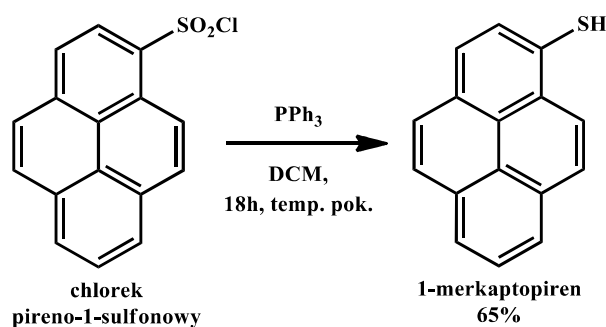
Na podstawie wyników analizy rentgenostrukturalnej możemy stwierdzić iż w komórce elementarnej związku **Mal-Py** (Rysunek 104) znajduje się 8 cząsteczek. Ponadto, trójwymiarowa struktura dostarczyła nam informacji dotyczących sposobu ułożenia pierścieni pirenowych w sieci krystalicznej. Na podstawie upakowania w komórce elementarnej można stwierdzić, że pierścienie pirenowe są ułożone do siebie równoległe, mogą zatem oddziaływać ze sobą na zasadzie π -stackingu. Zjawisko to prowadzi do wygaszania fluorescencji.



Rysunek 104. Upakowanie w komórce elementarnej **Mal-Py**

Ze względu na niską wydajność wyżej opisanej reakcji podjęłam próbę zmodyfikowania warunków reakcji oraz zmianę stosowanych reagentów. Ze względu na powodzenie reakcji między bromopochodnymi maleimidu, a tiolami, postanowiłam użyć do reakcji bromopochodnych maleimidu oraz merkaptopirenu jako odczynnika nukleofilowego.

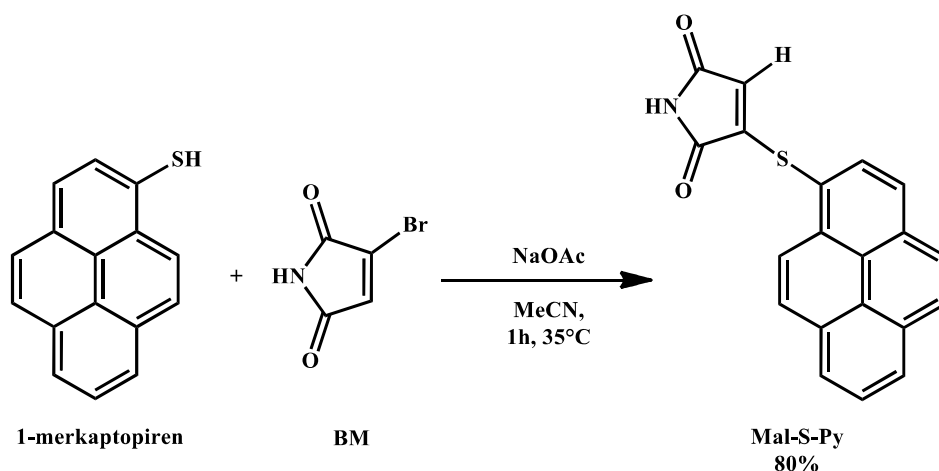
Pracę rozpocząłam od syntezy 1-merkaptopirenu (Schemat 47). Do reakcji użyłam wcześniej zsyntezowany chlorek pirenosulfonowy, który rozpuściłam w chlorku metylenu, a następnie dodałam porcjami trifenylofosfinę. Reakcję prowadziłam w temperaturze pokojowej przez 18 h. W wyniku reakcji otrzymałam 1-merkaptopiren z 65% wydajnością.



Schemat 47. Synteza 1-merkaptopirenu

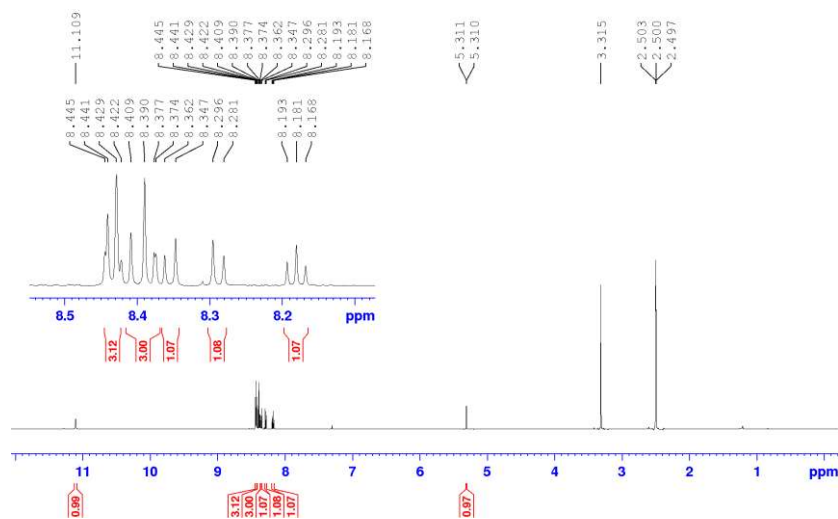
Strukturę oraz czystość otrzymanego produktu określiłam na podstawie analizy widma ^1H NMR porównując multipletowość oraz przesunięcia sygnałów z danymi literaturowymi.

W pierwszej kolejności do reakcji z merkaptopirenem użyłam monobromomaleimid (Schemat 48). 1-Merkaptopiren oraz octan sodu rozpuściłam w acetonitrylu, tak przygotowany roztwór mieszałam w 35°C , a następnie dodałam porcjami rozpuszczony w acetonitrylu bromomaleimid. Po 30 min. zaobserwowałam zabarwienie mieszaniny reakcyjnej na żółto, reakcję prowadziłam 60 min. w 35°C . W wyniku reakcji otrzymałam **Mal-S-Py** z 30% wydajnością.



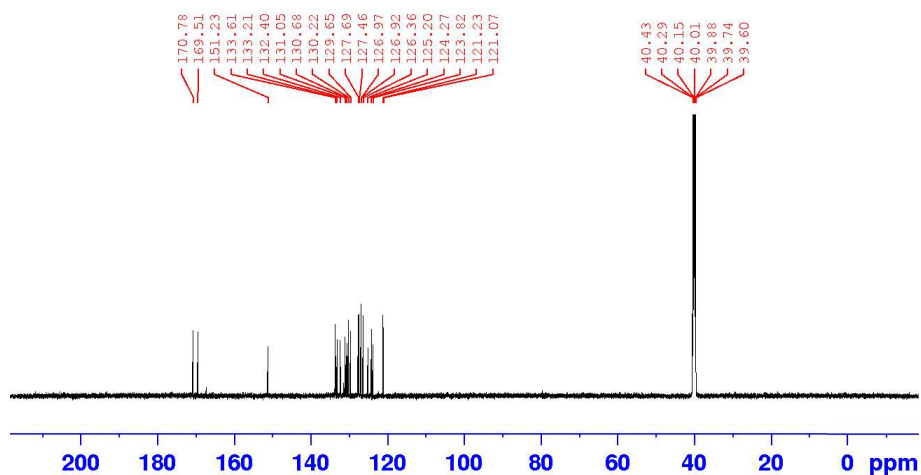
Schemat 48. Synteza **Mal-S-Py**

W widmie ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) związku **Mal-S-Py** (Rysunek 105) jest obecny przy 5,31 ppm dublet o stałej sprzężenia $J = 1,2$ Hz pochodzący od jednego protonu przyłączonego do atomu węgla wiązania podwójnego pierścienia maleimidowego. Kolejne sygnały pochodzą od protonów układu pirenowego - tryplet przy 8,19 ppm o stałej sprzężenia $J = 7,6$ Hz odpowiadający jednemu protonowi, dublet przy 8,30 ppm o stałej sprzężenia $J = 8,9$ Hz odpowiadający jednemu protonowi, kolejny dublet jednego protonu przy 8,36 ppm o stałej sprzężenia $J = 8,9$ Hz, następnie dwa multiplet w zakresie 8,37-8,41 oraz 8,42-8,44 ppm odpowiadające trzem protonom każdy. Ostatni sygnał - poszerzony singlet przy 11,11 ppm odpowiada jednemu protonowi grupy -NH obecnej w pierścieniu maleimidowym.



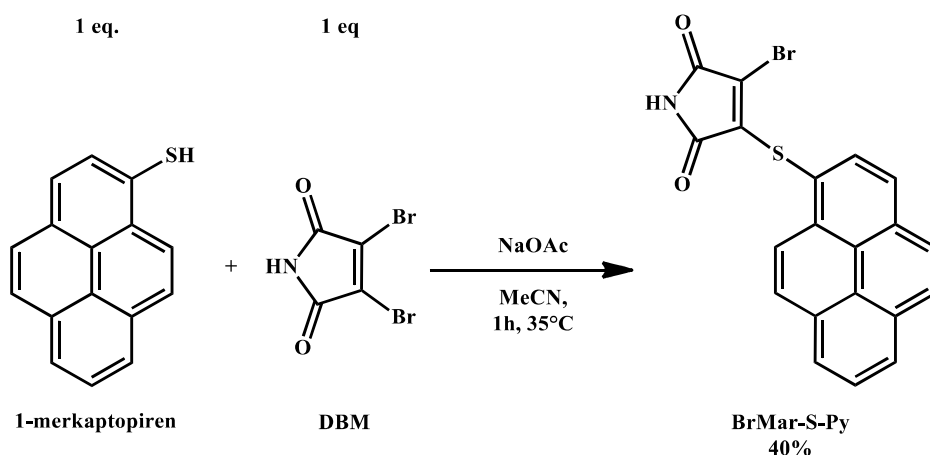
Rysunek 105. Widmo ^1H NMR **Mal-S-Py** w DMSO-d_6 (600 MHz)

W widmie ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO-d_6) **Mal-S-Py** (Rysunek 106) sygnały obecne przy 170,8 i 169,5 ppm odpowiadają dwóm karbonylowym atomom węgla, sygnał przy δ : 151,2 ppm pochodzi od atomu węgla układu pirenowego związanego z atomem siarki, kolejne sygnały δ : 133,6, 132,6, 132,4, 131,1, 130,7, 130,2, 129,6, 127,7, 127,5, 127,0, 126,9, 126,4, 125,2, 123,4, 123,8 ppm pochodzą od pozostałych atomów węgla układu pirenowego. Dodatkowo strukturę omawianej pochodnej potwierdziło widmo masowe wysokiej rozdzielczości - m/z : obliczona dla wzoru $\text{C}_{20}\text{H}_{10}\text{NO}_2\text{S} [\text{M-H}]^+$ wynosiła 328,0432, a wyznaczona 328,0434, natomiast wartość dla obliczona dla wzoru $\text{C}_{20}\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{SH} [\text{M+H}]^+$ wynosiła 330,0589, a wyznaczona eksperymentalnie 330,0594.



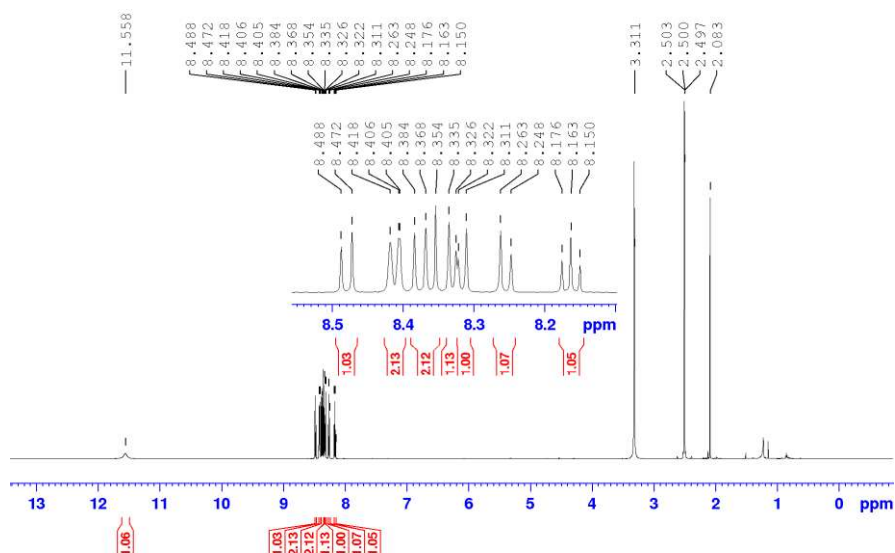
Rysunek 106. Widmo ^{13}C NMR **Mal-S-Py** w DMSO-d_6 (150 MHz)

Do kolejnej reakcji użyłam dibromomaleimid i 1-merkaptopiren (Schemat 49). Podobnie jak poprzednio 1-merkaptopiren oraz octan sodu rozpuściłam w acetonitrylu, roztwór ogrzałam do 35°C i dodałam porcjami rozpuszczony w acetonitrylu dibromomaleimid. Wraz z postępem reakcji zaobserwowałam zabarwienie mieszaniny reakcyjnej na pomarańczowo-czerwono. Reakcję prowadziłam 15 min. w 35°C. W wyniku reakcji otrzymałam **BrMal-S-Py** z 40% wydajnością.



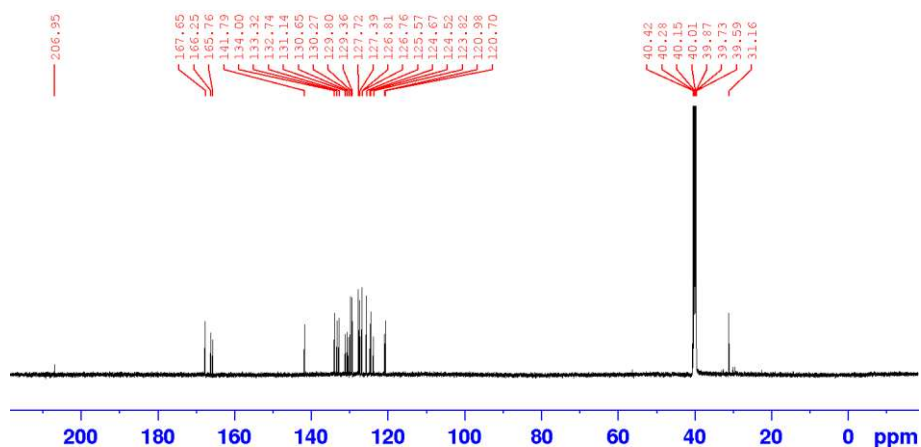
Schemat 49. Synteza **BrMal-S-Py**

Identyfikację produktu reakcji przedstawionej na Schemacie 49 dokonałam na podstawie analiz spektroskopowych. W widmie ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) związku **BrMal-S-Py** (Rysunek 107) obecne są protony układu pirenowego - tryplet przy 8,17 ppm o stałej sprzężenia $J = 7,6\text{Hz}$ odpowiadający jednemu protonowi, dublet przy 8,26 ppm o stałej sprzężenia $J = 8,9\text{ Hz}$ odpowiadający jednemu protonowi, kolejne sygnały to dublet przy 8,32 ppm o stałej sprzężenia $J = 6,8\text{ Hz}$ oraz dublet przy 8,33 ppm o stałej sprzężenia $J = 5,9\text{ Hz}$ pochodzące od jednego protonu każdy. Multiplet w zakresie 8,37-8,41 odpowiada dwóm protonom aromatycznym, dublet przy 8,49 ppm o stałej sprzężenia $J = 8,0\text{ Hz}$ pochodzi od dwóch protonów, a dublet przy 8,49 ppm o stałej sprzężenia $J = 9,2\text{ Hz}$ odpowiada jednemu protonowi. Najdalej przesunięty sygnał - poszerzony singlet przy 11,56 ppm odpowiada jednemu protonowi grupy -NH obecnej w pierścieniu maleimidowym.



Rysunek 107. Widmo ^1H NMR **BrMal-S-Py** w DMSO-d_6 (600 MHz)

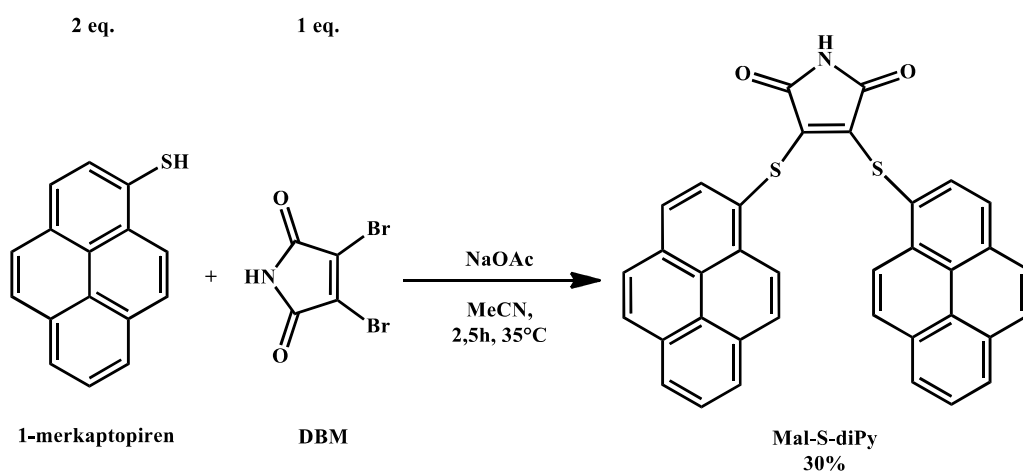
W widmie ^{13}C NMR (150MHz, DMSO-d_6) **BrMal-S-Py** (Rysunek 108) sygnał przy 167,7 ppm odpowiada atomowi węgla tworzącego wiązanie z atomem bromu, a sygnały przy 166,2, 165,8 ppm odpowiadają karbonylowym atomom węgla. Sygnał przy 141,8 ppm pochodzi od atomu węgla związanego z atomem siarki, natomiast sygnały δ 134,0, 133,3, 132,7, 131,1, 130,7, 130,3, 129,8, 129,4, 127,7, 127,4, 126,8, 125,6, 124,7, 123,8, 121,0, 120,7 ppm pochodzą od atomów węgla układu pirenowego. (sygnały przy 206,9 oraz 31,1 ppm pochodzą od rozpuszczalnika - acetonu). Dodatkowo strukturę omawianego związku potwierdziło widmo masowe wysokiej rozdzielczości - m/z : obliczona dla wzoru $\text{C}_{20}\text{H}_9\text{NO}_2\text{SBr}$ $[\text{M-H}]^+$ wynosi 405,9537, a wyznaczona 405,9539. Wartość obliczona dla $\text{C}_{20}\text{H}_{10}\text{NO}_2\text{SBrH}$ $[\text{M+H}]^+$ wynosi 407,9694, natomiast wyznaczona eksperymentalnie 407,9702.



Rysunek 108. Widmo ^{13}C NMR **BrMal-S-Py** w DMSO-d_6 (150 MHz)

W omawianej reakcji zaobserwowałam tworzenie się śladowych ilości produktu dipodstawienia układu maleimidowego. Postanowiłam sprawdzić czy użycie do reakcji dwóch równoważników 1-merkaptopirenu spowoduje wzrost wydajności syntezy **BrMal-S-Py**, czy też głównym produktem reakcji będzie produkt dipodstawienia.

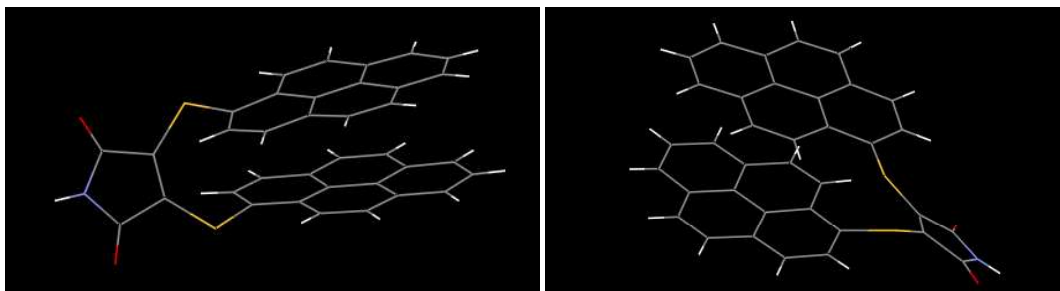
W tym celu do reakcji użyłam 2 równoważniki tiolu oraz 1 równoważnik dibromomaleimidu (Schemat 50). Podobnie jak poprzednio 1-merkaptopiren oraz octan sodu rozpuściłam w acetonitrylu, następnie roztwór ogrzałam do 35°C, i dodałam porcjami dibromomaleimid rozpuszczony w acetonitrylu. Mieszanina reakcyjna po 30 min. zabarwiła się na krwistoczerwono, reakcję prowadziłam 2,5 h w 35°C. Okazało się, że głównym produktem reakcji jest **Mal-S-diPy**.



Schemat 50. Synteza **Mal-S-diPy**

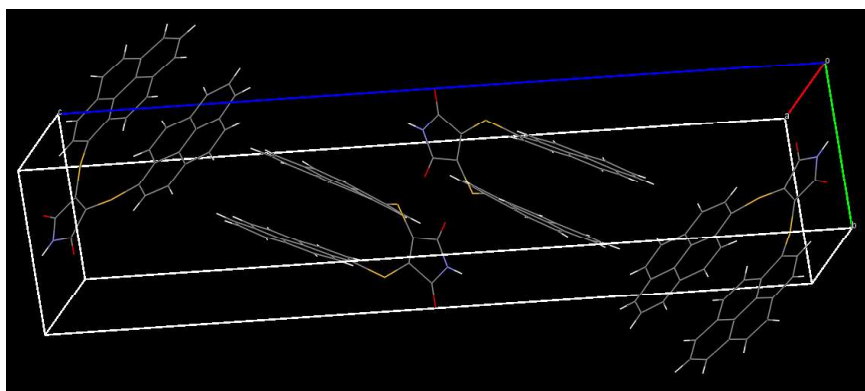
W widmie $^1\text{H NMR}$ (600MHz, DMSO-d_6) związku **Mal-S-diPy** (Rysunek 109) obecne są protony układu pirenowego - singlet przy 7,54 ppm odpowiadający czterem protonom, tryplet przy 7,80 ppm o stałej sprzężenia $J = 7,5$ Hz odpowiadający dwóm protonom, kolejne sygnały to dublet dubletów dwóch protonów przy 7,82 ppm o stałych sprzężenia $J_1 = 7,6$ Hz $J_2 = 1,3$ Hz, dublet przy 7,94 ppm o stałej sprzężenia $J = 1,5$ Hz od czterech protonów oraz dublet dwóch protonów przy 7,96 ppm o stałej sprzężenia $J = 8,0$ Hz. Dublet dubletów przy 8,00 ppm o stałych sprzężenia $J_1 = 7,3$ Hz $J_2 = 1,2$ Hz odpowiada dwóm protonom aromatycznym, a dublet przy 8,06 ppm o stałej sprzężenia $J = 8,0$ Hz pochodzi od dwóch protonów. Sygnał o największym przesunięciu chemicznym - poszerzony singlet przy 11,50 ppm odpowiada jednemu protonowi grupy $-\text{NH}$ obecnej w pierścieniu maleimidowym.

Dla dipodstawionej pochodnej maleimidu **Mal-S-diPy** uzyskałam monokryształy, których analiza rentgenostrukturalna pozwoliła jednoznacznie potwierdzić strukturę uzyskanego produktu. W pojedynczej komórce elementarnej obecna jest jedna cząsteczka **Mal-S-diPy** (Rysunek 111). Ze względu na geometrię wiązań między atomami siarki i atomami węgla tworzącymi wiązanie podwójne w układzie maleimidowym, pierścienie pirenowe ułożone są do siebie równoległe, ale nie nakładają się na siebie.



Rysunek 111. Struktura cząsteczkowa **Mal-S-diPy**

W komórce elementarnej związku **Mal-S-diPy** (Rysunek 112) znajdują się 4 cząsteczki. Na podstawie trójwymiarowej struktury widzimy, że cząsteczki nie oddziałują ze sobą w sieci krystalicznej i nie tworzą się między nimi wiązania wodorowe.



Rysunek 112. Upakowanie w komórce elementarnej **Mal-S-diPy**

Zaprojektowane przeze mnie pochodne maleimidu z pirenem miały zostać wykorzystane jako znaczniki fluorescencyjne. Jedynie **Mal-Py** wykazywał właściwości fluorescencyjne. Niestety, ze względu na niską wydajność reakcji nie udało mi się przeprowadzić badań fotofizycznych dla tej pochodnej. Pochodne **Mal-S-Py**, **BrMal-S-Py** i **Mal-S-diPy** nie wykazują właściwości emisyjnych, co jest związane z obecnością w ich cząsteczkach atomu siarki lub atomu bromu, które wygaszają fluorescencję.

PODSUMOWANIE

W ramach rozprawy doktorskiej:

- ✓ Przeprowadziłam badania dotyczące reakcji pochodnych bromo- i dibromomaleimidu z biologicznie aktywnymi związkami modelowymi (**Cys**, **Gluc**) uzyskując szereg nowych tiomaleimidów: **TM-Cys**, **DTM-Cys**, **DTM-Gluc**, **Fp-TM-Cys**, **Fp-DTM-Cys**, **Fp-DTM-Gluc**, na drodze substytucji atomu bromu przez grupy tiolowe biocząsteczek. W jednym przypadku na drodze substytucji i addycji grupy tiolowej do wiązania podwójnego maleimidu otrzymałam ppochną sukcyimidową **Fp-DTS-Cys**. Do uzyskania tych związków wykorzystyłam pochodne bromo- oraz dibromomaleimidu oraz ich metalokarbonylowe analogi. W przypadków *N*-niepodstawionych pochodnych ditiomaleimidu (**DTM-Cys**, **DTM-Gluc**) zaobserwowałam właściwości fluorescencyjne. Natomiast otrzymane pochodne metalokarbonylowe **Fp-TM-Cys**, **Fp-DTM-Cys** i **Fp-DTM-Gluc** są łatwe do detekcji w spektroskopii IR, natomiast fluorescencji nie wykazują.
- ✓ W ramach przeprowadzonych badań wykazałam, że pochodne ditiomaleimidu zawierające fragment metalokarbonylowy (**Fp-DTM-Cys** i **Fp-DTM-Gluc**) pod wpływem naświetlania światłem widzialnym przekształcają się we fluorescencyjne analogi **DTM-Cys**, **DTM-Gluc**. Związki **Fp-DTM-Cys** i **Fp-DTM-Gluc** tracą w czasie naświetlania fragment metalokarbonylowy, który ulega degradacji z wydzieleniem CO, w związku z tym są przykładem tzw. „photo-CORMs”.
- ✓ Przeprowadziłam badania aktywności biologicznej zsyntezowanych pochodnych (**DBM**, **Fp-DBM**, **Fp-BM**, **DTM-Cys**, **DTM-Gluc**, **Fp-DTM-Cys**, **Fp-DTM-Gluc**), z których wynika, że pochodne metalokarbonylowe, wykazują aktywność cytotoksyczną w stosunku do komórek raka piersi MDA-MB-231, podczas gdy ich analogi bez fragmentu metalokarbonylowego nie były toksyczne. Badania z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej, sugerują, że związki zawierające fragment metalokarbonylowy łatwiej przedostają się do wnętrza komórki niż ich organiczne analogi.
- ✓ Zastosowałam bromochodne maleimidu (**DBM**, **Fp-BM**, **Fp-DBM**) do znakowania białek. Przeprowadziłam szereg reakcji w/w pochodnych z insuliną bydlęcą (**Ins**) oraz lizozymem (**Liz**), a na drodze modyfikacji polegającej na wbudowaniu

fragmentu maleimidu bądź sukcyimidu w mostek dwusiarczkowy (rebridging), otrzymałam szereg biokoniugatów: **DTM-Ins**, **Fp-TM-Ins**, **Fp-DTM-Ins**, **DTM-Liz** oraz **Fp-DTM-Liz**. Podobnie jak w przypadku wcześniej otrzymanych pochodnych (**DTM-Cys**, **DTM-Gluc**) otrzymane biokoniugaty zawierające fragment ditiomaleimidu (**DTM-Ins**, **DTM-Liz**) wykazywały właściwości fluorescencyjne. Natomiast, wbudowanie maleimidowej pochodnej metalokarbonylowej w mostek dwusiarczkowy biomolekuł umożliwiło łatwą detekcję biokoniugatów **Fp-TM-Ins**, **Fp-DTM-Ins** oraz **Fp-DTM-Liz** na drodze spektroskopii w podczerwieni dzięki obecności liganów CO.

- ✓ Przeprowadziłam naświetlanie otrzymanych koniugatów **Fp-DTM-Ins** oraz **Fp-DTM-Liz** światłem widzialnym i przeprowadziłam analizę spektroskopową produktów naświetlania. Na drodze tych eksperymentów wykazałam, że naświetlanie **Fp-DTM-Ins** oraz **Fp-DTM-Liz** prowadzi do utraty fragmentu metalokarbonylowego i tworzenia **DTM-Ins** i **DTM-Liz**, które wykazują właściwości fluorescencyjne. Należy podkreślić, że otrzymane związki metalokarbonylowe zawierające fragment ditiomaleimidu są pierwszym przykładem znaczników, które pod wpływem naświetlania przekształcają się ze znacznika wykrywanego przy pomocy spektroskopii IR w znacznik fluorescencyjny.
- ✓ Zsyntezowałam trzy nowe znaczniki fluorescencyjne oparte na układzie piren-linker-cyklooktyn (**Py-ester-BCN**, **Py-eter-BCN**, **Py-N-BCN**). Czwarty związek o analogicznej strukturze **Py-S-BCN** nie wykazywał właściwości fluorescencyjnych prawdopodobnie ze względu na obecność atomu siarki. Dla związków wykazujących fluorescencję przeprowadziłam obszerne badania fotofizyczne w roztworach oraz ciele stałym (zarejestrowanie widm elektronowych absorpcji emisji, wydajność kwantowa fluorescencji, czasy życia fluorescencji). Z przeprowadzonych badań wynika, że łącznik pomiędzy pierenem, a cyklooktynem ma ogromny wpływ na właściwości fluorescencyjne badanych związków.
- ✓ Najciekawsze właściwości luminescencyjne wykazuje **Py-ester-BCN**, i w związku z tym został wybrany jako związek modelowy do dalszych badań. Reaktywność pierścienia cyklooktynowego z tetrazyną sprawdziłam w reakcji iEDDA **Py-ester-BCN** z **diN-Boc-Cys-tetrazyna**, w wyniku której otrzymałam oczekiwany biokoniugat (**Py-ester-BCN-diN-Boc-Cys-tetrazyny**). Przeprowadziłam także

bezpośrednią reakcję **Py-ester-BCN** z *N-Boc-Cys*, która dała produkt monoaddycji do pierścienia cyklooktynowego. Natomiast w wyniku reakcji SPAAC, **Py-ester-BCN** z *AZT* otrzymałam biokoniugat **Py-ester-BCN+AZT**. Wszystkie otrzymane biokoniugaty wykazują silne właściwości fluorescencyjne, co potwierdziłam wykonując pomiary fotofizyczne. Uzyskane wyniki wskazują, że otrzymane przeze mnie znaczniki mogą znaleźć zastosowanie praktyczne.

- ✓ Przeprowadziłam eksperyment, którego celem było sprawdzenie czy modelowy znacznik **Py-ester-BCN** można użyć do znakowania większych układów biologicznych oraz czy możliwa jest kontrola przebiegu reakcji metodą spektroskopii emisyjnej. Do eksperymentu użyłam białka HSA, które zawiera jedną grupę -SH. Zarejestrowane widma elektronowe emisji mieszaniny HSA + **Py-ester-BCN** w czasie 0 - 24 h przedstawiają zmiany fluorescencji (przesunięcie maksimum emisji w kierunku krótszych długości fal), które mogą być efektem wiązania się znacznika z wolną grupą -SH białka HSA.
- ✓ Związki **Py-ester-BCN**, **Py-eter-BCN**, **Py-N-BCN**, **Py-S-BCN** zostały poddane badaniom biologicznym, które wykazały, że wszystkie w/w pochodne nie wykazują cytotoksyczności wobec komórek nowotworowych MDA-MB-231 i prawidłowych BJ, co jest obiecujące w świetle potencjalnych zastosowań farmakologicznych. Badania z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej pokazały, że znaczniki zabarwiają błony komórkowe w cytoplazmie, szczególnie w okolicy jądra komórkowego, czyli w obszarze bogatym w retikulum endoplazmatyczne.
- ✓ Ostatnią grupą związków otrzymanych w ramach mojej pracy były pochodne maleimidu zawierające układ pirenowy. Pierwszą pochodną **Mal-S-Py**, otrzymałam w wyniku reakcji maleimidu z chlorkiem pireno-1-sulfonowym katalizowanej palladem. Związek ten wykazywał fluorescencję natomiast wydajność reakcji była niewielka, dlatego podjęłam próby zmiany warunków modyfikacji układu maleimidowego. W wyniku reakcji 1-merkaptopirenu z pochodnymi bromo- oraz diibromomaleimidu, otrzymałam trzy nowe związki (**BrMal-S-Py**, **Mal-S-Py**, **Mal-S-diPy**). Niestety, obecność w cząsteczkach atomu bromu i/lub atomów siarki sprawia, że otrzymane pochodne nie wykazują właściwości fluorescencyjnych. Z tego względu związki te nie były przeze mnie dalej badane pod kątem zastosowań biologicznych.

CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

6. Część eksperymentalna

6.1. Stosowane metody analityczne

a) Metody chromatograficzne:

- chromatografia cienkowarstwowa TLC - wykorzystano dostępne handlowo płytki pokryte żelem krzemionkowym 60, 0,25 mm, ze wskaźnikiem fluorescencyjnym F254, jako eluenty stosowano dostępne handlowo rozpuszczalniki, bądź ich mieszaniny w odpowiednim gradiencie,
- chromatografia kolumnowa - zsyntezowane produkty były oczyszczane na drodze chromatografii kolumnowej stosując szklane kolumny wypełnione żelem krzemionkowym; jako eluenty wykorzystano dostępne handlowo rozpuszczalniki organiczne oraz ich mieszaniny,
- chromatografia kolumnowa flash - zsyntezowane produkty były oczyszczane na drodze chromatografii kolumnowej stosując szklane kolumny wypełnione żelem krzemionkowym, wykorzystując ciśnienie (powietrza lub gazu obojętnego) do szybkiego przepływu fazy ruchomej przez kolumnę wypełnioną żelem.

b) Analiza instrumentalna:

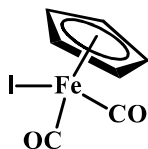
- magnetyczny rezonans jądrowy NMR wykonano dla wszystkich otrzymanych produktów dla 0,5-1% roztworów w handlowo dostępnych rozpuszczalnikach deuterowanych (CDCl_3 , DMSO-d_6 , CD_2Cl_2). Analizy zostały wykonane na aparacie Bruker Avance III 600MHz lub Bruker Neo Prodigy 600MHz, które dostępne są na Wydziale Chemii UŁ. Widma wykonywane podczas stażu Erasmus+ były wykonywane na aparturze dostępnej w jednostce badawczej Institut Parisien de Chimie Moléculaire, Sorbonne Université – aparat Bruker Avance III 400 MHz oraz Bruker Avance III 300MHz,
- widma absorpcyjne oraz emisyjne rejestrowane były przy użyciu spektrofotometru Lambda 45 UV/VIS marki PerkinElmer oraz spektrofluorymetru LS55 PerkinElmer dostępnych na Wydziale Chemii UŁ. Do badań fotofizycznych realizowanych podczas staży naukowych w Institut Parisien de Chimie Moléculaire został użyty spektrofotometr Cary 50 firmy Varian oraz spektrofluorymetr P-6200 zaopatrzony w system chłodzący ETC-272T marki Jasco. Badania fotofizyczne wykonane w ENS Paris-Saclay zostały wykonane przy użyciu spektrofotometru Cary 5000 Agilent Technologies, spektrofluorymetru Jobin–Yvon Fluorolog FL3-221

Horiba, do wyznaczenia wydajności kwantowych w ciele stałym została użyta sfera całkująca F3018 marki Horiba. Czasy życia fluorescencji w ciele stałym i w roztworach zostały zarejestrowane przy użyciu specjalistycznego zestawu aparatury składającej się z lasera Titanium Sapphire (Millennia, Spectra-Physics), lasera YAG (Millennia, Spectra-Physics), detektora Hamamatsu MCPR3809U photomultiplier,

- widma w podczerwieni (FT-IR) rejestrowałam przy użyciu spektrometru Fourier Transform InfraRed (FTIR) NEXUS (Thermo Nicolet), widma ATR-FT-IR rejestrowałam przy użyciu spektrometru marki Shimadzu IRSpirit, które są dostępne na Wydziale Chemii UŁ. Widma ATR-FR-IR oraz FT-IR wykonywane podczas stażu w Institut Parisien de Chimie Moléculaire zostały zarejestrowane przy użyciu spektrofotometru Bruker Tensor 27 IR zaopatrzonego w detektor DTGS,
 - analiza rentgenostrukturalna została wykonana przy użyciu dyfraktometru SuperNova Double Source Rigaku, Cu dostępnego na Wydziale Chemii UW,
 - analiza HRMS - aparatura dostępna w CBMiM PAN w Łodzi, analiza HRMS w jednostce Institut Parisien de Chimie Moléculaire została wykonana przy użyciu aparatu ESI-LTQ Orbitrap XL Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA),
 - Mikroskopia konfokalna – analiza konfokalna została wykonywana przy użyciu mikroskopu konfokalnego LEICA TCS SP-8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) dostępnego na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska UŁ, analiza pozyskanych obrazów została wykonana przy użyciu oprogramowania Leica LAS X software.
- c) Przepisy preparatywne:
- część stosowanych substratów będących odczynnikami handlowo dostępnymi pochodziło z firm, tj. Sigma-Aldrich, Merck, TCI, Angene, rozpuszczalniki wykorzystane w syntezie były dostępne handlowo (Merck, ChemPur, POCh, Supleco).

6.2. Synteza *N*-niepodstawionych oraz metalokarbonylowych pochodnych maleimidu i sukcyimidu

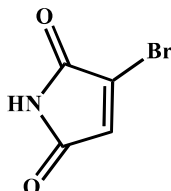
6.2.1. Synteza FpI



3,55 g dimeru (cyklopentadienylo) dikarbonylżelaza(II) oraz 4,45 g jodu rozpuściłam w chloroformie. Reakcję prowadziłam w 50°C, pod chłodnicą zwrotną, w atmosferze gazu obojętnego. Po 45 min. mieszaninę reakcyjną przemyłam 20% wodnym roztworem tiosiarczanu sodu i ekstrahowałam chloroformem. Warstwę organiczną wysuszyłam nad bezwodnym siarczanem (VI) magnezu, a nadmiar rozpuszczalnika usunęłam pod zmniejszonym ciśnieniem. Czysty produkt w postaci bordowo-fioletowych kryształów otrzymałam na drodze krystalizacji z mieszaniny chloroform : heptan (3:1)

Wydajność: 2,52 g, 83%; **¹H NMR** (CDCl₃, 600MHz): δ 5,22 (s, 5H, Cp); **IR** (KBr, cm⁻¹): 2041, 1998 (νC≡O)

6.2.2. Synteza BM



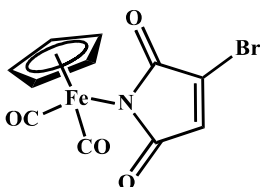
Etap I: 4 g maleimidu (1eq.) rozpuściłam w chloroformie i porcjami używając wkraplacza wkraplałam brom cząsteczkowy (1eq., 2,32 ml). Reakcję prowadziłam przez 2 h w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika, obserwując zmianę koloru mieszaniny początkowo na pomarańczową, a następnie na żółtą, po 2 h mieszaninę schłodziłam do temperatury pokojowej, a kolbę z mieszaniną poreakcyjną umieściłam w lodówce na noc w celu krystalizacji produktu. Otrzymany produkt w postaci białego osadu przesączyłam i wysuszyłam na linii próżniowej.

II etap: otrzymany w I etapie 2,3-dibromosukcymimid (7 g) rozpuściłam w 160 ml kwasu octowego i dodałam 11,3 g octanu sodu (3eq). Reakcję prowadziłam 1,5 h w 120°C, następnie 3 h w temperaturze pokojowej. Do mieszaniny poreakcyjnej dodałam wodny roztwór

wodorowęglanu sodu i ekstrahowałam octanem etylu. Powstały po zateżeniu rozpuszczalnika osad przesączałam otrzymując produkt w postaci białego ciała stałego.

Wydajność: 359 mg, 75%; **¹H NMR** (CDCl₃, 600MHz): δ 7,56 (bs, 1H, NH), 8,76 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 6,88 (s, 1H)

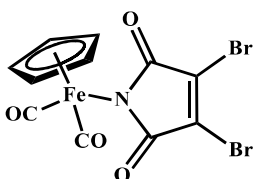
6.2.3. Synteza Fp-BM



FpI (1 eq., 1,15 g) oraz **BM** (1 eq., 668 mg) rozpuściłam w 45 ml toluenu, mieszaninę reakcyjną przemyłam strumieniem argonu i dodałam 2 ml diizopropylaminy (3,5 eq.). Kolbę umieściłam w łaźni lodowej, reakcję prowadziłam przez 1,5 h naświetlając światłem widzialnym. Powstały osad przesączałam, a przesącz zateżyłam pod zmniejszonym ciśnieniem, dodałam wodny roztwór 2% NaOH i ekstrahowałam chlorkiem metylenu, warstwę organiczną osuszyłam nad siarczanem (VI) magnezu i usunęłam rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyściłam chromatograficznie używając chlorek metylenu jako eluent otrzymując produkt w postaci żółtego ciała stałego.

Wydajność: 936 mg, 70%; **¹H NMR** (CDCl₃, 600MHz): δ 6,78 (s, 1H), 5,08 (s, 5H, Cp); **¹³C NMR** (CDCl₃, 150 MHz): δ 211,9 (C≡O), 181,0, 176,9 (C=O), 136,2, 133,6 (C=C), 84,8 (C_{Cp}); **IR** (KBr, cm⁻¹): 2056, 1993 (νC≡O), 1656 (ν C=O)

6.2.4. Synteza Fp-DBM

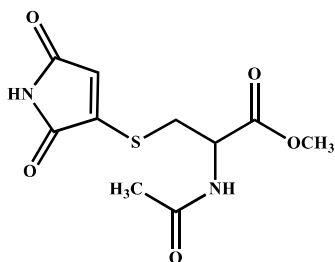


FpI (1 eq., 607,6 mg) oraz **DBM** (1 eq., 509,7 mg) rozpuściłam w 45 ml toluenu, mieszaninę reakcyjną przemyłam strumieniem argonu i dodałam 1 ml diizopropylaminy (3,5 eq.). Kolbę umieściłam w łaźni lodowej, reakcję prowadziłam przez 1,5 h naświetlając światłem widzialnym. Powstały osad przesączałam, a przesącz zateżyłam pod zmniejszonym ciśnieniem, dodałam wodny roztwór 2% NaOH i ekstrahowałam chlorkiem metylenu, warstwę organiczną osuszyłam nad siarczanem (VI) magnezu i usunęłam rozpuszczalnik pod zmniejszonym

ciśnieniem. Surowy produkt oczyściłam chromatograficznie używając chlorek metylenu jako eluent otrzymując produkt w postaci żółtego ciała stałego.

Wydajność: 646 mg, 75%; **¹H NMR** (CDCl₃, 600MHz): δ 5,08 (s, 5H, Cp); **¹³C NMR** (CDCl₃, 150 MHz) δ 211,6 (C=O), 175,2 (C=O), 131,9 (C=C), 84,9 (C_{Cp}); **IR** (KBr, cm⁻¹): 2042, 1996 (νC≡O), 1666 (ν C=O)

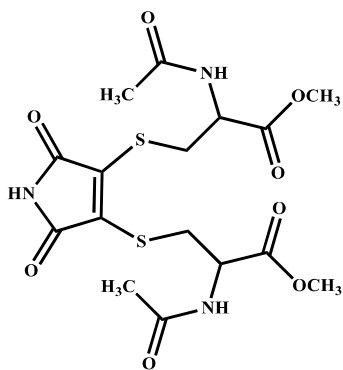
6.2.5. Synteza TM-Cys



Ester metylowy N-acetylo-L-cysteiny **Cys** (1 eq., 50 mg) oraz octan sodu (1 eq., 23,1 mg) rozpuściłam w 3 ml metanolu. Następnie przygotowałam roztwór **BM** (1,1 eq., 54,6 mg) w 3 ml metanolu i dodałam porcjami do mieszaniny reakcyjnej. Reakcję prowadziłam 30 min. w temperaturze pokojowej, następnie usunęłam rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, a surowy product oczyściłam chromatograficznie (eluent: octan etylu) otrzymując produkt w postaci białego ciała stałego.

Wydajność: 70 mg, 93%; **¹H NMR** (CD₃OD, 600 MHz): δ 6,34 (s, 1H, C=CH), 4,77 (dd, 1H, $J_1 = 9,0$ Hz, $J_2 = 6,0$ Hz, CH-NH), 3,77 (s, 3H, OCH₃), 3,51 (dd, 1H, $J_1 = 6,0$ Hz, $J_2 = 15$ Hz, S-CH₂), 3,32 (m, 1H, S-CH₂), 1,99 (s, 3H, CH₃); **¹³C NMR** (CD₃OD, 150 MHz): δ 172,1, 170,7, 170,2 169,0 (C=O), 150,3 (C=C), 119,4 (C=C-S), 51,8 (OCH₃), 50,9 (HC-NH), 32,2 (H₂C-S), 20,9 (CH₃); **IR** (ATR - ciało stałe, cm⁻¹): 3312 (ν N-H), 1754, 1710 (νC=O), 1687, 1655 (νC=C); **HRMS** (ES⁺) m/z: obliczona dla C₁₀H₁₂N₂O₅SH [M+H]⁺ 273,0540, wyznaczona 273,0540

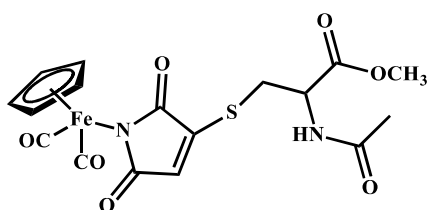
6.2.6. Synteza DTM-Cys



Cys (2,2 eq., 195 mg) oraz octan sodu (2,2 eq., 90,1 mg) rozpuściłam w 5 ml metanolu. Przygotowałam roztwór **DBM** (1eq., 127 mg) w 5 ml metanolu i dodałam porcjami do mieszaniny reakcyjnej. Reakcję prowadziłam 20 min. w temperaturze pokojowej, następnie usunęłam rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, Produkt oczyściłam chromatograficznie (eluent: mieszanina octan etylu:metanol, 95:5) otrzymując produkt w postaci zielono-żółtych kryształów.

Wydajność: 190 mg, 85%; **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ 8,46 (d, 2H, *J* = 7,8 Hz, 2xNH), 4,50 (td, 2H, *J*₁ = 8,4 Hz, *J*₂ = 5,4 Hz, 2xCH-NH), 3,72 (dd, 1H, *J*₁ = 13,5 Hz, *J*₂ = 5,1 Hz, S-CH₂), 3,63 (s, 6H, 2xOCH₃), 3,41 (dd, 1H, *J*₁ = 13,5 Hz, *J*₂ = 8,7 Hz, S-CH₂), 1,84 (s, 6H, 2xCH₃); **¹³C NMR** (DMSO-*d*₆, 150 MHz): δ 171,0, 169,9, 167,6 (C=O), 136,5 (C-S), 52,8 (OCH₃), 52,7 (HC-NH), 32,4 (H₂C-S), 22,7, 22,7 (CH₃); **IR** (ATR - ciało stałe, cm⁻¹): 3382, 3344 (νN-H), 2958, 2926 (νC-H), 1768, 1725 (νC=O), 1674, 1648 (νC=C); **HRMS (ES+)** m/z: obliczona dla C₁₆H₂₁N₃O₈S₂Na [M+H]⁺ 470,0662, wyznaczona 470,066

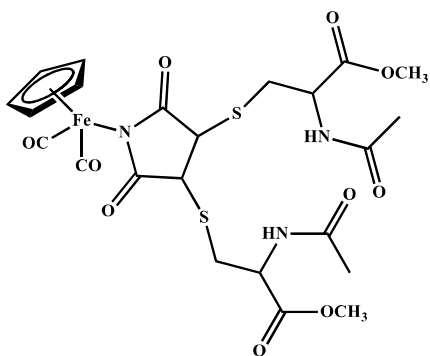
6.2.7. Synteza Fp-TM-Cys



Cys (1eq., 53,2 mg) oraz octan sodu (1 eq., 24,6 mg) rozpuściłam w 5 ml metanolu, a następnie przygotowałam roztwór **Fp-BM** (1,1 eq., 100 mg) w 10 ml metanolu i dodałam porcjami do mieszaniny reakcyjnej. Reakcję prowadziłam 24 h w temperaturze pokojowej, następnie dodałam 100 ml wody i ekstrahowałam trzema porcjami octanu etylu (3x100 ml). Warstwę organiczną wysuszyłam nad bezwodnym MgSO₄, usunęłam rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem i oczyściłam chromatograficznie (eluent: mieszanina octan etylu:metanol, 95:5) otrzymując produkt w postaci żółtego oleju.

Wydajność: 62 mg, 72%; **¹H NMR** (CD₂Cl₂, 400 MHz): δ 6,39 (d, 1H, *J* = 6,4 Hz, NH), 6,21 (s, 1H, C=CH), 5,06 (s, 5H, Cp), 4,82 (td, 1H, *J*₁ = 5,4 Hz, *J*₂ = 4,1 Hz, CH-NH), 3,74 (s, 3H, OCH₃), 3,35 (dd, 1H, *J*₁ = 10,2 Hz, *J*₂ = 3,9 Hz, S-CH₂), 3,24 (dd, 1H, *J*₁ = 10,2 Hz, *J*₂ = 4,2 Hz, S-CH₂), 1,96 (s, 3H, CH₃); **¹³C NMR** (CD₂Cl₂, 75 MHz): δ 212,3 (C≡O), 181,3 (C=O), 179,4 (C=O), 170,5 (C=O), 169,7 (C=O), 151,6 (C=C-S), 124,4 (C=C-H), 85,0 (Cp), 52,8 (HC-NH), 51,3 (OCH₃), 33,5 (H₂C-S), 22,8 (CH₃); **FTMS + ESI** m/z: obliczona dla C₁₇H₁₆N₂O₇SFeH [M+H]⁺ 449,0106, wyznaczona 449,0133

6.2.8. Synteza Fp-DTS-Cys



Procedura A: Cys (3,1 eq., 50 mg) oraz octan sodu (3,1 eq., 23,1 mg) rozpuściłam w 2 ml acetonitrylu. Po przygotowaniu roztworu **BM** (1,1 eq., 54,6 mg) w 2 ml acetonitrylu dodałam go porcjami do mieszaniny reakcyjnej. Reakcję prowadziłam przez 22 h w temperaturze pokojowej, następnie mieszaninę ogrzałam do 30°C w celu lepszego rozpuszczenia i pozostawiłam na kolejne 23 h. Reakcję prowadziłam łącznie 45 h, usunęłam rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem i oczyściłam chromatograficznie (eluent: octan etylu:metanol, 95:5). Otrzymałam dwa diastereoizomery **Fp-DTS-Cys-a** and **Fp-DTS-Cys-b** w stosunku 70:30, w postaci żółtych ciał stałych.

Wydajność: (50,3 mg **Fp-DTS-Cys-a** oraz 23,1 mg **Fp-DTS-Cys-b**), 93%

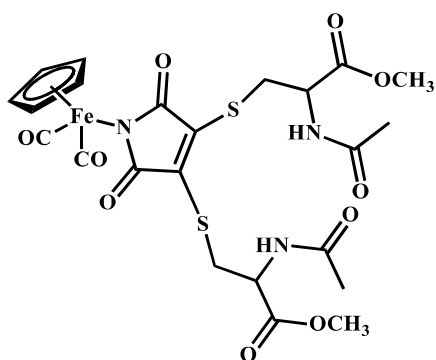
Procedura B: Cys (2,1 eq., 50 mg) oraz octan sodu (2,1 eq., 23,1 mg) rozpuściłam w 3 ml acetonitrylu, a następnie przygotowałam roztwór **Fp-TM-Cys** (0,170 mmol, 54,6 mg) w 3 ml acetonitrylu i dodałam porcjami do mieszaniny reakcyjnej. Reakcję prowadziłam przez 22 h zwiększając po 17 h temperature z pokojowej do 30°C, po usunięciu rozpuszczalnika pod zmniejszonym ciśnieniem surowy produkt oczyściłam chromatograficznie stosując mieszaninę octan etylu:metanol (95:5) do rozwinięcia. Otrzymałam dwa diastereoizomery *cis* i *trans* w postaci żółtego ciała stałego (stosunek diastereoizomerów 1:1).

Wydajność: (34 mg **Fp-DTS-Cys-a** oraz 38 mg **Fp-DTS-Cys-b**, 50:50), 77%

Fp-DTS-Cys-a (trans): $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz): δ 7,75 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, NH), 7,14 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz, NH), 5,06 (s, 5H, Cp), 4,88 (dt, 1H, $J_1 = 8,1$ Hz, $J_2 = 4,8$ Hz, CH-NH), 4,73 (td, 1H, $J_1 = 7,5$ Hz, $J_2 = 4,5$ Hz, CH-NH), 3,74 (s, 3H, OCH_3), 3,73 (s, 3H, OCH_3), 3,51 (s, 1H, S- CH_{Su}), 3,47 (s, 1H, S- CH_{Su}), 3,37 (m, 2H, S- CH_2), 3,04 (m, 2H, S- CH_2), 2,01 (s, 6H, CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 150 MHz): δ 212,3, 212,2 ($\text{C}\equiv\text{O}$), 186,8, 186,3 ($\text{C}=\text{O}$), 171,1, 170,9, 170,1, 170,1 ($\text{C}=\text{O}$), 85,2 (Cp), 52,9 (C-C), 52,5 (OCH_3), 50,4 (HC-NH), 35,8, 34,0 ($\text{H}_2\text{C-S}$), 22,7, 22,6 (CH_3); **IR** (ATR - ciało stałe, cm^{-1}): 2958, 2925 (ν C- $\text{H}_{\text{aliphatic}}$), 2046, 1997 (ν $\text{C}\equiv\text{O}$), 1741 (ν $\text{C}=\text{O}$), 1638 (ν $\text{C}=\text{C}$); **HRMS (ES⁺)** m/z: obliczona dla $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{FeN}_3\text{O}_{10}\text{S}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 648,0379, wyznaczona 648,0378

Analiza: Fp-DTS-Cys-b (cis): $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) 7,74 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, NH), 7,03 (d, $J = 6,6$ Hz, 1H, NH), 5,06 (s, 5H, Cp), 4,83 (m, 1H, CH-NH), 4,75 (m, 1H, CH-NH), 4,08 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, S-CH_{Su}), 4,00 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, S-CH_{Su}), 3,74 (s, 3H, OCH_3), 3,73 (s, 3H, OCH_3), 3,30 (m, 2H, S-CH_2), 3,04 (m, 2H, S-CH_2), 2,04 (s, 6H, CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 150 MHz): δ 212,3, ($\text{C}\equiv\text{O}$), 187,3, 186,7 ($\text{C}=\text{O}$), 171,1, 170,3, ($\text{C}=\text{O}$), 85,3 (Cp), 52,6, 52,5 (OCH_3), 52,0 (HC-NH), 50,9, 49,2 (HC-CH), 35,7, 34,3 ($\text{H}_2\text{C-S}$), 22,7, 22,6 (CH_3); **HRMS (ES+)** m/z: obliczona dla $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{FeN}_3\text{O}_{10}\text{S}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 648,0379, wyznaczona 648,0381

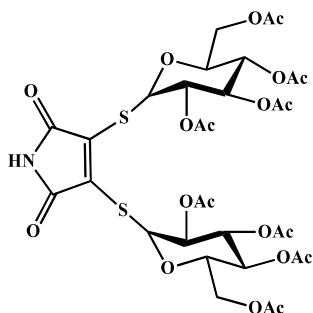
6.2.9. Synteza Fp-DTM-Cys



Cys (1,8 eq., 55,3 mg) oraz octan sodu (1,8 eq., 25,5 mg) rozpuściłam w 3 ml acetonitrylu. Przygotowałam roztwór **DBM** (1 eq., 50 mg) w 3 ml acetonitrylu i dodałam porcjami do mieszaniny reakcyjnej. Reakcję prowadziłam przez 2 h w temperaturze pokojowej, następnie dodałam kolejną porcję pochodnej cysteiny i octanu sodu, mieszaninę ogrzałam do 30°C i pozostawiłam na noc. Reakcję prowadziłam 24 h, odparowałam rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Po oczyszczeniu na drodze chromatografii kolumnowej (eluent: octan etylu:metanol, 98:2) otrzymałam produkt w postaci żółto-pomarańczowego proszku.

Wydajność: 39 mg, 70%; $^1\text{H NMR}$ (300MHz, CD_2Cl_2): 7,14 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H, NH), 5,09 (s, 5H, Cp), 4,82 (dt, 2H, $J_1 = 7,5$ Hz, $J_2 = 4,9$ Hz, CH-NH), 3,71 (s, 6H, OCH_3), 3,68 (d, $J = 5,1$ Hz, 4H, S-CH_2), 1,99 (s, 6H, CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CD_2Cl_2): δ 212,9, 212,6 ($\text{C}\equiv\text{O}$), 177,5, 171,2, 169,8 ($\text{C}=\text{O}$), 140,1 ($\text{C}=\text{C}$), 85,2 (Cp), 53,1 (OCH_3), 52,6 (HC-NH), 33,5 ($\text{H}_2\text{C-S}$), 22,5 (CH_3); **IR** (ATR - ciało stałe, cm^{-1}): 2958, 2927 ($\nu\text{C-H}$), 2045, 1995 ($\nu\text{C}\equiv\text{O}$), 1742 ($\nu\text{C}=\text{O}$), 1645 ($\nu\text{C}=\text{C}$); **HRMS (ES+)** m/z: obliczona dla wzoru $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{FeN}_3\text{O}_{10}\text{S}_2\text{H}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 624,043, wyznaczona 624,0409

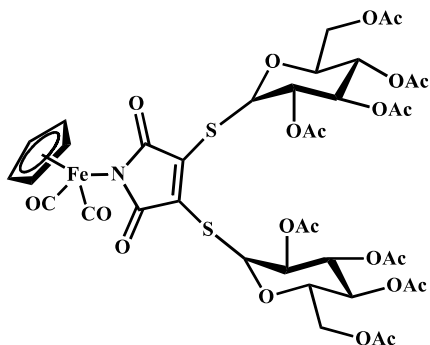
6.2.10. Synteza DTM-Gluc



Tetraoctan tioglukozy **Gluc** (2,2 eq., 400 mg) oraz octan sodu (2,2 eq., 90,2 mg) rozpuściłam w 6 ml metanolu, a następnie przygotowałam drugi roztwór: **DBM** (1 eq., 127 mg) rozpuściłam w 6 ml metanolu i dodałam go porcjami do mieszaniny reakcyjnej. Reakcję prowadziłam 10 min. w temperaturze pokojowej, następnie usunęłam metanol pod zmniejszonym ciśnieniem, mieszaninę poreakcyjną rozpuściłam w chlorku metylenu i ekstrahowałam w układzie woda-chlorek metylenu (3x30 ml). Oczyszcziłam produkt na drodze chromatografii kolumnowej używając mieszaniny chlorek metylenu:metanol (98:2) do wymycia związku. Otrzymałam produkt w postaci żółtych kryształów.

Wydajność: 390 mg, 95%; **¹H NMR** (CDCl₃, 600MHz): δ 7,72 (bs, 1H, NH), 5,90 (d, *J* = 10,2 Hz, 2H), 5,31 (t, *J* = 9,3 Hz, 2H), 5,16 (t, *J* = 9,9 Hz, 2H, CH₂), 5,11-5,07 (m, 2H, CH₂), 4,27-4,26 (d, *J* = 4,8 Hz, 1H), 4,25-4,24 (d, *J* = 4,8 Hz, 1H), 4,14-4,13 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 4,12-4,11 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 3,87-3,84 (m, 2H), 2,03 (d, *J* = 7,2 Hz, 12H, OAc), 2,09 (s, 12H, OAc); **¹³C NMR** (CDCl₃, 150MHz): δ 170,6, 170,3, 169,4, 169,3, 164,9 (C=O), 134,6 (C=C), 79,7, 75,9, 73,8, 70,5, 67,9 (CH), 61,6 (CH₂), 20,7, 20,6, 20,5 (CH₃); **IR** (ATR - ciało stałe, cm⁻¹): 3272 (νN-H), 1743, 1725 (νC=O); **HRMS (ES⁺)** m/z: obliczona dla C₃₂H₃₉NO₂₀S₂H [M+H]⁺ 820,1428, wyznaczona 820,142

6.2.11. Synteza Fp-DTM-Gluc



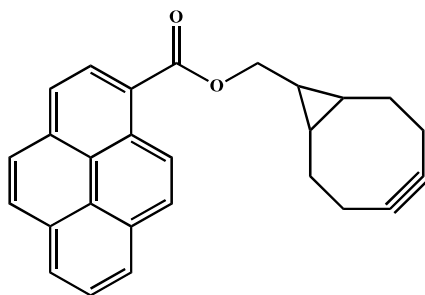
Gluc (2,2 eq., 87,3 mg) oraz octan sodu (2,2 eq., 19,6 mg) rozpuściłam w 6 ml acetonitrylu, a następnie przygotowałam roztwór **DBM** (1 eq., 127 mg) w 6 ml acetonitrylu i dodałam

porcjami do mieszaniny reakcyjnej. Reakcję prowadziłam 16 h w temperaturze pokojowej, następnie usunęłam rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, mieszaninę poreakcyjną rozpuściłam w chlorku metylenu, ekstrakcję prowadziłam w układzie woda-chlorek metylenu. Warstwę wodną ekstrahowałam trzema porcjami po 30 ml chlorku metylenu. Produkt oczyściłam chromatograficznie (eluent: chlorek metylenu:metanol, 99:1) otrzymując produkt w postaci żółtego ciała stałego.

Wydajność: 170 mg, 80%; **¹H NMR** (CDCl₃, 600MHz): δ 5,86 (d, *J* = 10,2 Hz, 2H), 5,31-5,28 (t, *J* = 9,3 Hz, 2H), 5,15-5,11 (m, 2H+5H, Cp), 5,06-5,03 (m, 2H), 4,29 (d, *J* = 4,8 Hz, 1H), 4,28 (d, *J* = 4,8 Hz, 1H), 4,12 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 4,10 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 3,89-3,87 (m, 2H), 2,07 (d, *J* = 7,2 Hz, 12H, OAc), 2,05 (s, 6H, OAc), 2,02 (s, 6H, OAc); **¹³C NMR** (CD₂Cl₂, 150MHz): δ 212,5 (C≡O), 177,0, 170,3, 169,8, 169,3, 169,2 (C=O), 137,6 (C=C), 85,1 (Cp), 80,5, 75,8, 73,8, 70,6, 68,0 (CH), 61,7 (CH₂), 20,5, 20,4, 20,3 (CH₃); **IR** (ATR - ciało stałe, cm⁻¹): 2047, 1997 (νC≡O), 1743 (νC=O), 1651 (νC=C); **HRMS (ES+)** m/z: obliczona dla C₃₉H₄₃FeN₁O₂₂S₂H [M+H]⁺ 998,1146, wyznaczona 998,1136; obliczona dla C₃₉H₄₃FeN₁O₂₂S₂Na [M+Na]⁺ 1020,0965 wyznaczona 1020,0955

6.3. Synteza nowych pochodnych pirenu zawierających fragment cyklooktynu

6.3.1. Synteza Py-ester-BCN

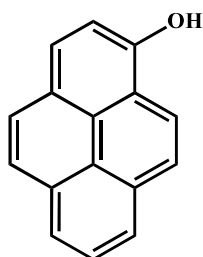


DCC (2 eq. 123,8 mg) oraz DMAP (1 eq., 36,65 mg) rozpuściłam w 5 ml bezwodnego chlorku metylenu, następnie dodałam 50 mg **BCN-OH** (1,1 eq.). Po rozpuszczeniu dodałam kwasu pireno-1-karboksylowy (1 eq., 74,9 mg) w 3 porcjach. Reakcję prowadziłam przez 2 h. Dodałam 1ml wody, mieszałam kolejne 10 min. w celu wytrącenia DCU, a następnie dodałam dużą ilość chlorku metylenu, przesączyłam, dodałam wodę i ekstrahowałam chlorkiem metylenu. Warstwę organiczną wysuszyłam nad bezwodnym siarczanem sodu (VI), a mieszaninę zatężyłam pod zmniejszonym ciśnieniem, a produkt oczyściłam

chromatograficznie używając chloroformu do rozwinięcia. Otrzymałam produkt w postaci białego ciała stałego.

Wydajność: 105 mg, 93%; **¹H NMR** (CDCl₃, 600MHz): 9,27 (d, *J* = 9,4 Hz, 1H, Py), 8,64 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, Py), 8,27 (t, *J* = 8,5 Hz, 2H, Py), 8,24 (d, *J* = 9,4 Hz, 1H, Py), 8,19 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H, Py), 8,18 (d, *J* = 3,8 Hz, 1H, Py), 8,10 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H, Py), 8,07 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H, Py), 4,46 (d, *J* = 6,7Hz, 2H, O-CH₂), 2,53-2,50 (m, 2H, BCN), 2,37-2,33 (m, 2H, BCN), 2,21-2,19 (m, 2H, BCN), 1,51-1,45 (m, 2H, BCN), 1,00-0,95 (m, 3H, cyklopropan); **¹³C NMR** (CDCl₃, 150MHz): δ 168,2 (CO), 134,3, 131,1, 130,4, 129,6, 129,3, 128,3, 126,3, 126,2, 125,0, 124,9, 124,3, 124,2, 124,1 (Py), 98,8 (C≡C), 69,5, 33,4, 23,8, 21,4; **IR** (KBr, cm⁻¹): 2919, 2902, 2842 (νC-H), 1695 (νC=O), 1539 (νC=C), 1249, 1229 (νC-O); **HRMS** (ESI) m/z: obliczona dla wzoru C₂₇H₂₂NO₂H [M+H]⁺ 379,1698 wyznaczona 379,1707; **T_{top}**= 135,5 - 136,5°C

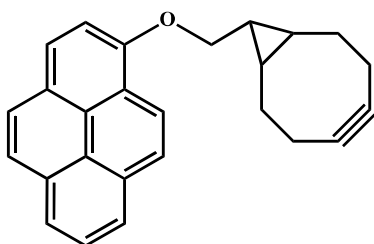
6.3.2. Synteza 1-hydroksypirenu



Pireno-1-karboksyaldehyd (1 eq., 230 mg) rozpuściłam w 10 ml chlorku metylenu, a następnie dodałam kwas meta-chloronadbenzoesowy (1,5 eq., 258 mg). Reakcję prowadziłam 24h, w temperaturze pokojowej, w obecności gazu obojętnego. Produkt wydzieliłam z mieszaniny poreakcyjnej na drodze ekstrakcji, a następnie oczyściłam go za pomocą chromatografii kolumnowej, jako eluent stosowałam mieszaninę rozpuszczalników heksan:octan etylu (95:5). Produkt otrzymałam w postaci kremowego proszku.

Wydajność: 146 mg, 67 %; **¹H NMR** (CDCl₃, 600MHz): δ 8,34 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H, Py), 8,11-7,90 (m, 7H, Py), 7,47 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, Py), 5,56 (s, 1H, -OH)

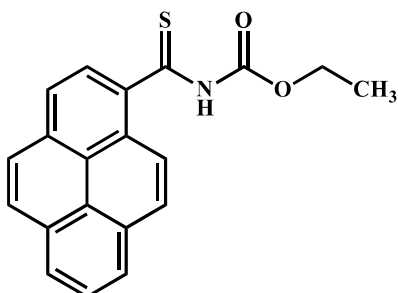
6.3.3. Synteza Py-eter-BCN



1-hydroksypiren (1 eq., 126 mg) oraz **BCN-OH** (1eq., 82,5 mg) rozpuściłam w 4,5 ml tetrahydrofuranu. Mieszaninę reakcyjną schłodziłam do 0°C w obecności argonu. Do schłodzonej mieszaniny dodałam 1,5 eq. PPh₃ (216,4 mg) oraz 1,5 eq. DIAD (162,4 µl) i kontynuowałam mieszanie w 0°C przez kolejne 5 min. Następnie mieszaninę ogrzałam do temperatury pokojowej. Reakcję prowadziłam 45 min., do mieszaniny poreakcyjnej dodałam 50 ml H₂O i ekstrahowałam 50 ml chlorku metylenu. Produkt otrzymałam w postaci białego ciała stałego po oczyszczeniu na kolumnie chromatograficznej, używając chlorku metylenu jako eluent.

Wydajność: 145 mg, 75%; **¹H NMR** (CDCl₃, 600MHz): δ 8,49 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H, Py), 8,13 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, Py), 8,10-8,08 (m, 2H, Py), 8,06 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H, Py), 7,98-7,95 (m, 2H, Py), 7,90 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H, Py), 7,52 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, Py), 4,30 (d, *J* = 6,4 Hz, 2H, O-CH₂), 2,52-2,50 (m, 2H, BCN), 2,37-2,32 (m, 2H, BCN), 2,22-2,19 (m, 2H, BCN), 1,52-1,45 (m, 2H, BCN), 1,03-0,99 (m, 1H, cyklopropan), 0,98-0,95 (m, 2H, cyklopropan); **¹³C NMR** (CDCl₃, 150MHz): δ 153,2, 131,8, 131,7, 127,3, 126,4, 126,1, 125,9, 125,5, 125,3, 125,0, 124,3, 124,2, 121,4, 120,7 (Py), 109,8, 98,9 (C≡C), 73,1, 33,5, 24,3, 23,0, 21,5; **IR** (KBr, cm⁻¹): 2968, 2925, 2899, 2842 (νC-H), 1600, 1500 (νC=C), 1252 (νC-O); **HRMS (ESI)** m/z: obliczona dla C₂₆H₂₂OH [M+H]⁺ 351,1749, wyznaczona 351,1754; **T_{top}**=140 - 140,6°C

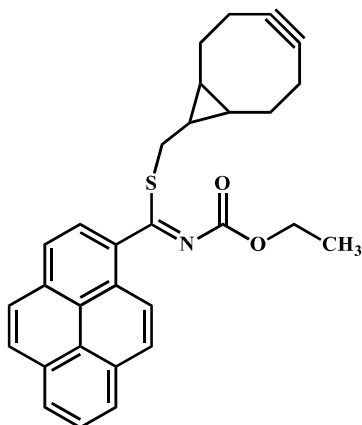
6.3.4. Synteza tioamidu *N*-etoksykarbonylowego



Piren (1 eq., 2,02 g) rozpuściłam w 100 ml chlorku metylenu i dodałam 3,5 ml kwasu tryfłowego (4 eq.). Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodałam izotiocyjanian *N*-etoksykarbonylu (1,2 eq., 1,42 ml). Reakcję zakończyłam po 10 min., dodałam 200 ml H₂O i ekstrahowałam 150 ml chlorku metylenu, następnie warstwę organiczną przemyłam dwiema porcjami wodnego roztworu NaHCO₃ (2x150 ml). Warstwę organiczną wysuszyłam nad siarczanem sodu (VI), a nadmiar rozpuszczalnika usunęłam pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyściłam chromatograficznie (eluent: chlorek metylenu) otrzymując pomarańczowo-żółte kryształy.

Wydajność: 3 g, 90%; $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ 9,48 (s, 1H, NH), 8,24 (d, $J = 9$ Hz, 1H), 8,21 (dd, $J_1 = 3,6$ Hz, $J_2 = 11,4$ Hz, 2H), 8,16 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 8,17 (dd, $J_1 = 1,8$ Hz, $J_2 = 10,8$ Hz, 2H), 8,05 (d, $J = 9$ Hz, 1H), 8,03 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H), 8,01 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 4,04 (q, $J = 6,6$ Hz, 2H), 1,08 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H)

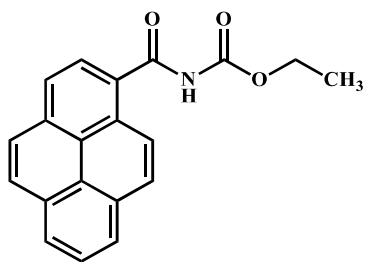
6.3.5. Synteza Py-S-BCN



Tioamid *N*-etoksykarbonylowy (1 eq., 333 mg) oraz **BCN-OH** (1 eq., 150 mg) rozpuściłam w tetrahydrofuranie (10 ml), następnie roztwór schłodziłam do 0°C w obecności argonu, dodałam PPh_3 (1,5 eq., 393,4 mg), dodałam DIAD (1,5 eq., 295,3 μl) i kontynuowałam mieszanie w 0°C przez kolejne 10 min. Następnie roztwór ogrzałam do temperatury pokojowej, a reakcję prowadziłam przez 15 min. Dodałam 50 ml H_2O i ekstrahowałam 50 ml chlorku metylenu. Warstwę organiczną wysuszyłam nad siarczanem sodu (VI), a nadmiar rozpuszczalnika usunęłam pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyściłam chromatograficznie (eluent: chlorek metylenu) otrzymując biały proszek.

Wydajność: 395 mg, 85%; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600MHz): δ 8,25-8,22 (m, 3H, Py), 8,16 (d, $J = 3,3$ Hz, 1H, Py), 8,15 (d, $J = 4,6$ Hz, 1H, Py), 8,14 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H, Py), 8,07-8,03 (m, 2H, Py), 7,97 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, Py), 3,80 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H, CH_2), 3,28 (d, $J = 7,0$ Hz, 2H, S- CH_2), 2,50-2,47 (m, 2H, BCN), 2,33-2,29 (m, 2H, BCN), 2,19-2,17 (m, 2H, BCN), 1,45-1,39 (m, 2H, BCN), 0,86-0,79 (m, 3H, cyklopropan), 0,74 (t, $J = 7,8$ Hz, 3H, CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 150MHz): δ 177,0, 161,1 (CO), 132,4, 131,2, 131,0, 130,8, 128,7, 128,5, 127,4, 127,2, 126,4, 125,9, 125,8, 125,0, 124,4, 124,1 (Py), 98,8 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 62,3, 37,7, 33,5, 25,8, 23,2, 21,4, 13,8 (CH_3); **IR** (KBr, cm^{-1}): 3447 ($\nu\text{N-H}$), 2981, 2922, 2905, 2839 ($\nu\text{C-H}$), 1712 ($\nu\text{C=O}$), 1606 ($\nu\text{C=C}$); **HRMS (ESI)** m/z : obliczona dla $\text{C}_{30}\text{H}_{27}\text{NO}_2\text{SH}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 466,1841, wyznaczona 466,1846; $T_{\text{top}}=145,5 - 146,6^\circ\text{C}$

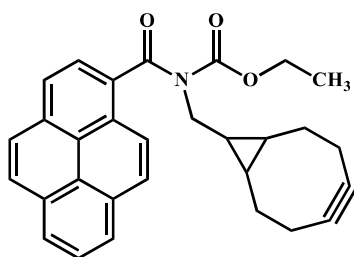
6.3.6. Synteza amidu *N*-etoksykarbonylowego



Tioamid *N*-etoksykarbonylowy (1 eq., 1,5 g) rozpuściłam w 30 ml bezwodnego chlorku metylenu, następnie dodawałam porcjami 0,938 ml bezwodnika trifluorooctowego (1,5 eq.). Reakcję prowadziłam 2 h, dodałam 50 ml H₂O i ekstrahowałam 50 ml chlorku metylenu. Warstwę organiczną przemyłam dwiema porcjami wodnego roztworu NaHCO₃ (2x50 ml) oraz 50 ml solanki. Warstwę organiczną wysuszyłam nad siarczanem sodu (VI), a nadmiar rozpuszczalnika usunęłam pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyściłam chromatograficznie używając mieszaniny chlorek metylenu:octan etylu (95:5) do wymycia produktu. Otrzymując żółto-zielone ciało stałe.

Wydajność: 714 mg, 50%; **¹H NMR** (CDCl₃, 600MHz): δ 8,54 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H, Py), 8,22-8,20 (m, 4H, Py), 8,15 (bs, 1H, NH), 8,14-8,09 (m, 4H, Py), 8,05 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H, Py), 8,02 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H, Py), 4,3 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H, CH₂), 1,33 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H, CH₃); **¹³C NMR** (CDCl₃, 150MHz): δ 167,8, 151,0 (CO), 133,5, 131,1, 130,5, 129,4, 129,3, 129,2, 128,2, 127,0, 126,5, 125,3, 124,7, 124,6, 124,2, 124,1, 123,8 (Py), 62,5 (CH₂), 14,2 (CH₃); **HRMS (ESI)** m/z: obliczona dla C₂₀H₁₅O₃NH [M+H]⁺ 318,1130, wyznaczona 318,1140; obliczona dla C₂₀H₁₄O₃N [M-H]⁺ 316,0974, wyznaczona 316,0976

6.3.7. Synteza Py-*N*-BCN



Amid *N*-etoksykarbonylowy (1 eq., 317 mg) oraz **BCN-OH** (1 eq., 150 mg) rozpuściłam w tetrahydrofuranie (12 ml) mieszaninę w obecności argonu schłodziłam do 0°C, dodałam 1,5 eq. PPh₃ (393,4 mg), 1,4 eq. DIAD (295,3 μl) i mieszałam przez 10 min. w 0°C. Następnie roztwór ogrzałam do temperatury pokojowej. Reakcję prowadziłam 1 h, dodałam 50 ml H₂O

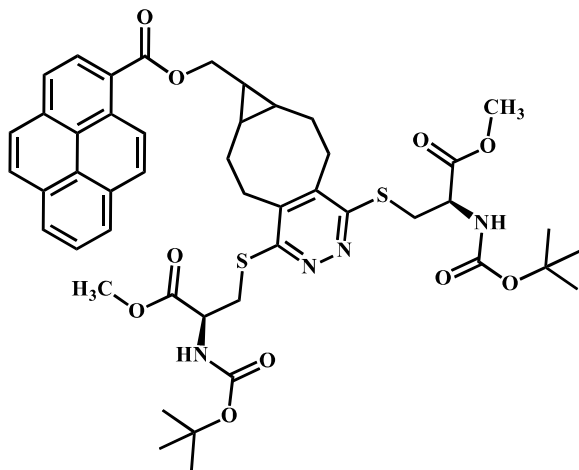
i ekstrahowałam 50 ml chlorku metylenu. Warstwę organiczną przemyłam 50 ml wody. Produkt oczyściłam chromatograficznie (eluent: chloroform), otrzymując białe ciało stałe.

Wydajność: 315 mg, 70%; **¹H NMR** (CDCl₃, 600MHz): δ 8,30 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H, Py), 8,23 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H, Py), 8,22 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H, Py), 8,17 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H, Py), 8,15 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H, Py), 8,13 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H, Py), 8,07 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H, Py), 8,05 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H, Py), 7,97 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H, Py), 4,10 (d, *J* = 6,8 Hz, 2H), 3,73 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H, CH₂), 2,55-2,52 (m, 2H, BCN), 2,38-2,33 (m, 2H, BCN), 2,22-2,20 (m, 2H, BCN), 1,51-1,46 (m, 2H, BCN), 1,07-1,04 (m, 1H, cyklopropan), 1,03-1,00 (m, 2H, cyklopropan), 0,42 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H, CH₃);

¹³C NMR (CDCl₃, 150MHz): δ 172,7, 154,9 (CO), 132,8, 132,3, 131,3, 130,7, 128,8, 128,6, 128,1, 127,2, 126,3, 125,9, 125,7, 124,6, 124,2, 123,8 (Py), 98,9 (C≡C), 62,6, 49,5, 33,6, 24,5, 23,8, 21,5, 13,2 (CH₃); **IR** (KBr, cm⁻¹): 2971, 2925, 2902, 2839 (νC-H), 1732, 1709 (νC=O), 1649 (νC=C); **HRMS (ESI)** m/z: obliczona dla C₃₀H₂₇NO₃H [M+H]⁺ 450,2069, wyznaczona 450, 2075, **T_{top}** = 94,5 - 95,5°C

6.4. Reakcje pochodnej Py-ester-BCN z cząsteczkami biologicznie aktywnymi

6.4.1. Synteza Py-ester-di*N*-Boc-Cys-tetrazyna



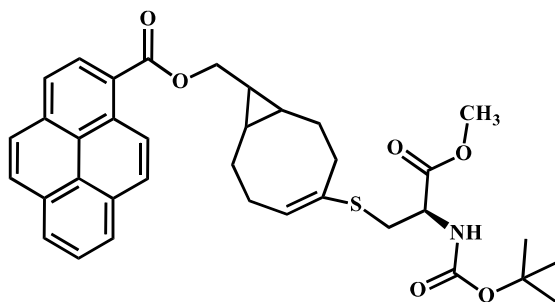
I etap: 2,4 eq. esteru metylowego *N*-Boc-L-cysteiny *N*-Boc-Cys (141 mg) oraz octan sodu (2,4 eq., 43 mg) rozpuściłam w 5 ml acetonitrylu, następnie przygotowałam roztwór dichlorotertazyny (1 eq., 38 mg) w 5 ml acetonitrylu i dodałam porcjami do mieszaniny reakcyjnej. Postęp reakcji kontrolowałam przy użyciu TLC.

II etap: Do mieszaniny z pierwszego etapu dodałam porcjami rozpuszczony w 7 ml acetonitrylu **Py-ester-BCN** (1 eq., 95 mg). Mieszaninę reakcyjną podgrzałam do 30°C w celu

lepszego rozpuszczenia substratu. Reakcję prowadziłam przez 22 h, następnie dodałam 50 ml H₂O i ekstrahowałam chlorkiem metylenu (50 ml) DCM. Produkt oczyściłam chromatograficznie (eluent: chlorek metylenu:heksan, 95:5) otrzymując biały proszek.

Wydajność: 200 mg, 90%; ¹H NMR (CDCl₃, 600MHz): δ 9,20 (d, *J* = 9,4 Hz, 1H, Py), 8,59 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, Py), 8,28-8,22 (m, 3H, Py), 8,19-8,17 (m, 2H, Py), 8,08 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H, Py), 8,05 (t, *J* = 6,6 Hz, 1H, Py), 5,69 (bs, 2H, 2x-NH), 4,66-4,59 (m, 2H, 2x-N-CH), 4,26 (d, *J* = 7,3 Hz, 2H, O-CH₂), 3,79-3,73 (m, 12H, 6H, 2x-CH₃, 4H 2x-S-CH₂ i 2H BCN), 2,92-2,82 (m, 4H, BCN), 2,68-2,63 (m, 2H, BCN), 1,42-1,41 (m, 18H, 2x *tert*-Bu), 1,09-1,06 (m, 1H, cyklopropan), 0,91-0,87 (m, 2H, cyklopropan); ¹³C NMR (CDCl₃, 150MHz): δ 171,4, 171,3, 168,1, 158,1, 155,3 (CO), 138,8, 134,3, 131,0, 129,6, 129,4, 128,3, 127,2, 126,4, 126,3, 126,2, 124,9, 124,2, 124,1, 123,9 (Py), 68,5, 53,3 (C_{alifat.}), 52,6 (-OCH₃), 32,7, 28,3 (*tert*-butyl), 27,6, 27,2, 26,8, 21,5 (C_{alifat.})

6.4.2. Synteza Py-ester-*N*-Boc-Cys

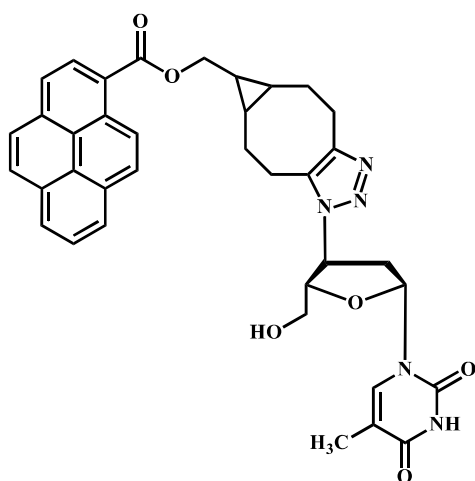


N-Boc-Cys (3 eq., 105,9 mg) oraz octan sodu (2,6 eq., 32 mg) rozpuściłam w 3 ml acetonitrylu. Przygotowałam roztwór **Py-ester-BCN** (1eq., 56,7 mg) w 7 ml acetonitrylu i dodałam porcjami do mieszaniny reakcyjnej. Mieszaninę reakcyjną podgrzałam do 30°C w celu lepszego rozpuszczenia substratu. Reakcję prowadziłam 3 dni w 37°C, kontrolując przebieg reakcji przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej. Do mieszaniny poreakcyjnej dodałam 50 ml H₂O i ekstrahowałam 50 ml chlorku metylenu, następnie przemyłam warstwę organiczną dwiema porcjami H₂O (2x50 ml). Produkt oczyściłam na drodze chromatografii kolumnowej używając mieszaniny chlorek metylenu:metanol (99:1), jako eluent. Otrzymałam produkt w postaci białego proszku.

Wydajność: 78 mg, 85%; ¹H NMR (CDCl₃, 600MHz): δ 9,24 (d, *J* = 9,6 Hz, 1H, Py), 8,62 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, Py), 8,27 (t, *J* = 8,7 Hz, 2H, Py), 8,23 (d, *J* = 9,4 Hz, 1H, Py), 8,18 (d, *J* = 9,6 Hz, 2H, Py), 8,10 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H, Py), 8,07 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H, Py), 5,91-5,88 (m, 1H, HC=C), 5,30 (bs, 1H, -NH), 4,58 (m, 1H, N-CH), 4,37 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H, O-CH₂), 3,75 (d, *J* = 8,4 Hz, 3H, -OCH₃), 3,14-2,99 (m, 2H, S-CH₂), 2,58-2,52 (m, 1H, BCN), 2,47-2,42 (m,

1H, BCN), 2,40-2,34 (m, 1H, BCN), 2,34-2,28 (m, 2H, BCN), 2,21-2,15 (m, 1H, BCN), 1,46-1,44 (m, 11H, 9H *tert*-Bu + 2H BCN), 1,13-1,06 (m, 2H, cyklopropan), 1,04-1,02 (m, 1H, cyklopropan); ¹³C NMR (CDCl₃, 150MHz): δ 171,4, 171,3, 168,1, 158,1, 155,3 (CO), 138,8, 134,3, 131,0, 129,6, 129,4, 128,3, 127,2, 126,4, 126,3, 126,2, 124,9, 124,2, 124,1, 123,9 (Py), 69,3, 52,4 (-OCH₃), 33,9, 31,6, 29,4, 29,2, 28,3 (Califat.), 28,3 (*tert*-butyl), 27,4, 26,4, 23,3, 23,0, 22,1 (Califat.)

6.4.3. Synteza Py-ester-AZT

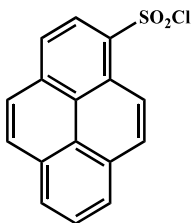


Py-ester-BCN (1,2 eq., 225 mg) rozpuściłam w 20 ml tetrahydrofuranu w 50°C, a następnie dodałam **AZT** (1 eq., 134 mg). Dodatkowo w celu lepszego rozpuszczenia **AZT** dodałam 1 ml wody. Reakcję prowadziłam w 50°C przez 20 h. Rozpuszczalnik usunęłam pod zmniejszonym ciśnieniem, surowy produkt oczyszczałam na drodze chromatografii kolumnowej (eluent: mieszanina chloroform:metanol, 99:1). Produkt otrzymałam w postaci białego proszku.

Wydajność: 290 mg, 90%; ¹H NMR (CDCl₃, 600MHz): δ 9,24 (d, *J* = 9,4 Hz, 1H, Py), 8,69 (bs, 1H, OH), 8,62 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, Py), 8,28 (t, *J* = 8,3Hz, 2H, Py), 8,24 (d, *J* = 9,4 Hz, 1H, Py), 8,19 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H, Py), 8,10 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, Py), 8,08 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H, Py), 6,13 (q, *J*₁ = 5,2 Hz, *J*₂ = 6,7 Hz 1H), 5,28-5,25 (m, 1H), 4,48-4,44 (m, 1H), 4,42-4,39 (m, 1H), 4,38,4,34 (m, 1H), 4,02-3,99 (m, 1H), 3,69-3,62 (m, 1H), 3,49-3,44 (m, 1H), 3,15-3,09 (m, 1H), 3,07-3,02 (m, 1H), 2,99-2,91 (m, 3H), 2,76-2,70 (m, 1H), 2,56-2,51 (m, 1H), 2,51-2,46 (m, 1H), 1,92 (s, 3H, -CH₃), 1,54-1,45 (m, 2H), 1,13-1,03 (m, 3H, cyklopropan); ¹³C NMR (CDCl₃ 150MHz): δ 168,2, 163,4, 150,3 (CO), 145,4, 139,0, 134,3, 133,7, 133,6, 131,1, 130,4, 129,7, 129,4, 128,3, 127,2, 126,4, 126,2, 124,9, 124,2, 123,9 (Py), 111,2, 91,1, 85,6, 85,5, 68,7, 61,9, 61,8, 56,2, 36,9, 36,8, 27,3, 26,6, 25,6, 25,5, 24,3, 23,2, 22,9, 22,7, 22,6, 12,4 (Califat.)

6.5. Synteza nowych pochodnych maleimidu zawierających fragment pirenowy

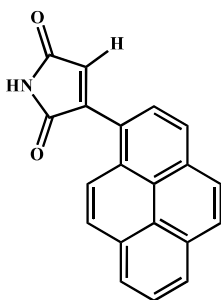
6.5.1. Synteza chlorku pireno-1-sulfonowego



Kwas pirenosulfonowy (1 eq., 2 g) rozpuściłam w 30 ml DMFu, roztwór schłodziłam do 0°C, a następnie dodałam porcjami chlorek tionylu (10 eq., 8,2 g) obserwując wypadanie brunatno-żółtego osadu. Reakcję prowadziłam przez 2 h, następnie mieszaninę poreakcyjną wylałam na lód, a powstały osad przesączyłam. Osad rozpuściłam w 200 ml chlorku metylenu, dodałam 100 ml H₂O i ekstrahowałam, następnie warstwę organiczną wysuszyłam nad bezwodnym siarczanem sodu (VI), przesączyłam i odparowałam chlorek metylenu pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyściłam chromatograficznie (eluent: mieszanina chlorek metylenu:heksan, 60:40). Otrzymałam produkt w postaci żółtych kryształów.

Wydajność: 75%; ¹H NMR (CDCl₃, 600MHz): δ 9,12 (d, *J* = 9,3 Hz, 1H), 8,76 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 8,45 (d, *J* = 9,4 Hz, 1H), 8,41 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 8,38 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 8,31 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 8,24 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 8,18 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H), 8,13 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H)

6.5.2. Synteza Mal-Py

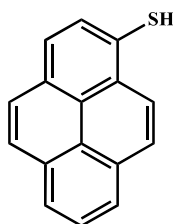


Chlorek kwasu pirenosulfonowego (1,5 eq., 451 mg), maleimid (1 eq., 97 mg) i chlorek palladu (II) - 10% mol, 18 mg. Substraty rozpuściłam w 5 ml acetonitrylu, następnie dodałam TFA (2 eq., 153 µl). Mieszaninę reakcyjną ogrzałam do 80°C. Reakcję prowadziłam przez 18 h, następnie dodałam 50 ml wody i ekstrahowałam chlorkiem metylenu (50 ml). Warstwę organiczną wysuszyłam nad bezwodnym siarczanem sodu (VI) i odparowałam chlorek metylenu pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyściłam na drodze chromatografii

kolumnowej używając do chlorku metylenu jako eluent. Otrzymałam produkt w postaci drobnych czerwonych kryształów.

Wydajność: 6 mg, 2%; **¹H NMR** (aceton-d₆, 600MHz): δ 9,29-8,25 (m, 3H), 8,25 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 8,20 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H), 8,18-8,16 (m, 2H), 8,11 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 8,09 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H), 7,48 (bs, 1H, NH), 6,97 (s, 1H, HC=C); **IR** (KBr, cm⁻¹): 3447 (νN-H), 2958, 2922, 2846 (νC-H), 1768, 1719 (νC=O), 1626 (νC=C); **HRMS (ESI)** m/z: obliczona dla C₂₀H₁₁NO₂H [M+H]⁺ 298,0868 wyznaczona eksperymentalnie 298,0874

6.5.3. Synteza 1-merkaptopirenu

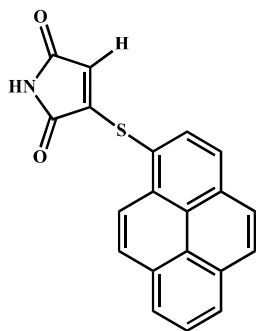


Chlorek kwasu pirenosulfonowego (1 eq., 300 mg) rozpuściłam w 25 ml chlorku metylenu, następnie dodałam porcjami PPh₃ (3 eq., 786,9 mg). Reakcje prowadziłam przez 18 h. Następnie do mieszaniny poreakcyjnej dodałam 50ml wody, i ekstrahowałam chlorkiem metylenu,

a warstwę organiczną wysuszyłam nad bezwodnym siarczanem sodu (VI). Nadmiar chlorku metylenu odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem. Mieszaninę poreakcyjną oczyściłam chromatograficznie używając mieszaniny heksan:octan etylu (95:5) jako eluentu. Otrzymałam produkt w postaci biało-zielonego proszku.

Wydajność: 150 mg, 65%, **¹H NMR** (CDCl₃, 600MHz): δ 8,37 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H), 8,19 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 8,14 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H), 8,03-7,98 (m, 5H), 3,84 (bs, 1H, SH)

6.5.4. Synteza Mal-S-Py

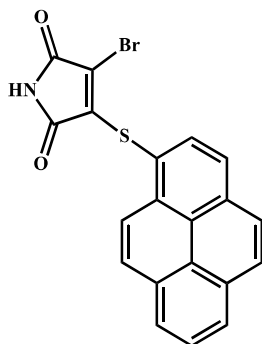


Merkaptopipren (1 eq., 50 mg) oraz octan sodu (1 eq., 17 mg) rozpuściłam w 7 ml acetonitrylu, mieszaninę ogrzałam do 35°C. Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodałam porcjami wcześniej

przygotowany roztwór **BM** (1 eq., 37 mg) w 5 ml acetonitrylu. Reakcję prowadziłam 60 min. w 35°C, następnie dodałam 50 ml H₂O i ekstrahowałam 50 ml chlorku metylenu. Warstwę organiczną wysuszyłam nad bezwodnym siarczanem sodu (VI) i oczyściłam na drodze chromatografii kolumnowej stosując chlorek metylenu jako eluent. Produkt otrzymałam w postaci jasno żółtego ciała stałego.

Wydajność: 55 mg, 80%; **¹H NMR** (DMSO-d₆, 600MHz): δ 11,11 (bs, 1H, NH), 8,44-8,42 (m, 3H, Py), 8,41-8,37 (m, 3H, Py), 8,36 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H, Py), 8,30 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H, Py), 8,19 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H, Py), 5,31 (d, *J* = 1,2 Hz, 1H, maleimid); **¹³C NMR** (DMSO-d₆, 150MHz): δ 170,8, 169,5 (CO), 151,2 (C-S), 133,6, 132,6, 132,4, 131,1, 130,7, 130,2, 129,6, 127,7, 127,5, 127,0, 126,9, 126,4, 125,2, 123,4, 123,8, 121,2, 121,1 (Py); **HRMS (ESI)** m/z: obliczona dla wzoru C₂₀H₁₀NO₂S [M-H]⁺ 328,0432 wyznaczona 328,0434; obliczona dla C₂₀H₁₁NO₂SH [M+H]⁺ 330,0589 wyznaczona 330,0594

6.5.5. Synteza MalBr-S-Py

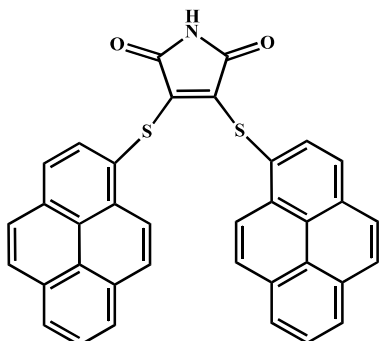


Merkaptopiren (1 eq., 50 mg) oraz octan sodu (1 eq., 17 mg) rozpuściłam w 6 ml acetonitrylu i podgrzałam do 35°C w celu lepszego rozpuszczenia substratów. Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodałam porcjami wcześniej przygotowany roztwór **DBM** (1 eq., 53,5 mg), który rozpuściłam w 4 ml acetonitrylu. Reakcję prowadziłam przez 15 min. w 35°C, następnie dodałam 50 ml H₂O i ekstrahowałam 50 ml chlorku metylenu. Produkt oczyściłam chromatograficznie. Jako eluent zastosowałam chloroform. Otrzymałam produkt w postaci czerwonego ciała stałego.

Wydajność: 35 mg, 40%; **¹H NMR** (DMSO-d₆, 600MHz): δ 11,56 (bs, 1H, NH), 8,49 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H, Py), 8,42 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H, Py), 8,38-8,35 (m, 2H, Py), 8,33 (d, *J* = 5,9 Hz, 1H, Py), 8,32 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H, Py), 8,26 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H, Py), 8,17 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H, Py); **¹³C NMR** (DMSO-d₆, 150MHz): δ 167,7 (C-Br), 166,2, 165,8 (CO), 141,8 (C-S), 134,0, 133,3, 132,7, 131,1, 130,7, 130,3, 129,8, 129,4, 127,7, 127,4, 126,8, 125,6, 124,7, 123,8, 121,0, 120,7 (Py); **HRMS (ESI)** m/z: obliczona dla C₂₀H₉NO₂SBr [M-H]⁺ 405,9537

wyznaczona 405,9539; obliczona dla $C_{20}H_{11}NO_2SBrH$ $[M+H]^+$ 407,9694 wyznaczona 407,9702

6.5.6. Synteza Mal-S-diPy



Merkaptopiren (2 eq., 50 mg) oraz octan sodu (2 eq., 17 mg) rozpuściłam w 7 ml acetonitrylu i podgrzałam do 35°C w celu lepszego rozpuszczenia substratów. Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodałam porcjami wcześniej przygotowany roztwór **DBM** (1 eq., 53,5 mg), który rozpuściłam w 3 ml acetonitrylu. Reakcję prowadziłam przez 2,5 h w 35°C, następnie dodałam 50 ml H_2O i ekstrahowałam 50 ml chlorku metylenu. Produkt oczyściłam chromatograficznie. Jako eluent zastosowałam chlorek metylenu. Otrzymałam produkt w postaci ciemnoczerwonego ciała stałego.

Wydajność: 18 mg, 30%; **1H NMR** (DMSO- d_6 , 600MHz): δ 11,50 (bs, 1H, NH), 8,06 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, Py), 8,00 (dd, $J_1 = 7,3$ Hz, $J_2 = 1,2$ Hz, 2H, Py), 7,96 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, Py), 7,94 (d, $J = 1,5$ Hz, 4H, Py), 7,82 (dd, $J_1 = 7,6$ Hz, $J_2 = 1,3$ Hz, 2H, Py), 7,80 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H, Py), 7,54 (s, 4H, Py); **^{13}C NMR** (DMSO- d_6 , 150MHz): δ 169,0 (CO), 134,8, 131,2, 130,5, 130,3, 130,1, 129,8, 128,4, 127,9, 127,2, 126,6, 125,9, 125,7, 125,0, 124,1, 123,2, 123,0, 122,7 (Py); **HRMS (ESI)** m/z: obliczona dla $C_{36}H_{19}NO_2S_2H$ $[M+H]^+$ 562,0935 wyznaczona 562,0935; obliczona dla $C_{36}H_{19}NO_2S_2Na$ $[M+Na]^+$ 584,0755 wyznaczona 584,0768

BIBLIOGRAFIA:

1. Sabot, C.; Kele, P., *Novel Approaches in Biomolecule Labeling*, *Biomolecules*, **2021**, 11, 1809
2. Vianney Delplace, *Rethinking Click and Bioorthogonal Chemistry for Biomedical Applications*, *ACS Materials Lett.*, **2024**, 6, 153–158
3. R. Narain, (Ed.). *Chemistry of Bioconjugates: Synthesis, Characterization, and Biomedical Applications*, **2014**, John Wiley & Sons
4. Ellen M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 6974–6998
5. A. M. Ali, J. Atmaj, N. Van Oosterwijk, M. R. Groves, A. Dömling, *Stapled Peptides Inhibitors: A New Window for Target Drug Discovery*, *Computational and Structural Biotechnology Journal*, **2019**, 17, 263
6. S. L. Kuan, T. Wang, T. Weil, *Site-Selective Disulfide Modification of Proteins: Expanding Diversity beyond the Proteome*, *Chem. Eur. J.*, 2016, 22, 17112
7. Y. Chen, C. Dai, J. Han, Y. Xing, F. Yin, Z. Li, *Recent Chemical Biology Insights Towards Reversible Stapled Peptides*, *ChemBioChem*, **2025**, 5, 26(9)
8. Lau *et al.*, *Peptide stapling techniques based on different macrocyclisation chemistries*, *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, 44, 91-102
9. M. T. W. Lee, A. Maruani, J. R. Baker, S. Caddick, V. Chudasama, *Next-generation disulfide stapling: reduction and functional re-bridging all in one*, *Chem. Sci.*, **2016**, 7, 799-802
10. J. L. Lau, M. K. Dunn, *Therapeutic peptides: historical perspectives, current development trends, and future directions.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2018**, 26, 2700
11. O. Boutureira, G. J. L. Bernardes, *Advances in Chemical Protein Modification*, *Chem. Rev.*, **2015**, 115, 5, 2174–2195
12. M. W. Jones, R. A. Strickland, F. F. Schumacher, S. Caddick, J. R. Baker, M. I. Gibson, D. M. Haddleton, *Polymeric Dibromomaleimides As Extremely Efficient Disulfide Bridging Bioconjugation and Pegylation Agents*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 3, 1847–1852
13. S. P. Brown, A. B. Smith, *Peptide/Protein Stapling and Unstapling: Introduction of *s*-Tetrazine, Photochemical Release, and Regeneration of the Peptide/Protein*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, 137, 4034–4037
14. K. Krell, H. A. Wagenknecht, *Fluorogenic and Bioorthogonal Modification of RNA Using Photoclick Chemistry*, *Biomolecules*, **2020**, 10, 480
15. P. Shieh, C. R. Bertozzi, *Design strategies for bioorthogonal smart probes*, *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, 12, 9307–9320
16. R. E. Bird, S. A. Lemmel, X. Yu, Q. A. Zhou, *Bioorthogonal Chemistry and Its Applications*, *Bioconjugate Chem.*, **2021**, 32, 2457–2479
17. K. Miszczak, *Chemia bioortogonalna – Nowa perspektywa dla chemii organicznej*, **2018**, 72, 9-10
18. D. Svatunek, K. Athrin Lang, A. Murnauer, Z. Tan, K. N. Houk, *How cycloalkane fusion enhances the cycloaddition reactivity of dibenzocyclooctynes*, *Chem. Sci.*, **2024**, 15, 2229–2235
19. A. Vidyakina, S. A. Silonov, A. I. Govdi, A. Yu. Ivanov, E. P. Podolskaya, I. A. Balova, S. Bräse, N. A. Danilkina, *Key Role of Cycloalkyne Nature in Alkyne-Dye*

- Reagents for Enhanced Specificity of Intracellular Imaging by Bioorthogonal Bioconjugation*, *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2024**, 22
20. N. K. Devaraj, *The Future of Bioorthogonal Chemistry*, *ACS Cent. Sci.*, **2018**, 4, 952–959
 21. R. E. Bird, S. A. Lemmel, X. Yu, Q. A. Zhou, *Bioorthogonal Chemistry and Its Applications*, *Bioconjugate Chem.*, **2021**, 32, 2457–2479
 22. N. K. Devaraj, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Tetrazine Based Cycloadditions: Application to Pretargeted Live Cell Imaging*, *Bioconjugate Chem.*, **2008**, 19 (12), 2297–2299
 23. M. T. Taylor, M. L. Blackman, O. Dmitrenko, J. M. Fox, *Design and Synthesis of Highly Reactive Dienophiles for the Tetrazine–trans-Cyclooctene Ligation*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133 (25), 9646–9649
 24. D. N. Kamber, L. A. Nazarova, Y. Liang, S. A. Lopez, D. M. Patterson, H. W. Shih, K. N. Houk, J. A. Prescher, *Isomeric Cyclopropenes Exhibit Unique Bioorthogonal Reactivities*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135 (37), 13680–13683
 25. M. R. Karver, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Synthesis and Evaluation of a Series of 1,2,4,5-Tetrazines for Bioorthogonal Conjugation*, *Bioconjugate Chem.*, **2011**, 22 (11), 2263–2270
 26. X. Li, Z. Liua, S. Dong, *Bicyclo[6.1.0]nonyne and tetrazine amino acids for Diels–Alder reactions*, *RSC. Adv.*, **2017**, 7, 44470–44473
 27. K. Horisawa, *Specific and quantitative labeling of biomolecules using click chemistry*, *Frontiers in Physiology*, **2014**, 4
 28. K. Lang, J. W. Chin, *Cellular incorporation of unnatural amino acids and bioorthogonal labeling of proteins*, *Chem. Rev.*, **2014**, 114, 4764–4806
 29. R. E. Bird, S. A. Lemmel, X. Yu, Q. A. Zhou, *Bioorthogonal Chemistry and Its Applications*, *Bioconjugate Chem.*, **2021**, 32, 2457–2479
 30. J. H. Choi, S. Kim, O. Kang, S. Y. Choi, J. Y. Hyun, H. S. Lee, I. Shin, *Selective fluorescent labeling of cellular proteins and its biological applications*, *Chem. Soc. Rev.*, **2024**, 53, 9446
 31. N. Z. Fantoni, A. H. El-Sagheer, T. Brown, *A Hitchhiker’s Guide to Click-Chemistry with Nucleic Acids*, *Chem. Rev.*, **2021**, 121, 7122–7154
 32. W. Yi, et.al., *Recent advances in developing active targeting and multifunctional drug delivery systems via bioorthogonal chemistry*, *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **2022**, 7, 386
 33. A. Chi-Lung Lee, J. L. Harris, K. K. Khanna, J.-H. Hong, *A Comprehensive Review on Current Advances in Peptide Drug Development and Design*, *Int. J. Mol. Sci.*, **2019**, 20, 2383
 34. M. T. W. Lee, et. Al., *Next-generation disulfide stapling: reduction and functional re-bridging all in one*, *Chem. Sci.*, **2016**, 7, 799
 35. K. Pu, *Biosensors and Bioimaging*, *ChemBioChem*, **2019**, 20
 36. J. Li, K. Pu, *Development of organic semiconducting materials for deep-tissue optical imaging, phototherapy and photoactivation*, *Chem. Soc. Rev.*, **2019**, 48, 38–71
 37. Wen-Xiong Wang, *Bioimaging of metals in environmental toxicological studies: Linking localization and functionality*, *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.*, **2022**, 52, 3384–3414
 38. H. S. Lahoti, S.D. Jogdand, *Bioimaging: Evolution, Significance, and Deficit*, *Cureus*, **2022**, 14(9),

39. R. Salzer, *BIOMEDICAL IMAGING: Principles and Applications*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, **2012**
40. A. Verma, S. K. Gupta, *Chapter 5: "History and Techniques of Bioimaging", Magnetic Quantum Dots for Bioimaging*, CRC Press, **2023**
41. K. Deleńko i wsp., *Techniki bioobrazowania na poziomie komórkowym metody in situ, Postępy biologii komórki tom 40*, **2013** nr 3, 551-578
42. M. Baalman, et. al., *A Bioorthogonal Click Chemistry Toolbox for Targeted Synthesis of Branched and Well-Defined Protein-Protein Conjugates*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, 59, 12885-12893
43. M. Y. Berezin, S. Achilefu, *Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging*, *Chemical Reviews*, **2010**, 110, 5
44. M. Sameiro T. Goncalves, *Fluorescent Labeling of Biomolecules with Organic Probes*, *Chemical Review.*, **2009**, 109, 190
45. Q. Yu, M. Proia, A. Heikal, *Integrated biophotonics approach for noninvasive and multiscale studies of biomolecular and cellular biophysics*, *A. J. Biomed. Opt.*, **2008**, 13(4), 041315
46. K. Horisawa, *Specific and quantitative labeling of biomolecules using click chemistry*, *Front Physiol*, **2014**, 5, Article 457, doi: 10.3389/fphys.2014.00457
47. D. J. Stephens, V. J. Allan, *Light microscopy techniques for live cell imaging*, *Science* **300**, **2003**, 82–86
48. K. Ayyavoo, P. Velusamy, *Pyrene based materials as fluorescent probes in chemical and biological fields*, *New J. Chem.*, **2021**, 45, 10997–11017
49. T. Nagano, *Development of fluorescent probes for bioimaging applications*, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B: Phys. Biol. Sci.*, **2010**, 86, 837–847
50. S. J. Remington, *Fluorescent proteins: maturation, photochemistry and photophysics*, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2006**, 16, 714
51. L. Zhang, H. N. Patel, J. W. Lappe, R. M. Wachter, *Reaction Progress of Chromophore Biogenesis in Green Fluorescent Protein*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 4766
52. X. Li , Y. Zhou, L. Li, T. Wang, B. Wang, R. Che, Y. Zhai, J. Zhang, W. Li, *Metal selenide nanomaterials for biomedical applications*, *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, **2023**, 225
53. Z. Zeng, H. Gao, C. Chen, L. Xiao, K. Zhang, *Bioresponsive nanomaterials: recent advances in cancer multimodal imaging and imaging-guided therapy*, *Front. Chem.*, **2022**, 276
54. L. Chen, W. Zuo, Z. Xiao, Q. Jin, J. Liu, L. Wu, N. Liu, X. Zhu, *A carrier-free metal-coordinated dual-photosensitizers nanotheranostic with glutathione-depletion for fluorescence/photoacoustic imaging-guided tumor phototherapy*, *J. Colloid Interface Sci.*, **2021**, 600, 243–255
55. K. Renault, J. W. Fredy, P.-Y. Renard, C. Sabot, *Covalent Modification of Biomolecules through Maleimide-Based Labeling Strategies*, *Bioconj. Chem.*, **2018**, 29, 249
56. B. E. Kirkpatrick, K. S. Anseth, T. S. Hebner, *Diverse reactivity of maleimides in polymer science and beyond*, *Polymer International*, **2025**, 74, 4, 296-306
57. M. Aslam, M. S. Akhtar, H. N. Lim, J. H. Seo, Y. R. Lee, *Recent advances in the transformation of maleimides via annulation*, *Org. Biomol. Chem.*, **2025**, 23, 269-291

58. G. Ilayda, T. Oguzhan, A. Gokhan, S. Ufuk, S. Gunay, H. Durmaz, *Thiol-Dibromomaleimide Polymerization: A Simple Strategy for Easily Degradable and Modifiable Polythioether Synthesis*, *Macromolecules*, **2025**, 58, 8, 3906–3915
59. A. H. St. Amant, D. Lemen, S. Florinas, S. Mao, C. Fazenbaker, H. Zhong, H. Wu, C. Gao, R. J. Christie, J. R. de Alaniz, *Tuning the Diels–Alder Reaction for Bioconjugation to Maleimide Drug-Linkers*, *Bioconjugate Chem.*, **2018**, 29, 7, 2406–2414
60. D. P. Nair, M. Podgórski, S. Chatani, T. Gong, W. Xi, C. R. Fenoli, C. N. Bowman, *The Thiol-Michael Addition Click Reaction: A Powerful and Widely Used Tool in Materials Chemistry*, *Chem. Mater.*, **2014**, 26, 1, 724–744
61. S. D. Fontaine, R. Reid, L. Robinson, G. W. Ashley, D. V. Sant, *Long-Term Stabilization of Maleimide–Thiol Conjugates*, *Bioconjugate Chem.*, **2015**, 26, 1, 145–152
62. B. H. Northrop, S. H. Frayne, U. Choudhary, *Thiol–maleimide “click” chemistry: evaluating the influence of solvent, initiator, and thiol on the reaction mechanism, kinetics, and selectivity*, *Polym. Chem.*, **2015**, 6, 3415–3430
63. S. B. Gunnoo, A. Madder, *Chemical protein modification through cysteine*, *ChemBioChem*, **2016**, 17, 529–553
64. M. Salmain, N. Fischer-Durand, B. Rudolf, *Bioorthogonal Conjugation of Transition Organometallic Complexes to Peptides and Proteins: Strategies and Applications*, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2020**, 21–35
65. M. Davydova, G. D. Le Roi, P. Adumeau, B. M. Zeglis, *Synthesis and Bioconjugation of Thiol-Reactive Reagents for the Creation of Site-Selectively Modified Immunoconjugates*, *J. Vis. Exp.*, **2019**, 145
66. P. A. Szijj, et al. *Minireview: Addressing the retro-Michael instability of maleimide bioconjugates*, *Drug Discov Today: Technol*, **2018**, 30, 27–34
67. A. Bergamo, G. Sava, *Ruthenium complexes can target determinants of tumour malignancy*, *Dalton Trans.*, **2007**, 1267–72
68. G. I. Tezcan, O. Aslantruk, G. Sagdic, U. S. Gunay, *Thiol-Dibromomaleimide Polymerization: A Simple Strategy for Easily Degradable and Modifiable Polythioether Synthesis*, *Macromolecules*, **2025**, 58, 3906–3915
69. J. E. Barker, J. D. Tibbetts, C. T. J. Ferguson, Y. Xie, R. K. O'Reilly, *Substituted Maleimides: Self-Reportable Linkers and Tags in Bioconjugation*, *Materials Science, and Nanotechnology*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2024**, 43, 21;63
70. G. Chen, Y. Hua, C. Ou, X. Zhang, D. Mao, Z. Yang, M. Chen, *Nanostructure formation-induced fluorescence turn-on for selectively detecting protein thiols in solutions, bacteria and live cells*, *Chem. Comm.*, **2015**, 51, 10758–10761
71. L. M. Tedaldi, M. E. B. Smith, R. I. Nathani, J. R. Baker, *Bromomaleimides: new reagents for the selective and reversible modification of cysteine*, *Chem. Commun.*, **2009**, 6583–6585
72. F. F. Schumacher, M. Nobles, C. Ryan, M. E. B. Smith, A. Tinker, S. Caddick, J. R. Baker, *In Situ Maleimide Bridging of Disulfides and a New Approach to Protein PEGylation*, *Bioconjugate Chem.*, **2011**, 22, 132–136
73. Y. Chen, C. Dai, J. Han, Y. Xing, F. Yin, Z. Li, *Recent Chemical Biology Insights Towards Reversible Stapled Peptides*, *ChemBioChem.*, **2025**, 26

74. M. E. B. Smith, F. F. Schumacher, C. P. Ryan, L. M. Tedaldi, D. Papaioannou, G. Waksman, J. R. Baker, *Protein Modification, Bioconjugation, and Disulfide Bridging Using Bromomaleimides*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 1960–1965
75. F. F. Schumacher, J. P. M. Nunes, A. Maruani, V. Chudasama, M. E. B. Smith, K.A. Chester, J. R. Baker, S. Caddick, *Next generation maleimides enable the controlled assembly of antibody–drug conjugates via native disulfide bond bridging*, *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, 12, 7261–7269
76. M. Morais, J. P. M. Nunes, K. Karu, N. Forte, I. Benni, M. E. B. Smith, J. R. Baker, *Optimisation of the dibromomaleimide (DBM) platform for native antibody conjugation by accelerated post-conjugation hydrolysis*, *Org. Biomol. Chem.*, **2017**, 15, 2947–2952
77. M. P. Robin, P. Wilson, A. B. Mabire, J. K. Kiviahho, J. E. Raymond, D. M. Haddleton, R. K. O'Reilly, *Conjugation-Induced Fluorescent Labeling of Proteins and Polymers Using Dithiomaleimides*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135, 2875–2878
78. J. T. Husband, A. C. Hill, R. K. O'Reilly, *Utilizing functionalized bromomaleimides for fluorogenic conjugation and PEGylation of enzymes*, *Polym. Int.*, **2019**, 68, 1247–1254
79. S. Kong, X. Gao, Q. Wang, J. Jin, L. Qiu, M. Xie, *A Novel Dithiomaleimide-Based GalNAc-siRNA Conjugate Enabling Good siRNA Delivery and Traceability*, *Molecules*, **2023**, 28, 7184
80. G. Borkow, J. Gabbay, *Copper, an ancient remedy returning to fight microbial, fungal and viral infections*, *Curr. Chem. Biol.*, **2009**, 3, 272–278
81. Z. Huaizhi, N. Yuantao, *China's ancient gold drugs*, *Gold Bulletin*, **2001**, 34, 24–29
82. M. Spear, *Silver: an age-old treatment modality in modern times*, *Plastic. Surg. Nurs.*, **2010**, 30, 90–93
83. G. Jaouen et al., *12.08 Medicinal organometallic chemistry*, **2007**, Elsevier
84. C. X. Zhang, S. J. Lippard, *New metal complexes as potential therapeutics*, *Curr. Chem. Biol.*, **2003**, 7, 481–489
85. A. Bergamo, G. Sava, *Ruthenium complexes can target determinants of tumour malignancy*, *Dalton Trans.*, **2007**, 1267–72
86. C-H. Leung, S. Lin, H-J. Zhonga, D-L. Ma, *Metal complexes as potential modulators of inflammatory and autoimmune responses*, *Chem. Sci.*, **2015**, 6, 871–884
87. J. K. C. Abbott, B. A. Smith, T. M. Cook, Z.-L. Xue, *Chapter 10. Synthesis of Organometallic Compounds, Modern Inorganic Synthetic Chemistry*, Elsevier B.V, **2017**
88. J. Clayden, N. Greeves, S. Warren and P. Wothers, *Organic Chemistry*, Oxford University Press, **2001**
89. J. Zakrzewski, Wykład pt. „Wstęp do chemii metaloorganicznej metali przejściowych”, Łódź, **2020**
90. M. Fanelli, M. Formica, V. Fusi, L. Giorgi, M. Micheloni, P. Paoli, *New trends in platinum and palladium complexes as antineoplastic agents*, *Coord. Chem. Rev.*, **2016**, 310, 41–79
91. B. J. Pages, K. B. Garbutcheon-Singh, J. R. Aldrich-Wright, *Platinum intercalators of DNA as anticancer agents*, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2017**, 1613–1624
92. S. Top, G. Jaouen, A. Vessières, J. Abjean, D. Davoust, C. A. Rodger, B. G. Sayer, M. J. McGlinchey, *Chromium tricarbonyl complexes of estradiol derivatives:*

- defferentiation of α - and β -diastereoisomers using 1- and 2-dimensional NMR spectroscopy at 500 MHz*, *Organometallics*, **1985**, 4, 2143–2150
93. S. Top, J. Tang, A. Vessières, D. Carrez, C. Provot, G. Jaouen, *Ferrocenyl hydroxytamoxifen: a prototype for a new range of oestradiol receptor site-directed cytotoxics*, *Chem. Commun.*, **1996**, 0, 955-956
 94. E. Hillard, A. Vessieres, L. Thouin, G. Jaouen, C. Amatore, *Ferrocene-mediated proton-coupled electron transfer in a series of ferrocifen-type breast-cancer drug candidates*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 285-290
 95. A. Vessieres, C. Corbet, J. M. Heldt, N. Lories, N. Jouy, I. Laios, G. Leclercq, G. Jaouen, R. A. Toillon, *A ferrocenyl derivative of hydroxytamoxifen elicits an estrogen receptor-independent mechanism of action in breast cancer cell lines*, *J. Inorg. Biochem.*, **2010**, 104, 503-511
 96. M. Juszczak, M. Kluska, D. Wysokiński, K. Woźniak, *Anti-cancer properties of ruthenium compounds: NAMI-A and KP1019*, *Postepy Hig. Med. Dosw. (online)*, **2020**, 74, 12-19
 97. Q. Sun, Y. Li, H. Shi, Y. Wang, J. Zhang, Q. Zhang, *Ruthenium Complexes as Promising Candidates against Lung Cancer*, *Molecules*, **2021**, 26, 4389
 98. S. Katheria, *Ruthenium Complexes as Potential Cancer Cell Growth Inhibitors for Targeted Chemotherapy*, *ChemistrySelect.*, **2022**, 7
 99. J. Skiba, A. Kowalczyk, P. Sączek, T. Bernaś, D. Trzybiński, K. Woźniak, U. Schatzschneider, R. Czerwieniec, K. Kowalski, *Luminescent fac-[Re(CO)₃(phen)] carboxylato complexes with novel luminescent properties: A structure–property relationship study*, *New J. Chem.*, **2019**, 43, 573–583
 100. G. Gao, J. Li, Y. Zhang, Y. Chang, *Cellular Iron Metabolism and Regulation*, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **2019**, 1173, 21-32
 101. P.P. Arun et al., *Exploring Metal Complexes for Cancer Treatment: Mechanistic Insights and Therapeutic Potential*, *J. Organomet. Chem.*, **2025**, 1035, 123682
 102. B. A. Babgi, M. H. Abdellattif, M. A. Hussien, N. E. Eltayeb, *Exploring DNA-Binding and anticancer properties of benzoimidazolyl-ferrocene dye*, *J. Mol. Struct.*, **2019**, 1198, 126918
 103. V. Janka, D. Zatkan, V. Ladislav, P. Pal, P. Janka, M. Gabriela, *Some ferrocenyl chalcones as useful candidates for cancer treatment*, *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.*, **2015**, 51, 964–974
 104. P. Pigeon, Y. Wang, S. Top, F. Najlaoui, M.C. Garcia Alvarez, J. Bignon, M. J. McGlinchey, G. Jaouen, *A New Series of Succinimido-ferrociphenols and Related Heterocyclic Species Induce Strong Antiproliferative Effects, Especially against Ovarian Cancer Cells Resistant to Cisplatin*, *J. Med. Chem.*, 2017, 60, 8358–8368
 105. F. L. Eyase, H. M. Akala, J. D. Johnson, D. S. Walsh, *Inhibitory Activity of Ferroquine, versus Chloroquine, against western Kenya Plasmodium falciparum Field Isolates Determined by a SYBR Green I In Vitro Assay*, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **2011**, 85(6), 984–988
 106. S. Jing, X. Wu, D. S-H. Chan, S-C. Nao, J. Du, C-Y. Wong, J. Wang, C-H. Leung, W. Wang, *Luminescent iridium(III)–peptide bioconjugates for bioanalytical and biomedical applications*, *Inorg. Chem. Front.*, **2024**, 11, 3400–3417

107. V. Bhatt, *Chapter 8 – Metal Carbonyls, Essentials of Coordination Chemistry*, Elsevier, **2016**
108. N. Fischer-Durand, M. Salmain, B. Rudolf B., L. Jugé, V. Guérineau, O. Laprévotte, A. Vessières, G. Jaouen, *Design of a new multifunctionalized PAMAM dendrimer with hydrazide-terminated spacer arm suitable for metal-carbonyl multilabeling of aldehyde-containing molecules*, *Macromolecules*, **2007**, 40, 8568-8575
109. A. Varenne, A. Vessières, P. Brossier, G. Jaouen, *Application of the non-radioisotopic carbonyl metalloimmunoassay (CMIA) to diphenylhydantoin*, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **1994**, 84, 81-94
110. A. Varenne, A. Vessières, M. Salmain, P. Brossier, G. Jaouen, *Production of specific antibodies and development of a non-isotopic immunoassay for carbamazepine by the carbonyl metallo-immunoassay (CMIA) method*, *J. Immunol. Methods*, **1995**, 186, 195-204
111. A. Vessières, K. Kowalski, J. Zakrzewski, A. Stepien, M. Grabowski, G. Jaouen, *Synthesis of CpFe(CO)(L) complexes of hydantoin anions (Cp = η^5 -C₅H₅, L - CO, PPh₃), and the use of the 5,5-diphenylhydantoin anion complexes as tracers in the nonisotopic immunoassay CMIA of this antiepileptic drug*, *Bioconjugate Chem.*, **1999**, 10, 379-385
112. V. Philomin, A. Vessières, G. Jaouen, *New applications of carbonylmatalloimmunoassay (CMIA): a non-radioisotopic approach to cortisol assay*, *J. Immunol. Methods*, **1994**, 171, 201-210
113. A. Kubicka, E. Parfieniuk, E. Fornal, M. Palusiak, D. Lizińska, A. Gumieniczek and B. Rudolf, *Metallo carbonyl complexes: (η^5 -C₅H₅)M(CO)_n(η^1 -N-imidato) (M = Fe, Ru, Mo, W; n = 2, 3) as new photoactive CO-releasing molecules (CORMs)*, *J. Photochem. Photobiol., A*, **2018**, 351, 115–123
114. D. Wysokiński, P. Lewandowska, D. Zątak, M. Juszczak, M. Kluska, D. Lizińska, B. Rudolf, K. Woźniak, *Photoactive CO-releasing complexes containing iron– genotoxicity and ability in HO-1 gene induction in HL-60 cells*, *Toxicol. Res.*, **2019**, 8, 544
115. M. A. Wright, J. A. Wright, *PhotoCORMs: CO release moves into the visible*, *Dalton Trans.*, **2016**, 45, 6801-6811
116. S-S. Xue, Y. Pan, W. Pan, S. Liu, N. Li, B. Tang, *Bioimaging agents based on redox-active transition metal complexes*, *Chem. Sci.*, **2022**, 13, 9468–9484
117. A. Michael, *Base-promoted conjugate addition of carbon nucleophiles (donors) to activated unsaturated systems (acceptors)*, *J. Prakt. Chem.*, **1887**, 35, 349
118. B. Rudolf, J. Zakrzewski, *(η^5 -cyclopentadienyl)Fe(CO)₂ -complex of maleimide anion: An organometallic carbonyl probe for biomolecules containing HS groups*, *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35, 9611
119. B. Rudolf, J. Zakrzewski, *Addition of imidazoles and aminoacids to the ethylenic bond in (η^5 -C₅H₅) Fe(CO)₂(η^1 -N-maleimidato)*, *J. Organomet. Chem.*, **1996**, 522, 313-315
120. B. Rudolf et al., *The phospho-Michael addition of dimethyl- and diphenylphosphites to the η^1 -N-maleimidato ligand: Inhibition of serine hydrolases by half-sandwich metallo carbonyl azaphosphonates*, *J. Organomet. Chem.*, **2009**, 694, 908–915

121. B. Rudolf et al., *Synthesis and characterization of new M(II) carbonyl complexes (M $\frac{1}{4}$ Fe or Ru) including an h1 -N-maleimidato ligand. Reactivity studies with biological thiols*, J. of Organomet. Chem., **2016**, 801, 101-110
122. D. Jamroz, N. Fischer-Durand, M. Palusiak, S. Wojtulewski, S. Jarzyński, M. Stępniewska, M. Salmain, B. Rudolf, *Inverse electron-demand Diels-Alder (iEDDA) bioorthogonal conjugation of half-sandwich transition metallocarbonyl entities to a model protein*, Appl. Organometal. Chem., **2020**, 34, 5507
123. A. Kosińska, S. Wojtulewski, M. Palusiak, P. Tokarz, B. Rudolf, *A Useful Synthetic Route to N-Nonsubstituted Succinimides via Light-Induced Degradation of Metallocarbonyl Complexes*, Organometallics, **2021**, 40, 6, 663–673
124. S. Das, et al., *Synthesis, anticancer activity, and molecular docking of half-sandwich iron(II) cyclopentadienyl complexes with maleimide and phosphine or phosphite ligands*, Scientific Reports, **2024**, 14, 5634
125. B. Rudolf, M. Salmain, E. Fornal, A. Rybarczyk-Pirek, *Metallocarbonyl complexes of bromo- and dibromomaleimide: synthesis and biochemical application*, Appl. Organomet. Chem., **2012**, 26, 80–85
126. T. M. Figueira-Duarte, K. Müllen, *Pyrene-based materials for organic electronics*, Chem. Rev., **2011**, 111, 7260–7314
127. J. M. Casas-Solvas, J. D. Howgego, A. P. Davis, *Synthesis of substituted pyrenes by indirect methods*, Org. Biomol. Chem., **2014**, 12, 212–232
128. A. Wrona-Piotrowicz et al., *Pyrene fluorophores bearing two carbonyl groups in 1,2-positions: Synthesis and photophysical properties of pyrene-1,2-dicarboximides and a pyrene-1,2-dicarboxamide*, J. Photochem. Photobiol. A Chem., **2016**, 330, 15-21
129. J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Third Edition, Springer, Singapore **2006**, ISBN-13: 978-0387-31278-1
130. L. Sobczyk, A. Kiszka, K. Gatner, A. Koll, *Eksperymentalna chemia fizyczna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa **1982**, ISBN: 83-01-00390-1
131. P. Suppan, *Chemia i światło*, Wydawnictwo Naukowe PWN, **1997**, ISBN 83-01-12375-3
132. K. Zhang et al., *Theoretical Study of the Mechanism of Aggregation-Caused Quenching in Near-Infrared Thermally Activated Delayed Fluorescence Molecules: Hydrogen-Bond Effect*, J. Phys. Chem. C, **2019**, 123, 40, 24705–2471
133. A. Wrona-Piotrowicz, A. Makal, J. Zakrzewski, *Triflic Acid-Promoted Adamantylation and tert-Butylation of Pyrene: Fluorescent Properties of Pyrene-Decorated Adamantanes and a Channeled Crystal Structure of 1,3,5-Tris(pyren-2-yl)adamantane*, J. Org. Chem., **2020**, 85, 17, 11134-11139
134. P. L. Paris, J. M. Langenhan, E. T. Kool, *Probing DNA sequences in solution with a monomer-excimer fluorescence color change*, Nucleic Acids Res., **1998**, 26, 3789
135. J. Chao, M. Li, Y. Zhang, C. Yin, F. Huo, *A simple fluorescent pH probe and its application in cells*, Chem. Pap., **2019**, 73, 1481–1488
136. Y. Fujiwara, Y. Amao, *Optical oxygen sensor based on controlling the excimer formation of pyrene-1-butylic acid chemisorption layer onto nano-porous anodic oxidized aluminium plate by myristic acid*, Sens. Actuators B: Chem., **2003**, 89, 58-61

137. S. I. Hazarika, B. Dolai and A. K. Atta, *Water compatible triazole linked pyrene-C1-glucosyl fluorescent sensor for Au³⁺ and living cell imaging studies*, J. Mol. Struct., **2020**, 1202, 127272
138. C. C. Nagel, J. G. Bentsen, J. L. Dektar, et al. US Patent 1995, 5, 409, 666
139. P. Thirupathi and K. H. Lee, *A ratiometric fluorescent detection of Zn(II) in aqueous solutions using pyrene-appended histidine*, Bioorg. Med. Chem. Lett., **2013**, 23, 6811–6815
140. Y. Upadhyay, T. Anand, L. T. Babu, P. Paira, G. Crisponi, S. K. Ashok Kumar, R. Kumar and S. K. Sahoo, *Three-in-one type fluorescent sensor based on a pyrene pyridoxal cascade for the selective detection of Zn(ii), hydrogen phosphate and cysteine*, Dalton Trans., **2018**, 47, 742–749
141. Y. Zhou, C. Y. Zhu, X. S. Gao, X. Y. You and C. Yao, *Hg²⁺-Selective Ratiometric and “Off-On” Chemosensor Based on the Azadiene–Pyrene Derivative*, Org. Lett., **2010**, 12, 2566–2569
142. C. P. Toseland, *Fluorescent labeling and modification of proteins*, J. Chem. Biol., **2013**, 6, 85–95
143. J. Chao, M. Lil, Y. Zhang, C. Yin, F. Huo, *A Fluorescent Probe Based on Pyrene Ring for Detecting Cys and its Application in Biology*, J. Fluoresc., **2019**, 29, 1241–1248
144. M. Naya, C. Sato, *Pyrene Excimer-Based Fluorescent Labeling of Cysteines Brought into Close Proximity by Protein Dynamics: ASEM-Induced Thiol-Ene Click Reaction for High Spatial Resolution CLEM*, Int. J. Mol. Sci., **2020**, 21, 7550
145. Z. Duan, Y. J. Gao, Z. Qiao, S. Qiao, Y. Wang, C. Hou, L. Wang, H. Wang, *pH-Sensitive Polymer Assisted Self-Aggregation of Bis(pyrene) in Living Cells In Situ with Turn-On Fluorescence*, Nanotechnology, **2015**, 26, 355703
146. A. Jana, B. Saha, M. Iqbal, S. K. Ghosh, N. D. P. Singh, *1-(Hydroxyacetyl)pyrene A New Fluorescent Phototrigger for Cell Imaging and Caging of Alcohols, Phenol and Adenosine*, Photochem. Photobiol. Sci., **2012**, 11, 1558–1566
147. C. S. Abeywickrama, K. J. Wijesinghe, C. B. Plescia, L. S. Fisher, T. Goodson, R. V. Stahelin and Y. Pang, *A pyrene-based two-photon excitable fluorescent probe to visualize nuclei in live cells*, Photochem. Photobiol. Sci., **2020**, 19, 1152–1159
148. Y. Qiao, Z. Yao, W. Ge, L. Zhang, H.C. Wu, *Rapid and visual detection of heparin based on the disassembly of polyelectrolyte-induced pyrene excimers*, Org. Biomol. Chem., **2017**, 15, 2569-2574
149. Z. Zhu, W. Li, C. Yang, *Switching monomer/excimer ratiometric fluorescence to time-resolved excimer probe for DNA detection: A simple strategy to enhance the sensitivity*, Sens. Actuators, B, **2016**, 224, 31–36
150. T. Ono, S. Wang, C. Koo, L. Engstrom, S. S. David, E. T. Kool, *Direct Fluorescence Monitoring of DNA Base Excision Repair*, Angew. Chem. Int. Ed., **2012**, 51, 1689–1692
151. B. R. Babu, J. Wengel, *Universal hybridization using LNA (locked nucleic acid) containing a novel pyrene LNA nucleotide monomer*, Chem. Comm., **2001**, 20, 2114–2115

152. M. E. Østergaard, P. J. Hrdlicka, *Pyrene-functionalized oligonucleotides and locked nucleic acids (LNAs): Tools for fundamental research, diagnostics, and nanotechnology*, Chem. Soc. Rev., **2011**, 40, 5771–5788
153. Z. He, J. Wu, B. Qiao, H. Pei, Q. Xia, Q. Wu, H. Ju, *Target Catalyzed Assembly of Pyrene Labelled Hairpins for Exponentially Amplified Biosensing*, ACS Appl. Bio Mater., **2020**, 3, 5342-5349
154. A. Ghosh, A. Sengupta, A. Chattopadhyay, D. Das, *Lysine Triggered Ratiometric Conversion of Dynamic to Static Excimer of a Pyrene Derivative: Aggregation-Induced Emission, Nanomolar Detection and Human Breast Cancer Cell (MCF7) Imaging*, Chem. Commun., **2015**, 51, 11455–11458
155. M. Shellaiah, K. W. Sun, *Pyrene-Based AIE Active Materials for Bioimaging and Theranostics Application*, Biosensors, **2022**, 12, 550
156. Islam, Z. Hu, Q. Wang, C. Redshaw, X. Feng, *Pyrene-based aggregation-induced emission luminogens and their applications*, Mater. Chem. Front., **2019**, 3, 762-781
157. C. Zhang, X. Pan, S. Cheng, A. Xie, W. Dong, *Pyrene Derived Aggregation-Induced Emission Sensor for Highly Selective Detection of Explosive CL-20*, J. Luminescence, **2021**, 233, 117871
158. X. Yang, Z. Zhao, H. Ran, J. Zhang, L. Chen, R. Han, X. Duan, H. Sun, J. Y. Hu, *New Pyrene-Based Butterfly-Shaped Blue AIEgens: Synthesis, Structure, Aggregation-Induced Emission and Their Nondoped Blue OLED*, Dye. Pigment., **2020**, 173, 107881
159. R. Kumari, D. Sunil, *Emerging Trends in Aggregation Induced Emissive Luminogens as Bacterial Theranostics*, J. Drug Target., **2021**, 29, 793–807

DOROBEK NAUKOWY:

Projekty naukowe:

- Kierownik projektu „Znaczniki luminescencyjne do znakowania biomolekuł”, (IDUB edycja II 2022) Doktoranckie Granty Badawcze Uniwersytetu Łódzkiego, 4/DGB/2022, 02/2023-05/2025

Staż naukowe:

- ERASMUS+ PRAKTYKI - staż na Sorbonne University, Institut Parisien de Chimie Moléculaire, Chembio Team, tytuł projektu: „Labelling biomolecules with fluorescent labels”, 1/05-31/07/2023, Paryż, Francja,
- Staż naukowy w PPSM Laboratory, École Normale Supérieure Paris-Saclay, „Photophysical study of pyrene-based dyes”, 18-26/11/2023, Gif-sur-Yvette, Francja,
- ERASMUS+ PRAKTYKI - staż na Sorbonne University, Institut Parisien de Chimie Moléculaire, Chembio Team, tytuł projektu: „Labelling biomolecules with metallobromide and fluorescent labels”, 20/05-20/07/2024, Paryż, Francja,
- Staż naukowy w PPSM Laboratory, École Normale Supérieure Paris-Saclay, 16-21/09/2024, Gif-sur-Yvette, Francja,
- Staż naukowy realizowany w ramach stypendium mobilnościowego otrzymanego w ramach konkursu NAWA PROM - krótkookresowa wymiana akademicka w PPSM Laboratory, École Normale Supérieure Paris-Saclay, 17-30/03/2025, Gif-sur-Yvette, Francja.

Publikacje naukowe, których jestem współautorem:

- Ciechańska M., Wrona-Piotrowicz A., Koprowska K., Makal A., Zakrzewski J.: „*Electrophile-Dependent Reactivity of Lithiated N-Benzylpyrene-1-Carboxamide*”, *Molecules*, **2022**, 27(12), 1-12, DOI:10.3390/molecules27123930,
- Koprowska, K., Fischer-Durand, N., Michlewska, S., Gapińska, M., Grodzicka, M., Makal, A., Krzeszczakowska, J., Wrona-Piotrowicz, A., Lignières, L., Salmain, M., & Rudolf, B., „*Metallobromide bromomaleimide derivatives for thiol bioconjugation and disulfide bridging: spectroscopic and biological properties*”. *Dalton Transactions*, **2025**, 54, 16864-16875, <https://doi.org/10.1039/d5dt0237>.

Udział w konferencjach naukowych:

a) Wystąpienia posterowe konferencje krajowe:

- Zjazd Zimowy Sekcji Studenckiej PTChem - poster - „Synteza nowych pochodnych 2,7-diadamantylopirenu”, 29/01/2022, Poznań, Polska,
- IX Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii - poster - „Synteza nowych pochodnych 2,7-diadamantylopirenu”, 19-20/05/2022, Łódź, Polska,
- 64. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego - poster - „Synteza i właściwości nowych pochodnych 2,7-diadamantylopirenu”, 11-16/09/2022, Lublin, Polska,
- Zjazd Zimowy Sekcji Studenckiej PTChem - poster - „Synteza, właściwości fotofizyczne oraz aktywność biologiczna 2,7-diadamantylo-1-karbotioamidów i karboamidów”, 10/12/2022, Opole, Polska,
- X Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii - poster - „Nowe znaczniki luminescencyjne do znakowania biomolekuł”, 18-19/05/2023, Łódź, Polska,
- Zjazd Zimowy Sekcji Studenckiej PTChem - poster - „Synteza oraz właściwości fotofizyczne nowych znaczników luminescencyjnych”, 9/12/2023, Łódź, Polska,
- XI Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii - poster - „Zastosowanie znaczników metalokarbonylowych i fluorescencyjnych do znakowania biomolekuł”, 16-17/05/2024, Łódź, Polska,
- Zjazd Zimowy Sekcji Studenckiej PTChem - poster - „Bioimaging with fluorescent labels - photophysical properties and bioactivity”, 14/12/2024, Lublin, Polska,
- KOSAT - Konwersatorium Spektrometrii Analitycznej - poster - „Zastosowanie metod spektroskopowych do badania właściwości fotofizycznych znaczników fluorescencyjnych”, 10-12/09/2025, Białystok, Polska.

b) Wystąpienia posterowe konferencje międzynarodowe:

- „XIVth International Mini-Symposium on Current Problems in Organic Chemistry” - poster „Synthesis, photophysical studies and biological activity od 2,7-diadamantylopyrene-1-carbothioamides and carboxamides”, 27/10/2022, Lodz, Poland,
- XXIII International Symposium on „Advances in Chemistry of Heteroorganic Compounds” - poster „Synthesis, photophysical studies and biological activity od 2,7-diadamantylopyrene-1-carbothioamides and carboxamides”, 28/10/2022, Lodz, Poland,

- ISBOMC - International Symposium on Bioorganometallic Chemistry - poster - „Organometallic markers for biomolecules imaging”, 18-21/09/2023, Braunschweig, Germany,
 - XXIV International Symposium on „Advances in Chemistry of Heteroorganic Compounds”, poster - „Organometallic markers for biomolecules imaging”, 24/11/2023, Lodz, Poland,
 - XXV International Symposium on „Advances in Chemistry of Heteroorganic Compounds”, poster - „New approach for bioimaging with fluorescent and organometallic labels”, 21-22/11/2024, Lodz, Poland,
 - Japan-France Workshop on Photo-Electro-Responsive Molecules & Materials (PERMolMat), poster - „New fluorescent labels - photophysical properties and bioactivity”, 17-19/03/2025, Gif-sur-Yvette, France,
 - XXIV International Symposium on „Advances in Chemistry of Heteroorganic Compounds”, poster - „New methods of labelling biomolecules with fluorescent and organometallic labels and their spectroscopic detection”, 21/11/2025, Lodz, Poland.
- c) Wystąpienia ustne:
- "Na pograniczu chemii i biologii XVIII Ogólnopolskie Seminarium dla Doktorantów i Studentów", wystąpienie ustne - „Synteza, właściwości fotofizyczne i aktywność biologiczna *N*-podstawionych amidów 2,7-diadamantylopirenowych” - 12-15/06/2022, Smardzewice, Polska,
 - VII Ogólnopolska Konferencja Naukowa Chemia-Biznes-Środowisko „ChemBiŚ” 2025, prezentacja - „Zastosowanie nowych fluoroforów pirenowych do znakowania biomolekuł”, 7-8/06/2025, Gdańsk, Polska.

Wyróżnienia i nagrody:

- Nagroda przyznana przez Gdańskie Towarzystwo Naukowe za najlepszą prezentację badań własnych: prezentacja - „Zastosowanie nowych fluoroforów pirenowych do znakowania biomolekuł”, VII Ogólnopolska Konferencja Naukowa Chemia-Biznes-Środowisko „ChemBiŚ” 2025, 7-8/06/2025, Gdańsk, Polska,
- Wyróżnienie Łódzkiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Chemicznego za wyróżniające się wyniki podczas prezentacji plakatowej, XXVI International Symposium „Advances in the Chemistry of Heteroorganic Compounds”, 21/11/2025, Łódź, Polska.

Wykład na zaproszenie:

- „Fluorescent labels for bioimaging” - Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, 9/02/2024, Warszawa, Polska.

Warsztaty i szkolenia:

- Obsługa spektrofotometru IR, rejestracja oraz obróbka widm w podczerwieni - szkolenie z zakresu obsługi spektrofotometru IR oraz obróbki widm IR - 29/10/2021, Wydział Chemii UŁ, Pracownia Spektroskopii Molekularnej (PSM),
- Udział w warsztatach naukowych - „Metody spektroskopowe w projektowaniu i otrzymywaniu leków oraz ich nośników”, 22/04/2022, Uniwersytet w Białymstoku, Polska,
- Analiza jakościowa technikami chromatograficznymi - obsługa chromatografu HPLC (Dodatkowo: „Praktyczne aspekty chromatografii cieczowej”, Merck Life Sciences, 14/05/2024, Łódź, Polska,
- Udział w szkoleniu „Bezpieczeństwo w użytkowaniu butli z gazami sprężonymi na przykładzie gazów palnych, utleniających i neutralnych”, Air Liquide Polska, 11/09/2025,
- Udział w szkoleniu „Digestion of food and other organic samples for element analysis with ICP”, Anton Paar Poland, 11/09/2025.

Dodatkowa aktywność naukowa:

- Udział w organizacji krajowej konferencji doktoranckiej - członkini komitetu organizacyjnego IX, X oraz XI Łódzkiego Sympozjum Doktorantów Chemii (ŁSDCh), Wydział Chemii UŁ,
- Działalność naukowa realizowana w ramach członkostwa w Naukowym Kole Chemii Kosmetycznej Uniwersytetu Łódzkiego (NKChK) w latach 2021-2026. Pomoc w organizowaniu i prowadzeniu warsztatów w laboratorium w ramach działalności NKChK popularyzujących naukę wśród szkół podstawowych i średnich. Jako członkini NKChK byłam zaangażowana w pomoc przy organizacji III Studenckiej Konferencji Kosmetycznej (Wydział Chemii UMCS, Lublin, 23/05/2025). Brałam udział w organizacji warsztatów w ramach wydarzeń, tj.: „XXII Festiwal Nauki, Techniki I Sztuki w Łodzi”, „III Noc Naukowców Ec1”, „80 kół na 80-lecie Łodzi Akademickiej”,

- Czynny udział w przygotowaniu i prowadzeniu części eksperymentalnej wykładów z cyklu *Akademia Ciekawej Chemii* w latach 2021-2026 mających na celu popularyzację nauki wśród uczniów szkół średnich,
- Aktywny udział w organizacji wydarzeń mających na celu promocję Wydziału Chemii i Uniwersytetu Łódzkiego - pomoc w organizacji *Dnia Otwartego Wydziału Chemii* oraz *Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska* (5/04/2024 oraz 28/03/2025).