

WIADOMOŚCI *chemiczne*



2017

(71)

9-10

(843-844)



CZASOPISMO POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO

Publikacja dotowana ze środków MNiSW

RADA REDAKCYJNA

RYSZARD ADAMIAK, IRENA BARANOWSKA, ANDRZEJ BARAŃSKI,
BOGUSŁAW BUSZEWSKI (PRZEWODNICZĄCY), TADEUSZ GORECKI,
MIĘTEK JARONIEC, ANATOL KOJŁO, TADEUSZ M. KRYGOWSKI,
JERZY LESZCZYNSKI, KRZYSZTOF MATYJASZEWSKI, PIOTR PANETH,
JANUSZ PAWLISZYN, K. MICHAŁ PIETRUSEWICZ, DARIUSZ POGOCKI,
MAREK POTRZEBOWSKI, SŁAWOMIR RUBINSZTAJN, GRZEGORZ SCHROEDER,
ANDRZEJ W. SOKALSKI, ARTUR P. TERZYK

KOMITET REDAKCYJNY

MARCIN DRĄG, ADAM JEZIERSKI, LESZEK KĘPIŃSKI,
LUDWIK KOMOROWSKI, WITOLD RYBA-ROMANOWSKI, SŁAWOMIR SZAFERT,
ANDRZEJ TROCHIMCZUK, KAZIMIERA WILK

REDAKTOR NACZELNY

ZDZISŁAW LATAJKA

SEKRETARZ REDAKCJI

BEATA ŚWIĄTEK-TRAN
BARBARA LATKO (FINANSE)
KAZIMIERA LUKJAN (KOLPORTAŻ)

Korespondencję należy kierować pod adresem:

Redakcja „Wiadomości Chemiczne”
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław
tel.: 71 375 73 89, tel./fax: 71 322 14 06
e-mail: wchem@wchuwr.pl

INTERNET

<http://www.wchuwr.pl/wiadchem.htm> (English abstracts)
<http://wwwdbc.wroc.pl> (pełne teksty publikacji od roku 2006)

„Wiadomości Chemiczne” są wydawane w ramach serii *Acta Universitatis Wratislaviensis*

© Copyright by Redakcja „Wiadomości Chemiczne”, Wrocław 2017
pISSN 0043-5104
eISSN 2300-0295

Maszynopis niniejszego numeru przekazano Wydawcy w listopadzie 2017

Przygotowanie do druku i druk:
Firma Wydawnicza K2, e-mail: k2@druk-k2.pl

MATERIAŁY KOMPOZYTOWE MOF-GRAFEN

MOF-GRAPHENE COMPOSITES

Barbara Szczęśniak*, Jerzy Choma*, Mietek Jaroniec[#]

* Wojskowa Akademia Techniczna, 00-908 Warszawa
ul. Gen. S. Kaliskiego 2

[#] Department of Chemistry and Biochemistry, Kent State University,
Kent 44-242 OH, USA

*e-mail: jerzy.choma@wat.edu.pl

Abstract

Wprowadzenie

1. Struktury MOF-grafen

2. Adsorpja CO₂ i lotnych związków organicznych na kompozytach MOF-grafen

3. Kompozyty MOF-grafen do adsorpcji wodoru i metanu

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Mgr inż. Barbara Szczęśniak urodziła się w 1991 r. Studiowała chemię w specjalności materiały niebezpieczne i ratownictwo chemiczne na Wydziale Nowych Technologii i Chemii Wojskowej Akademii Technicznej w Warszawie. Podczas realizacji pracy magisterskiej badała właściwości adsorpcyjne mikroporowatych węgli aktywnych. Studia ukończyła w 2015 r. z oceną 4,5. W tym samym roku rozpoczęła studia doktoranckie w Wojskowej Akademii Technicznej pod opieką naukową prof. dr hab. inż. J. Chomy. Zajmuje się otrzymywaniem i badaniem właściwości adsorpcyjnych materiałów grafenowych oraz materiałów kompozytowych MOF-grafen. Jest współautorem 4 artykułów naukowych.



Prof. dr hab. inż. Jerzy Choma urodził się w 1952 r. w Lublinie. Studiował chemię w Wojskowej Akademii Technicznej w Warszawie. Stopień doktora i doktora habilitowanego uzyskał odpowiednio w 1981 i 1985 r., a tytuł profesora w 1993 r. Aktualnie jest zatrudniony na stanowisku profesora zwyczajnego w Instytucie Chemii Wojskowej Akademii Technicznej w Warszawie i równocześnie pełni obowiązki dyrektora tego instytutu. W latach 2002–2012 pracował także na Uniwersytecie Jana Kochanowskiego w Kielcach. Jego główne zainteresowania naukowe dotyczą: teoretycznego opisu adsorpcji pojedynczych gazów na mikro i mezoporowatych adsorbentach, eksperymentalnego charakterystowania równowag adsorpcyjnych na granicy faz ciało stałe–gaz i ciało stałe – ciecz, otrzymywania i modyfikacji impregnowanych węgli aktywnych, otrzymywania i adsorpcyjnej charakterystyki właściwości strukturalnych i powierzchniowych nanoporowatych uporządkowanych adsorbentów krzemionkowych (MCM-41, MCM-48, SBA-15), otrzymywania i charakterystyki właściwości adsorpcyjnych uporządkowanych mezoporowatych materiałów węglowych z wykorzystaniem

„twardych” i „miękkich” matryc. Specjalizuje się również w otrzymywaniu i charakteryzacji fizykochemicznych właściwości nanostruktur typu rdzeń–otoczka (core–shell) składających się z węglowego lub krzemionkowego rdzenia i złotej lub srebrnej otoczki. Ostatnio jego grupa badawcza zajmuje się otrzymywaniem i charakteryzacją fizykochemicznych właściwości, ze szczególnym uwzględnieniem właściwości adsorpcyjnych względem CO_2 , CH_4 , H_2 i C_6H_6 , nanoporowatych materiałów węglowych otrzymanych z prekursorów polimerowych (projekt Narodowego Centrum Nauki 2014–2017) oraz nanoporowatych materiałów grafenowych i sieci metalo-organicznych (projekt Narodowego Centrum Nauki 2017–2020). Jest autorem i współautorem ponad 350 artykułów naukowych i blisko 150 komunikatów i referatów na konferencjach oraz współautorem dwóch monografii i kilku obszernych artykułów monograficznych. Jego 161 prac (według bazy Web of Science) było cytowanych łącznie ponad 1700 razy. H-index wynosi 23. Od 1986 r. ściśle współpracuje naukowo z prof. Mieczysławem Jaroncem z Kent State University, Kent, Ohio, USA.



Prof. dr hab. Mieczysław Jaroniec pracuje obecnie w Zakładzie Chemii i Biokimii, Kent State University, Ohio, USA. Jego główne zainteresowania naukowe dotyczą chemii zjawisk powierzchniowych, w szczególności adsorpcji na granicy faz gaz/ciało stałe i ciecz/ciało stałe oraz chemii materiałów nanoporowatych ze szczególnym uwzględnieniem nanomaterialów o uporządkowanych i hierarchicznych strukturach do zastosowań w ochronie środowiska (np. usuwanie jonów metali ciężkich, fotokatalityczna degradacja toksycznych związków organicznych, adsorpcja dwutlenku węgla) i do magazynowania/wytwarzania energii (kondensatory, baterie). Obecnie grupa Prof. Jarońca koncentruje się na syntezie, modyfikacji i charakterystyce różnorodnych materiałów o uporządkowanych strukturach nanoporowatych, w szczególności krzemionkach, krzemionkach z grupami organicznymi, tlenkach metali (np. glinu, tytanu), żywicach fenolowych, węglach oraz materiałach kompozytowych. Prof. Jaroniec jest autorem i współautorem ponad 1000 artykułów naukowych, współautorem monografii nt. fizycznej adsorpcji na powierzchniach niejednorodnych oraz wielu obszernych artykułów monograficznych. Należy do najczęściej cytowanych chemików w zakresie chemii nanomateriałów. Ponadto jest lub był członkiem komitetów redakcyjnych w wielu czasopismach, oraz otrzymał wiele nagród i wyróżnień, miedzy innymi tytuł Profesora Honorowego Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie oraz doktoraty honoris causa Uniwersytetu im. Mikołaja Kopernika w Toruniu oraz Wojskowej Akademii Technicznej w Warszawie.

ABSTRACT

The effective capture of harmful gases and clean energy sources are of great importance for protection of the environment. In this regard, it is possible to take advantage of the MOF-graphene composites to develop new technologies for environmental and energy-related applications. These composites attract a great attention around the world due to their higher adsorption affinity toward CO₂, volatile organic compounds (VOCs), H₂ and CH₄ reported in comparison to the parent MOFs. Integration of MOFs with graphene nanosheets can be a very effective strategy not only to improve their adsorption performance but also to generate new chemical and physical properties that are not present in MOFs alone. In this review we present the progress in the field of gas capture/storage using MOF-graphene composites with special attention on the correlation between composition, structure and adsorption properties.

Keywords: MOF-graphene composites, gas adsorption and storage, CO₂, VOCs, H₂, CH₄ adsorbents

Słowa kluczowe: kompozyty MOF-grafen; adsorpcja i magazynowanie gazów, adsorbenty CO₂, VOCs, H₂, CH₄

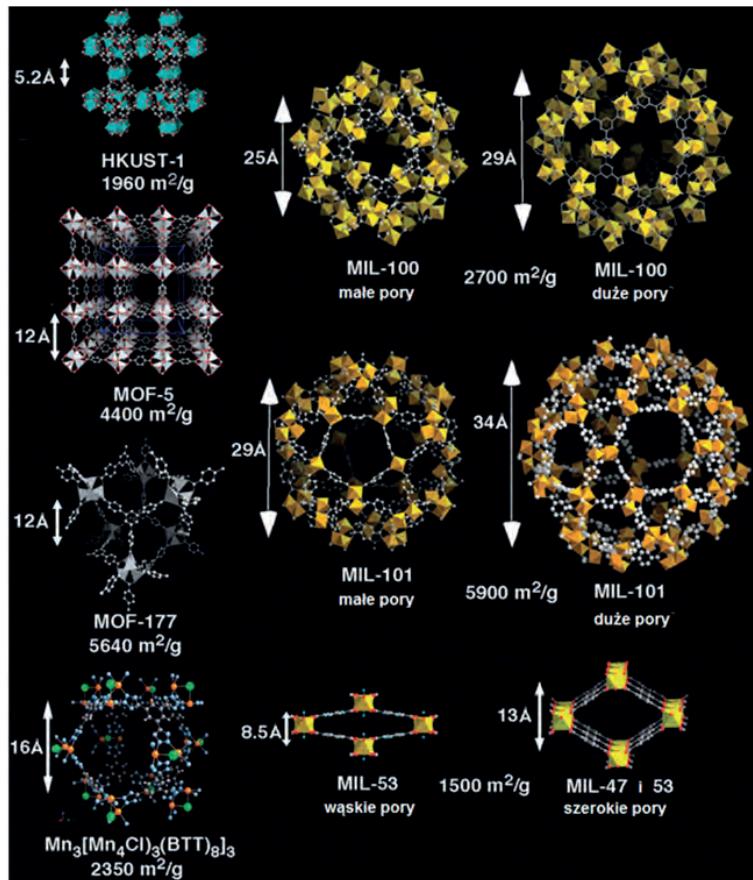
WPROWADZENIE

Nieustannie rośnie zapotrzebowanie na energię. Z tego względu pojawiają się uzasadnione obawy co do wyczerpania się dostępnych rezerw paliw kopalnych. Dodatkowo, problemy dotyczące środowiska naturalnego, głównie ocieplenie klimatu i co się z tym wiąże, topnienie lodowców i podnoszenie się poziomu wód oceanicznych wymagają bezzwłocznych rozwiązań. Jednym z nich może być wdrażanie bezpiecznych technologii magazynowania i konwersji energii, w których wykorzystywane są tzw. czyste nośniki energii, między innymi wodór i metan. Wodór jest uważany za najbardziej ekologiczny nośnik energii, gdyż produktem jego spalania jest czysta woda. Natomiast metan jest paliwem oficie występującym w przyroście, a jego spalanie prowadzi co prawda do powstawania dwutlenku węgla i pary wodnej, ale nie tworzą się inne groźne dla środowiska substancje. Wykorzystując materiały porowate, możliwe jest magazynowanie energii oraz pochłanianie szkodliwych gazów, które w procesach przemysłowych i działalności gospodarczej człowieka, w dużych ilościach emitowane są do atmosfery. Z tego względu rozwój wiedzy o nowych, zaawansowanych adsorbentach jest bardzo istotny. Wiele różnych materiałów porowatych proponuje się do adsorpcji gazów. Na szczególną uwagę zasługują węgle aktywne [1–3], zeolity [4–6], uporządkowane materiały krzemionkowe [6–8] i węglowe [9–11], struktury metalo-organiczne [12, 13] oraz materiały grafenowe [14, 15]. W porównaniu z tradycyjnymi, nieorganicznymi materiałami porowatymi, struktury metalo-organiczne (ang. *metal-organic frameworks*, MOFs) charakteryzują się zazwyczaj bardzo dobrze rozwiniętą porowatością, przestrzeniem jednorodnym rozproszeniem komponentów, organiczno-nieorganiczną naturą, krystaliczną strukturą oraz kontrolowanym wymiarem porów. Dodatkowym atutem tych materiałów są duże możliwości ich modyfikacji, a ponadto łączenie ich z innymi klasami materiałów [16–21]. Natomiast piroliza MOF-ów w wysokich temperaturach prowadzi do uzyskania nowych nieorganicznych struktur, tj. porowatych węgli, metali, tlenków metali czy wieloskładnikowych kompozytów [17, 22–25]. Dzięki takim modyfikacjom i procesom przetwórczym możliwości wykorzystania MOF-ów znacznie się poszerzają. Znakomite właściwości adsorpcyjne MOF-ów, ich kompozytów i pochodnych, opisywane w literaturze, inspirują licznych badaczy do poszukiwań wśród tych materiałów, adsorbentów do różnorodnych zastosowań, np. w przemyśle motoryzacyjnym, ogniwach paliwowych czy stacjonarnych stacjach zasilających [26–30].

Niniejsza przeglądowa praca poświęcona jest MOF-om i materiałom hybrydowym MOF-grafen w zastosowaniach adsorpcyjnych do pochłaniania CO₂ i VOCs oraz do magazynowania H₂ i CH₄. Mamy nadzieję, że prezentowane tu opisy materiałów hybrydowych oraz cytowana literatura zainspirują chemików i inżynierów materiałowych do dalszych badań nad nowymi materiałami MOF i ich kompozytami. Przede wszystkim mamy na uwadze dążenie do uzyskania jak najlepszych właściwości adsorpcyjnych tych materiałów i zastosowanie ich w procesach pochłaniania i magazynowania różnych gazów.

1. STRUKTURY MOF-GRAFEN

Struktury metalo-organiczne (MOF-y) są materiałami krystalicznymi składającymi się z jonów metali i łączników organicznych, czyli są materiałami nieorganiczno-organicznymi. Struktura, a w konsekwencji i właściwości tych materiałów, mogą być stosunkowo łatwo modyfikowalne poprzez dobór odpowiednich kationów metali i związków organicznych. Ponadto możliwa jest modyfikacja tych materiałów zarówno na etapie ich syntezy, jak i po syntezie. Do tej pory otrzymano przeszło 20 tysięcy różnych MOF-ów o różnorodnych gęstościach (od $0,13 \text{ g/cm}^3$) oraz bardzo różnych wymiarach porów (od ułamka nanometra do blisko 50 nm) [31, 32].



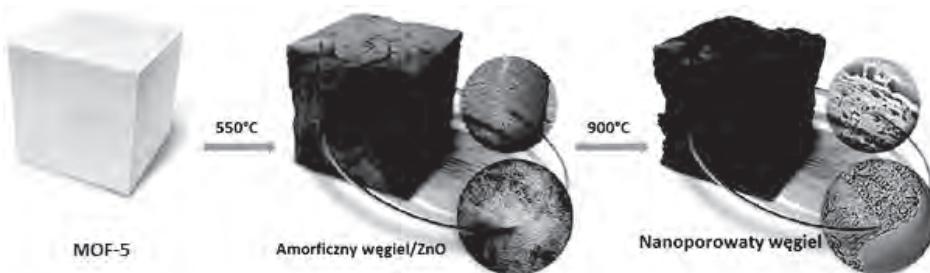
Rysunek 1. Struktury wybranych MOF-ów z uwzględnieniem ich powierzchni właściwej oraz wymiaru porów [33]. Rysunek wykonany na podstawie [33] za zezwoleniem. Prawa autorskie[®] 2010, należą do Royal Society of Chemistry

Figure 1. Structures of the selected MOFs including their specific areas and pore sizes [33]. Adapted with permission from ref. [33]. Copyright[®] 2010, Royal Society of Chemistry

Na Rysunku 1 przedstawiono struktury wybranych MOF-ów z uwzględnieniem ich powierzchni właściwej oraz wymiaru porów, które są ważnymi parametrami w procesach adsorpcji [33]. Łączniki organiczne większości MOF-ów to polikarboksylane, np.: 1,3,5-benzenotrikarboksylan (z Cu powstaje MOF oznaczony symbolem HKUST-1, z Al, Cr lub Fe – MIL-100), 1,4-benzenodikarboksylan (z Zn – MOF-5, z V(IV) – MIL-47, z Cr, Fe – MIL-101, z Al, Cr, Fe, Ga – MIL-53) lub 1,3,5-benzenotribenzoesan (z Zn – MOF-177). Większość z nich ma sztywną strukturę, np. MOF-5, HKUST-1, MIL-100, MIL-101, MOF-177, $Mn_3[(Mn_4Cl)_3(BTT)_8]_2$ (BTT – 1,3,5-tris(2H-tetrazol-5-ylo)benzen) [33–40].

Mimo wielu zalet, sieci metalo-organiczne mają w większości przypadków istotne wady, do których niewątpliwie można zaliczyć powolny rozkład w temperaturze pokojowej, małą odporność na wodę i światło oraz słabe przewodnictwo elektryczne i wytrzymałość mechaniczną [41–43]. Ze względu na to, że MOF-y mogą mieć bardzo duże powierzchnie właściwe, nawet $7000\text{ m}^2/\text{g}$ [43] oraz w dużej mierze składają się ze związków organicznych można je poddać karbonizacji i z powodzeniem otrzymać nanoporowe węgle (ang. *nanoporous carbons*, NPCs) [22, 23, 44–51]. Tak otrzymane węgle mogą charakteryzować się nie tylko dużymi powierzchniami i objętościami porów, lecz również bardzo dobrą stabilnością chemiczną i mechaniczną. Przykładowo, karbonizacja MOF-u o nazwie Zn-fumarate umożliwiła otrzymanie węgla o powierzchni właściwej bliskiej $4800\text{ m}^2/\text{g}$ i objętości porów $4,0\text{ cm}^3/\text{g}$ [44]. W procesie syntezy NPCs z MOF-ów (często z dodatkowym źródłem węgla) takie warunki jak: temperatura karbonizacji, szybkość wzrostu temperatury, wymiar kryształów czy występowanie dodatkowych komponentów w strukturze decydują o porowatości i charakterze otrzymanych węgli.

Zazwyczaj węgle otrzymywane z MOF-ów mają bardzo małą dyspersję rozkładu porów, w przeciwieństwie do większości węgli aktywnych otrzymanych w wyniku klasycznej karbonizacji i aktywacji węglowych prekursorów. Jest to szczególnie istotne w takich zastosowaniach, gdzie wymagane są selektywne adsorbenty. Z MOF-ów otrzymuje się również inne materiały, w tym materiały grafenowe, np. wstępki grafenowe składające się z 2–6 warstw grafenowych [25, 52–57]. Niestety synteza pochodnych MOF-ów, tj. nanoporowatych węgli, metali czy tlenków metali, wiąże się z dużym zużyciem energii, ponieważ karbonizację MOF-ów prowadzi się w ciągu kilku godzin w wysokich temperaturach ($700\text{--}1100^\circ\text{C}$) (Rys. 2) [45, 47]. Należy wziąć również pod uwagę koszt syntezy samych MOF-ów, który w wielu wypadkach jest czynnikiem limitującym ich wykorzystanie. Pomimo tego, jak się wydaje, powinny być prowadzone dalsze badania związane z otrzymaniem tych funkcjonalnych materiałów, mając na uwadze również aspekt ekonomiczny.



Rysunek 2. Schemat otrzymywania nanoporowatego węgla w wyniku karbonizacji MOF-5 zawierającego jony Zn [45]. Rysunek wykonany na podstawie [45] za zezwoleniem. Prawa autorskie[®] 2012, należą do American Chemical Society

Figure 2. Scheme illustrating the synthesis of nanoporous carbon via carbonization of zinc ion containing MOF-5 [45]. Adapted with permission from ref. [45]. Copyright[®] 2012, American Chemical Society

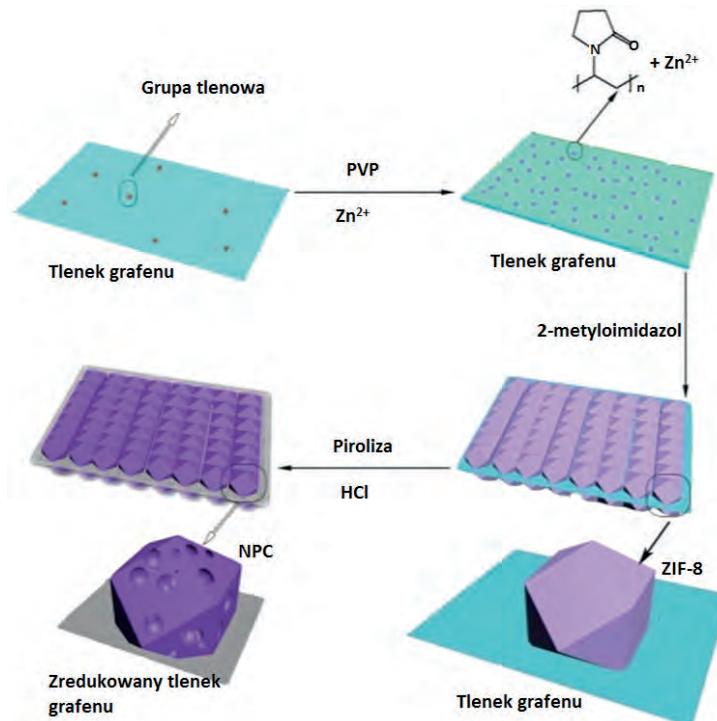
Jak już wspomniano jedną z kluczowych wad MOF-ów jest ich mała stabilność, a w szczególności mała odporność na wodę, czego efektem jest powolne niszczenie struktury krystalicznej. Najsłabszymi elementami strukturalnymi tych materiałów są połączenia metal-ligand. Jednak w ostatnich latach udało się znacząco poprawić stabilność MOF-ów w wilgotnym otoczeniu, dobierając odpowiednie metale i łączniki organiczne lub tworząc materiały hybrydowe na bazie MOF-ów, na przykład z tlenkiem grafenu (GO). Dodatek GO ma znaczący wpływ na stabilność w wilgotnym środowisku MOF-u miedziowego (HKUST-1 lub Cu-BTC, BTC – anion kwasu 1,3,5-benzenotrikarboksylowego) [58]. Już 5%-owy dodatek GO do Cu-BTC zapewnił odporność kompozytu na destrukcyjne działanie wody. Grupy tlenowe na powierzchni GO, połączone z centrami metalicznymi wiązaniem koordynacyjnymi, uniemożliwiają adsorcję cząsteczek wody. Innymi słowy, warstwy GO złożone z pierścieni węglowych, otaczają aktywne centra metaliczne, tworząc hydrofobową barierę chroniącą wiązania koordynacyjne w strukturze MOF-u. Ze względu na znaczny udział komponentu organicznego, MOF-y są mniej odporne na wysokie temperatury, w porównaniu do materiałów nieorganicznych, np. zeolitów czy węgli. Zazwyczaj rozkładają się one w przedziale temperatur od 300°C do 600°C [59, 60].

Małe cząsteczki adsorbatu są zatrzymywane na powierzchni MOF-ów na skutek działania dużych sił dyspersyjnych w tym układzie. Siły te wynikają z dużego uporządkowania i małych wymiarów porów (mikroporów) w większości MOF-ów. Tylko niektóre MOF-y zawierają mezopory. Jak wskazują liczne badania, w przypadku adsorpcji małych cząsteczek struktura mikro-mezoporowata adsorbentu jest bardziej korzystna, gdyż mikropory zapewniają dużą pojemność adsorpcyjną, a mezopory dobrą dyfuzję gazów i kinetykę adsorpcji [61, 62].

Łączenie MOF-ów z innymi funkcjonalnymi materiałami np. grafenem czy nanorurkami węglowymi jest stosunkowo łatwą metodą modyfikacji ich właściwości fizycznych i chemicznych, a dzięki temu, zwiększa się ich użyteczność [17, 18, 63–78]. Materiały grafenowe (np. zredukowany tlenek grafenu, rGO) są jed-

nymi z najlepszych dodatków do innych materiałów funkcjonalnych, ze względu na wiele istotnych zalet m.in.: dużą odporność termiczną i chemiczną, dobre właściwości elektryczne czy istniejące szerokie możliwości ich modyfikacji. Odpowiednie ścieżki syntezy materiałów hybrydowych MOF-grafen umożliwiają zachowanie zalet składników, redukując jednocześnie ich wady. W związku z tym, w przypadku tych materiałów często obserwowany jest tzw. efekt synergiczny, czyli kompozyt wykazuje znacznie lepsze właściwości w porównaniu z właściwościami wyjściowym składników. Kompozyty na bazie MOF-ów będą mogły być wykorzystywane wszędzie tam, gdzie mogą być wykorzystane same MOF-y oraz być może tam gdzie MOF-y „samodzielnie” nie mogą być użyte. W przyszłości będzie coraz więcej wymagań dotyczących specyficznych właściwości jakie muszą spełniać materiały (w tym adsorbenty). Jak się wydaje wymagania te będą mogły spełniać materiały hybrydowe. Analizę literatury dotyczącej różnych materiałów kompozytowych na bazie MOF-ów można znaleźć w następujących pracach [18, 19, 79, 80].

Materiały hybrydowe MOF-grafen przyciągają coraz większą uwagę badaczy na całym świecie, ze względu na duży potencjał aplikacyjny w adsorpcji, elektrochemii czy katalizie [68–71, 78]. Materiały te można otrzymać poprzez krystalizację MOF-u „*in situ*” na materiale grafenowym lub poprzez fizyczne zmieszanie tych komponentów. Zdyspergowany GO, dodany do roztworu zawierającego jony metalu i cząsteczki ligandu, jest czynnikiem inicjującym krystalizację MOF-u zarówno w temp. pokojowej, jak i w temp. podwyższonych. GO jest wykorzystywany jako dodatek do potencjalnych adsorbentów ze względu na jego dwie istotne zalety: dużą gęstość upakowania atomów oraz dużą ilość powierzchniowych grup funkcyjnych, które zwiększają działanie powierzchniowych sił dyspersyjnych w kompozycie. Często obserwuje się zwiększenie powierzchni właściwej kompozytu po dodaniu tlenku grafenu, pomimo iż jego powierzchnia właściwa jest mała (do kilkudziesięciu m^2/g) [81]. Dzieje się tak dlatego, że wprowadzone warstwy grafenowe (np. zawiesina GO) do struktury MOF-u nie ulegają agregacji, dzięki czemu mogą one mieć powierzchnię właściwą bliską teoretycznej wartości powierzchni właściwej grafenu ($2630 \text{ m}^2/\text{g}$ [82]). Poza tym nowe pory powstają pomiędzy siecią metalo-organiczną i warstwami grafenowymi. Zazwyczaj ilość dodawanego GO lub zredukowanego GO (rGO) zawiera się w przedziale od 1 do 20%. Przykład syntezy kompozytu MOF-grafen oraz kompozytu nanoporowaty węgiel wzbogacony w azot (NPC) przedstawiono na Rysunku 3, w której przyłączono ZIF-8 do warstw tlenku grafenu w obecności polipirolidonu [56]. Jeśli tak otrzymany nanokompozyt poddany zostanie pirolizie, to powstaje kompozyt NPC-grafen o znacznej powierzchni właściwej ($S_{\text{BET}} = 780 \text{ m}^2/\text{g}$) [56].



Rysunek 3. Schemat otrzymywania materiału hybrydowego MOF-grafen oraz NPC-grafen [56]. Rysunek wykonany na podstawie [56] za zezwoleniem. Prawa autorskie[®] 2016, należą do Royal Society of Chemistry

Figure 3. Scheme illustrating the synthesis of MOF-graphene hybrid and NPC-graphene material [56]. Adapted with permission from ref. [56]. Copyright[®] 2016, Royal Society of Chemistry

Poprawa właściwości adsorpcyjnych materiałów hybrydowych MOF-grafen w stosunku do komponentów, jest wynikiem większej powierzchni właściwej (nie zawsze) oraz zwiększych sił dyspersyjnych w takim materiale. Dodatkowo, tlenki grafenu mają liczne, powierzchniowe grupy funkcyjne, dzięki czemu mogą wiązać się z kationami metali wiązaniem koordynacyjnym konkuruje z łącznikami organicznymi. Konsekwencją tego są niedoskonałości sieci krystalicznych MOF-ów powodujące zwiększenie ilości nienasyconych wiązań kationów metali, które stają się centrami aktywnymi oddziaływanymi z cząsteczkami adsorbatu [60, 65, 66].

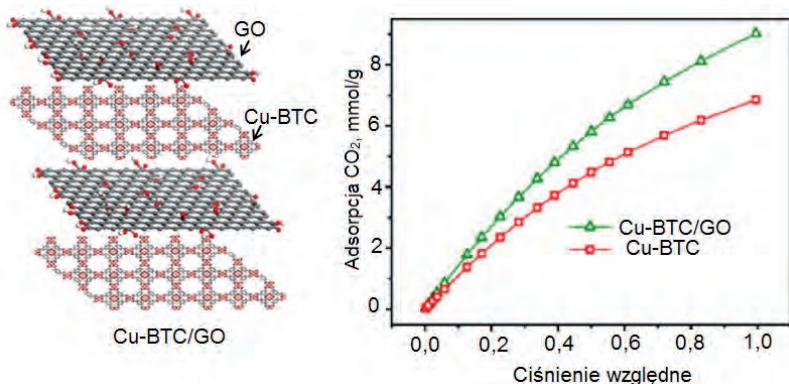
2. ADSORPCJA CO_2 I LOTNYCH ZWIĄZKÓW ORGANICZNYCH NA KOMPOZYTACH MOF-GRAFEN

Negatywne konsekwencje szybkiego rozwoju naszej cywilizacji, tj. zwiększająca się emisja gazów cieplarnianych i innych zanieczyszczeń powietrza wymagają innowacyjnych rozwiązań. Poszukuje się wydajnych sposobów redukcji emisji CO_2 ,

CH_4 czy lotnych związków organicznych (ang. *volatile organic compounds*, VOCs) do atmosfery. Jednym z proponowanych rozwiązań jest wykorzystanie, w celach adsorpcyjnych, materiałów węglowych, sieci metalo-organicznych, zeolitów czy materiałów hybrydowych powstały z połączenia różnych grup materiałów. Bardzo niewiele adsorbentów bada się w celu wykorzystania ich do redukcji emisji lotnych związków organicznych. Powszechnie stosowanymi, szkodliwymi VOC-ami są n-alkany, benzen,toluen, aceton, formaldehyd czy chlorek metylenu [83, 84]. Jednym z najbardziej rozpowszechnionych związków organicznych jest benzen, który występuje naturalnie w ropie naftowej czy smole węglowej. Benzen stosuje się w przemyśle chemicznym, jako substrat w syntezie organicznej, jest również wysoko-oktanowym składnikiem benzyny silnikowej. Związek ten podlega ocenie w badaniu jakości powietrza, ze względu na udokumentowane działanie kancerogenne [85]. Z tego powodu, poszukiwania wydajnych adsorbentów par benzenu i innych zanieczyszczeń środowiska z grupy VOCs są bardzo uzasadnione. Niestety badania związane z adsorcją VOCs nie są często podejmowane przez badaczy, głównie ze względu na ich toksyczność oraz drogą aparaturę pomiarową.

Jednym z najlepszych adsorbentów CO_2 spośród wszystkich MOF-ów jest Mg-MOF-74, który adsorbuje 8,61 mmol/g w temperaturze 25°C pod ciśnieniem 1 bar [85]. Tak dużą pojemność adsorpcyjną materiał ten zawdzięcza silnym oddziaływaniom między cząsteczkami CO_2 a nienasyconymi centrami Mg^{2+} , a także znacznej powierzchni właściwej BET (1174 m²/g) oraz średniemu wymiarowi porów wynoszącemu 10,2 Å. Jak wiadomo, wymiar porów poniżej 10 Å jest preferowany w przypadku adsorpcji CO_2 [12, 86, 87]. Dane na temat użyteczności MOF-ów do adsorpcji CO_2 można znaleźć w następujących artykułach [88–90].

Pionierska praca na temat materiałów MOF-grafen ukazała się w 2009 roku [63]. W 2013 roku Bandosz i in. [65] zaproponowali syntezę modyfikowanego materiału hybrydowego MOF-grafen łącząc modyfikowany mocznikiem GO z MOF-em zawierającym miedź (Cu-BTC), znanym jako HKUST-1. Aminowe i inne grupy na powierzchni GO reagowały z łącznikami BTC zwiększąc liczbę defektów na powierzchni kryształów oraz liczbę atomów nieskoordynowanej miedzi. Materiał ten adsorbował 4,23 mmol/g CO_2 w temp. 30°C, co stanowiło około dwukrotnie większą wartość adsorpcji CO_2 niż uzyskaną na samym Cu-BTC [65]. Wprowadzenie GO pozwoliło zwiększyć porowatość Cu-BTC o ok. 50%, głównie dzięki porom powstałym pomiędzy warstwami grafenowymi i siecią metalo-organiczną. Późniejsza analiza wykazała, że adsorpcja CO_2 w przypadku tego kompozytu miała charakter adsorpcji fizycznej [91]. W następnych latach udało się poprawić właściwości adsorpcyjne Cu-BTC/GO względem CO_2 do ok. 9 mmol/g (0°C, ~1 bar) (Rys. 4) oraz zwiększyć selektywność adsorpcji CO_2 względem N_2 do 186 [60, 92–94]. Ostatnio wykazano, że materiał grafenowy może być czynnikiem wpływającym na morfologię i strukturę MOF-u Cu-BTC [95].



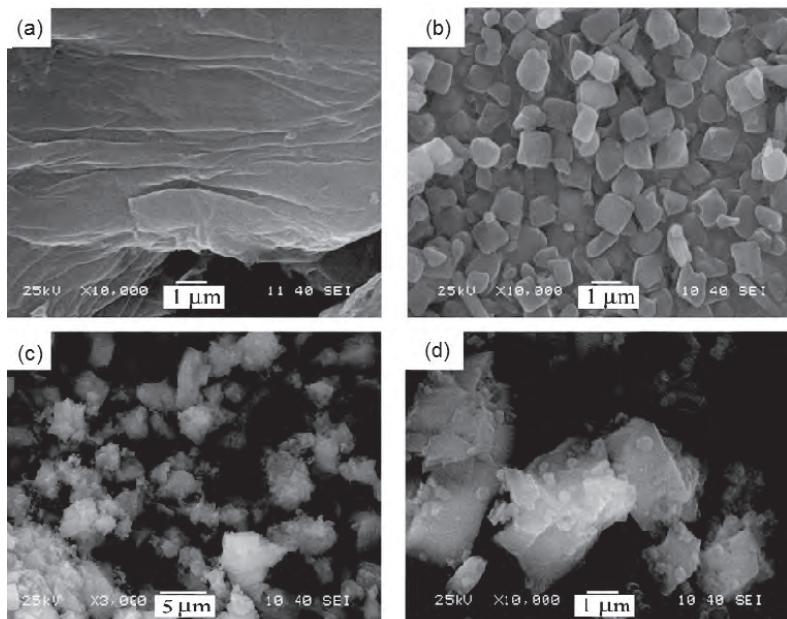
Rysunek 4. Schemat ilustrujący strukturę Cu-BTC/GO oraz izotermy adsorpcji CO₂ na Cu-BTC i Cu-BTC/GO [60]. Wykorzystano dane z pracy [60]

Figure 4. Schematic illustration of the structure of Cu-BTC/GO, and CO₂ adsorption isotherms on Cu-BTC and Cu-BTC/GO [60]. Data from ref. [60]

Inny miedziowy MOF-505 otrzymywano z wykorzystaniem kwasu organicznego bifenyo-3,3',5,5'-tetrakarboksylowego (H₄BPTC) [96,97]. Chen i in. [97] zsynetyzowali serię kompozytów MOF-505/GO z różną ilością GO (od 2% do 10%). Najlepszym adsorbentem CO₂ i zarazem najbardziej selektywnym, był kompozyt MOF-505/GO zawierający 5% GO. Adsorbował on 3,9 mmol/g CO₂ w temperaturze 25°C pod ciśnieniem 1 bar, co stanowiło o ok. 37%-ową poprawę właściwości adsorpcyjnych w porównaniu z samym MOF-505. Wyniki analizy rentgenowskiej wykazały, że wprowadzenie nawet niewielkich ilości GO do MOF-505 skutkowało większą ilością nieskoordynowanej miedzi w strukturze tych kompozytów. Wykonano również badania stabilności tych materiałów w wilgotnym otoczeniu. W odróżnieniu od Cu-BTC [98], zarówno MOF-505 jak i jego kompozyty z GO były odporne na wilgoć, dzięki silnym wiązaniom koordynacyjnym wytworzonym pomiędzy grupami karboksylowymi z GO a jonami miedzi w tym kompozycie.

Znacznym zainteresowaniem cieszą się również MOF-y oznaczone symbolem MIL-101 zawierające chrom oraz materiały hybrydowe powstałe z połączenia MIL-101 z tlenkami grafenu (Rys. 5) [66, 99–103]. Przykładowo, hybrydowy materiał porowaty MIL-101/GO składający się z MIL-101 i tlenku grafenu (GO), dodanego w stosunku masowym 1 GO:10 Cr(NO₃)₃·9H₂O, charakteryzował się bardzo dużą powierzchnią właściwą BET, równą 2950 m²/g, jak również dużą całkowitą objętością porów 1,42 cm³/g [66]. Materiał ten znacznie lepiej adsorbował CO₂ oraz CH₄ niż sam MIL-101 ($S_{BET} = 2670 \text{ m}^2/\text{g}$) [66]. Badano również selektywność adsorpcji CO₂ dla tego materiału względem CH₄. Dla mieszaniny zawierającej 10% CO₂ i 90% CH₄ uzyskano dobrą selektywność adsorpcji CO₂ (32) względem CH₄ w temp. 25°C pod ciśnieniem 1,5 bar. Selektywność ta była ok. 3-krotnie większa niż dla MIL-101 [66]. Badano również właściwości adsorpcyjne MIL-101/GO ($S_{BET} = 2930 \text{ m}^2/\text{g}$) względem par acetonu [100]. W temperaturze 15°C i pod ciśnieniem 0,16 bar zaadsorbowano na nim 20,1 mmol/g acetonu, podczas gdy w tej

temperaturze i pod ciśnieniem 0,17 bar MIL-101 adsorbował jedynie 13,9 mmol/g acetonu. Podobnie jak w przypadku innych materiałów hybrydowych MOF-grafen, poprawa właściwości adsorpcyjnych w porównaniu z komponentami wynika ze zwiększenia powierzchni właściwej oraz zwiększenia sił dyspersyjnych. Czynniki te wpływają na efektywną adsorcję różnych gazów i par związków organicznych. Poza tym, warstwy grafenowe mają duży wpływ na wzrost i jakość kryształów MIL-101 w kompozytach MIL-101/GO. Kryształy MIL-101, które powstawały na warstwach grafenowych były mniejsze i bardziej zdefektowane w porównaniu z kryształami samego MIL-101. Dodatkowo, na podstawie izotermy adsorpcji azotu, stwierdzono zwiększoną ilość małych mezoporów w kompozycie MIL-101/GO w porównaniu do MIL-101. Były to najprawdopodobniej puste przestrzenie pomiędzy kryształami MOF i GO. Sun i in. [103] badali pojemność adsorpcyjną MIL-101 i jego kompozytów z GO względem *n*-heksanu. Powierzchnia właściwa kompozytów zawierających 5% GO ($3500\text{ m}^2/\text{g}$) lub 10% GO ($3320\text{ m}^2/\text{g}$) była większa od powierzchni MIL-101 ($2880\text{ m}^2/\text{g}$). Maksymalna wartość adsorpcji *n*-heksanu dla MIL-101/GO z 5 % GO w temperaturze 25°C wynosiła 12,1 mmol/g. Stanowiło to ponad 90%-owy wzrost adsorpcji *n*-heksanu w porównaniu z MIL-101. Ta wartość adsorpcji *n*-heksanu jest również znacznie większa od tych, uzyskiwanych dla standardowych węgli aktywnych czy zeolitów [5, 6].



Rysunek 5. Zdjęcia SEM: GO (a), MIL-101 (b), MIL-101/GO5 (c i d) [99]. Rysunek skopiowany za zezwoleniem z [99]. Prawa autorskie® 2012, należą do John Wiley and Sons

Figure 5. SEM images of: GO (a), MIL-101 (b), MIL-101/GO5 (c and d) [99]. Reproduced with permission from ref. [99]. Copyright® 2012, John Wiley and Sons

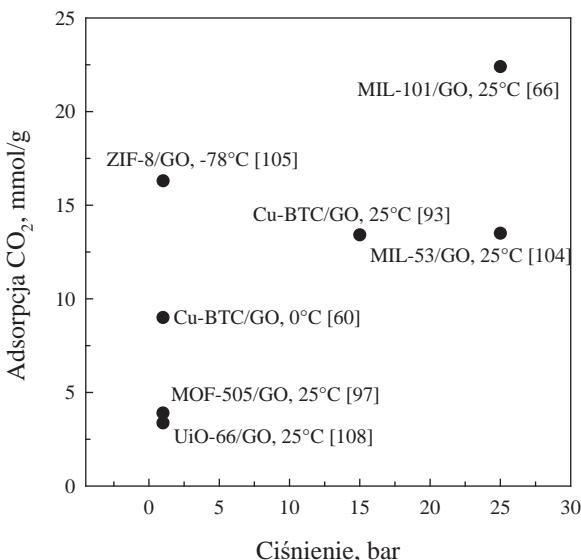
Dla innego MOF-u z Cr o symbolu MIL-53 również obserwowano poprawę adsorpcji CO₂ oraz selektywności względem CH₄ po dodaniu GO [104]. Materiał hybrydowy MIL-53/GO z 10% GO miał o 62% większą pojemność adsorpcyjną oraz 16 razy lepszą selektywność w porównaniu z MIL-53 w temperaturze 25°C pod ciśnieniem 5 bar. Dodatkowo zauważono, że taka ilość warstw grafenowych w strukturze MIL-53 skutkowała znacznym zmniejszeniem elastyczności tego MOF-u.

Według dostępnej literatury, kompozyty MOF-grafen na bazie MOF-u cynkowego ZIF-8, mają powierzchnię właściwą mniejszą niż sam ZIF-8 (zwykle S_{BET} = 1100–1300 m²/g) [105, 106]. Przykładowo dodanie jedynie 2% GO skutkowało zmniejszeniem powierzchni właściwej do 820 m²/g, natomiast 20% GO – do 289 m²/g. Jednakże adsorcja CO₂ na tych kompozytach w temperaturze -78°C zwiększała się znaczco wraz ze wzrostem ilości dodanego GO, osiągając maksymalną wartość 16,3 mmol/g dla kompozytu ZIF-8 z 20%-ową zawartością GO. W tych warunkach na samych GO i ZIF-8 adsorbowało się odpowiednio 7,5 mmol/g i 6,2 mmol/g CO₂. Adsorbenty hybrydowe ZIF-8/GO otrzymano w wyniku dodania zawiesiny eksfoliowanego tlenku grafenu do ZIF-8 w trakcie jego syntezy w temperaturze pokojowej [105]. Wykorzystując tę samą ścieżkę syntezy Zhou i in. [106] przygotowali kompozyty ZIF-8/GO z różnym stosunkiem cynku do łącznika organicznego oraz z różną ilością GO. Maksymalny dodatek GO, dzięki któremu możliwe było otrzymanie kompozytu ZIF-8/GO wynosił 15%. Autorzy tej pracy zsyntetyzowali ZIF-8 o dużej powierzchni właściwej BET wynoszącej 1770 m²/g. Następnie materiał ten jak i jego kompozyty z GO badano pod względem użyteczności do adsorpcji chlorku metylenu z roztworów wodnych. Okazało się, że również w przypadku adsorpcji z roztworów wodnych najlepszym adsorbentem był kompozyt z największą ilością tlenku grafenu w swojej strukturze.

Jak wiadomo w procesie adsorpcji gazów i par związków organicznych istotną rolę pełni chemia powierzchni adsorbentów [107–109]. Liu i in. [107] badali adsorpcję par benzenu i etanolu na materiałach hybrydowych MOF-5-grafen. Materiały te otrzymano metodą solwotermalną wygrzewając prekursory MOF-5 z zawiesiną GO i glukozą w temperaturze 120°C w ciągu 25 godzin. MOF-5-grafen z 5,2 % GO adsorbował największe ilości benzenu i azotu (największa powierzchnia właściwa). Natomiast w przypadku adsorpcji etanolu, największą pojemność adsorpcyjną miał materiał hybrydowy z 3,5%-ową zawartością GO. Prawdopodobnie ze względu na większą ilość tlenowych grup funkcyjnych w tym materiale (ta sama ilość glukozy) niż w materiale z 5%-ami GO. Te polarne grupy znacząco zwiększyły siłę oddziaływań pomiędzy adsorbentem i polarnymi cząsteczkami etanolu.

Często tlenki grafenu, przed dodaniem do MOF-ów, są poddawane modyfikacji [22, 65, 109]. Najczęściej modyfikacja ta polega na przyłączaniu dodatkowych grup funkcyjnych do powierzchni warstw grafenowych. Możliwa jest również modyfikacja GO za pomocą nanocząstek metali lub tlenków metali. Su i in. [109] obserwowali zwiększenie się pojemności adsorpcyjnej kompozytu na bazie MOF względem CO₂ w temperaturze 0°C wraz ze wzrostem ilości (do 11% wag.) dodawanego GO

z nanocząsteczkami Pt (GO-Pt). Powyższe przykłady wskazują, że warstwy grafenowe są bardzo dobrymi dodatkami do potencjalnych adsorbentów, przeznaczonych do pochłaniania i usuwania szkodliwych gazów (CO_2) i par związków organicznych. Na rysunku 6 przedstawiono maksymalne adsorpcje CO_2 uzyskane na materiałach kompozytowych MOF-grafen w różnych warunkach ciśnienia i temperatury.



Rysunek 6. Adsorpcja CO_2 na materiałach kompozytowych MOF-grafen
Figure 6. CO_2 adsorption on MOF-graphene composite materials

3. KOMPOZYTY MOF-GRAFEN DO ADSORPCJI WODORU I METANU

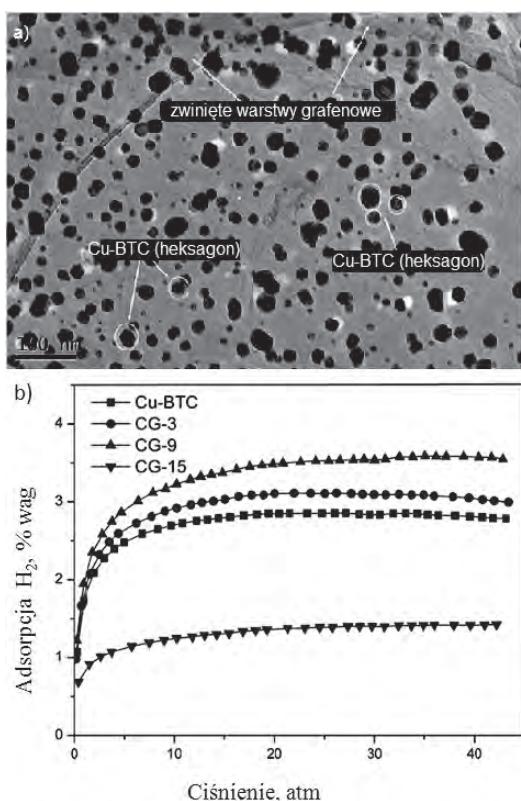
W dobie zwiększającego się zapotrzebowania na energię, istotnego znaczenia nabiera poszukiwanie efektywnych, czystych nośników energii takich jak wodor i metan. Niestety dużym problemem jest sposób magazynowania tych paliw. Jednym z potencjalnych, pomocnych rozwiązań może być przechowywanie H_2 i CH_4 z wykorzystaniem nowych adsorbentów. Ministerstwo Energii USA (Departament of Energy – DOE) wyznaczyło cele, jakie musi spełnić materiał magazynujący, by mógł on być zastosowany na szeroką skalę. Celem do osiągnięcia do 2020 r. ma być 0,055 kg wodoru na 1 kg systemu (co odpowiada energii 1,8 kWh/kg) lub 0,040 kg wodoru na 1 L systemu (energia 1,3 kWh/L)[110,111] oraz 0,5 kg/kg lub 3,5 kWh/L ($350 \text{ cm}^3 \text{ STP/cm}^3$) metanu w przypadku jego magazynowania [112, 113]. Pomimo dość bogatej literatury na temat stałych adsorbentów i intensywnie prowadzonych badań, jak do tej pory nie otrzymywano takiego materiału, który spełniałby wymagania DOE. Ponadto metan może być pozyskiwany z gazu ziemnego lub biogazu, jednak przed jego wykorzystaniem lub zmagazynowaniem niezbędne jest oddzie-

lenie zanieczyszczeń, w tym głównie CO₂. Podsumowując należy stwierdzić, że selektywne adsorbenty różnych gazów są bardzo aktualnym i ważnym obiektem poszukiwań [114, 115].

Po raz pierwszy wyniki badań właściwości adsorpcyjnych MOF-ów względem wodoru opublikowano w 2003 r. [30]. Jak dotąd, największą pojemnością adsorpcyjną względem wodoru charakteryzowała się MOF-210 – 17,6% wag. w temperaturze –196°C i pod ciśnieniem 80 bar. MOF ten ma jedną z największych powierzchni właściwych BET, spośród wszystkich materiałów porowatych, równą 6240 m²/g [116]. Inny MOF (UMCM) o powierzchni właściwej 5200 m²/g adsorbował 6,9% wag. H₂ również w temperaturze ciekłego azotu, ale pod niższym ciśnieniem wynoszącym 46 bar [117].

Wiele MOF-ów o bardzo dużych powierzchniach właściwych (MPF-180, MOF-200, MOF-205 [116], PCN-61, PCN-66, PCN-68 i PCN-610 [118], NOTT-112 i NOTT-116 [119,120] oraz NU-100 [121], NU-109, czy NU-110 [43]) otrzymano, w wyniku użycia mieszanych łączników organicznych lub suszenia w warunkach nadkrytycznych. Prace te jednoznacznie wskazują na znakomite właściwości adsorpcyjne MOF-ów względem H₂, w niskich temperaturach np. –196°C. Jednak, aby materiał spełniał wymagania DOE, taki system musi osiągać pojemność adsorpcyjną ok. 5,5% wag. H₂ w temperaturze wyższej niż –40°C pod ciśnieniem niższym od 100 bar. Dla porównania aktualne technologie magazynowania wodoru pracują pod dużymi ciśnieniami w zakresie od 350 do 700 bar (energia 1,3 kWh/L) [122].

Cząsteczki wodoru oddziałują z MOF-ami, jak również z materiałami MOF-grafen, w wyniku słabych wiązań van der Waalsa. W adsorpcji H₂ istotne są nie tylko wymiary porów, ale również chemia powierzchni tych porów oraz otwarte centra metaliczne w strukturze tych materiałów. Zwiększenie interakcji pomiędzy H₂ i MOF-ami, jak również wzrost wartości izosterycznego ciepła adsorpcji realizuje się poprzez funkcjonalizację łączników organicznych lub wzrost liczby otwartych centrów metalicznych [122–124]. Niewielkie ilości materiału grafenowego w strukturze MOF-u mogą wpływać na jego właściwości adsorpcyjne również względem H₂ i CH₄ [17–19]. Przykładowo w temp. –196 °C i pod ciśnieniem 42 atm MOF Cu-BTC adsorbuje 2,81% wag. H₂ [64]. Natomiast poprzez dodanie zawiesiny tlenku grafenu w ilości 9% wag., w trakcie syntezy tego MOF-u, uzyskano wydajniejszy adsorbent (oznaczony jako CG-9), który w tych samych warunkach adsorbował 3,58% wag. H₂ (Rys. 7). Badano również efektywność adsorpcji H₂ na Cu-BTC z 3%-owym dodatkiem GO (CG-3) oraz z 15%-owym dodatkiem GO (CG-15). W przypadku CG-15 zaobserwowano drastyczny spadek pojemność adsorpcyjnej tego materiału względem wodoru, spowodowany dużą aglomeracją warstw grafenowych, jaka ma miejsce dla kompozytów zawierających stosunkowo duże ilości GO w swojej strukturze [64].

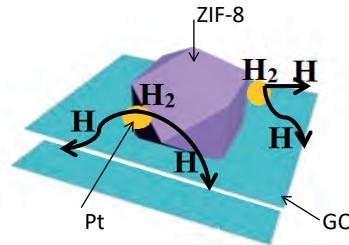


Rysunek 7. Zdjęcie HRTM kompozytu Cu-BTC/GO (CG-9) (a) oraz izotermy adsorpcji H₂ na Cu-BTC i jego kompozytach z GO (b) [64]. Rysunek skopiowany za zezwoleniem z [64]. Prawa autorskie[®] 2013, należą do Royal Society of Chemistry

Figure 7. HRTM image of Cu-BTC/GO composite (CG-9) (a) and H₂ adsorption isotherms on Cu-BTC and on its composite with GO (b) [64]. Reproduced with permission from ref. [64]. Copyright[®] 2013, Royal Society of Chemistry

Niestety w temperaturze pokojowej MOF-y zazwyczaj nie są efektywnymi adsorbentami H₂ [125–127]. Pewną poprawę tych właściwości można uzyskać poprzez różne modyfikacje [67, 128–130], w tym domieszkowanie nanocząstkami [128–130]. Zhou i in. [128] zsyntetyzowali MOF ZIF-8, materiał hybrydowy ZIF-8/GO oraz dodatkowo ZIF-8/GO z nanocząstkami Pt oznaczony jako Pt-ZIF-8/GO. Nanocząstki te ze względu na wymiar 3,8 nm były zbyt duże, by wypełnić przestrzeń porów. Natomiast prawdopodobnie zostały przyłączone do zewnętrznych powierzchni tego MOF-u blokując wejścia do porów ZIF-8. W rezultacie, wyznaczona na podstawie niskotemperaturowej adsorpcji azotu powierzchnia właściwa kompozytu Pt-ZIF-8/GO była ponad 2-krotnie mniejsza ($620 \text{ m}^2/\text{g}$) niż w przypadku ZIF-8 ($1300 \text{ m}^2/\text{g}$) i ZIF-8/GO ($1250 \text{ m}^2/\text{g}$). Natomiast adsorpcja H₂ w temperaturze 25°C i pod ciśnieniem 10 bar była ponad 2-krotnie większa w przypadku adsorbentu z nanocząstkami Pt w porównaniu do ZIF-8 i ZIF-8/GO ze względu

na efekt „rozprzestrzeniania się” wodoru, (ang. *spillover effect*) (Rys. 8). Efekt ten polega na dysocjacji cząsteczek wodoru za pośrednictwem metali lub tlenków metali, a następnie migracji atomowego wodoru do wnętrza materiału porowatego [131–133].



Rysunek 8. Schemat efektu „rozprzestrzeniania się” wodoru w materiale hybrydowym ZIF-8/GO domieszkowanym nanocząstkami Pt [128]

Figure 8. Schematic illustration of hydrogen spillover effect on the ZIF-8/GO hybrid material decorated with Pt nanoparticles [128]

Podobną poprawę właściwości adsorpcyjnych względem wodoru w temperaturze pokojowej obserwowano na innych domieszkowanych metalami lub tlenkami metali materiałach hybrydowych MOF-grafen, np. Cu-BTC/GO-Pt i MIL-101/GO-Pt [129, 130]. Materiał hybrydowy Cu-BTC/GO po domieszkowaniu platyną (Cu-BTC/GO-Pt) miał nieco większą pojemność adsorpcji względem H_2 (0,77% wag.) w temp. 25°C i pod ciśnieniem 80 bar, w porównaniu do Cu-BTC (0,41% wag.) [129]. Natomiast MIL-101/GO-Pt adsorbował 2,7 razy więcej wodoru niż MIL-101 w temp. 25°C pod ciśnieniem 10 bar [130].

Metan ma największy stosunek masowy wodoru do węgla spośród wszystkich węglowodorów. Bezpieczne, tanie technologie wykorzystujące wydajne adsorbenty metanu są intensywnie poszukiwane do zastosowań w przemyśle motoryzacyjnym. Często efektywną adsorcję metanu na MOF-ach realizuje się w temperaturze pokojowej i pod umiarkowanym ciśnieniem, co stwarza realne do wykorzystania rozwiązania magazynowania metanu w praktyce [112]. Odpowiedni wymiar i rozkład objętości porów jest kluczowy w uzyskaniu efektywnej, fizycznej adsorpcji metanu. Jednak, jeśli ciśnienie przekracza 60 bar, to grawimetryczna pojemność adsorpcji CH_4 , głównie zależy od powierzchni właściwej oraz objętości porów. Podobnie jak w przypadku wodoru, materiały o znacznych powierzchniach np. MOF-210, Al-soc-MOF-1 mają wyjątkowo dobre właściwości adsorpcyjne względem CH_4 [116, 134]. Największą grawimetryczną pojemność adsorpcji 0,41 g/g miał materiał oznaczony symbolem Al-soc-MOF-1, który charakteryzował się powierzchnią właściwą BET 5590 m^2/g i całkowitą objętością porów 2,3 cm^3/g [134]. MOF-210 pomimo większej powierzchni (6240 m^2/g) i objętości porów (3,6 cm^3/g) w tych warunkach adsorbował w przybliżeniu taką samą ilość CH_4 [116]. Może to wskazywać na pewnego rodzaju ograniczenie w procesie adsorpcji CH_4 na MOF-ach, ponieważ pomimo zwiększenia wartości tych dwóch, najważniejszych parametrów

strukturalnych, ilość grawimetrycznie zaadsorbowanego metanu nie zwiększyła się [135].

W temperaturze 25°C pod ciśnieniem 65 bar, największą objętościową adsorpcję ~270 cm³ STP/cm³ uzyskano na materiale HKUST-1 [42]. Niemniej jednak wartość ta jest nadal znacznie poniżej celu określonego przez DOE (350 cm³/STP/cm³). W wyniku obniżenia temperatury pomiaru do -3°C uzyskuje się znaczną poprawę adsorpcji CH₄. W tych warunkach (-3°C, 65 bar) HKUST-1 adsorbowało już ~300 cm³ STP/cm³, natomiast grawimetryczne pojemności adsorpcyjne Al-soc-MOF-1, NU-111 i MOF-177 wynosiły odpowiednio 0,51, 0,50 i 0,43 g/g. Duże grawimetryczne pojemności adsorpcyjne MOF-ów wynikają z ich dużych powierzchni właściwych. Jednak często dla tych materiałów obserwuje się małe objętościowe pojemności adsorpcyjne, ze względu na małe gęstości kryształów. Poszukuje się materiałów o dużych pojemnościach magazynowania metanu zarówno grawimetrycznych jak i objętościowych, dlatego najbardziej obiecującym materiałem wydaje się być NU-111 [136]. MOF-y są niewątpliwie jednymi z najlepszych adsorbentów metanu pod zwiększonym ciśnieniem. Porównanie ich względem innych materiałów proponowanych do adsorpcji metanu, czytelnik może znaleźć w następujących pozycjach literaturowych [137, 138].

W warunkach pokojowych (25°C i 1 bar) podobnie jak w przypadku CO₂ dużą pojemność adsorpcyjną względem CH₄ miał MOF-177, który adsorbował 1,05 mmol/g (0,017 g/g) tego gazu [86]. Dla danego adsorbentu ilość zaadsorbowanego CH₄ jest znacznie mniejsza niż ilość zaadsorbowanego CO₂. W odróżnieniu od cząsteczki CH₄, cząsteczka CO₂ ma silny moment kwadrupolowy (14,3·10⁻⁴⁰ C·m²), dzięki czemu może silniej oddziaływać z powierzchnią adsorbentu. W konsekwencji, domieszkowanie materiałów MOF tlenkami grafenu nie wpływa tak znacząco na ich właściwości adsorpcyjne względem CH₄, jak to często miało miejsce w przypadku adsorpcji CO₂ [66, 97]. Niemniej jednak wpływ ten jest widoczny już pod ciśnieniem 1 bar, w temperaturze 25°C. Przykładem jest MOF-505 po domieszkowaniu 5% GO [97]. Wzrost ilości zaadsorbowanego CH₄, w stosunku do wyjściowego MOF-u, obserwowano również na innych materiałach hybrydowych: UTSA-16/GO, Cu-BTC/GO, MIL-101/GO [66, 92, 139]. W temperaturze 0°C pod ciśnieniem 1 bar MOF-y Cu-BTC z dodatkami GO adsorbowały ok. 1,3 mmol/g [64, 92]. Natomiast pod ciśnieniem 25 bar i w temperaturze pokojowej na MIL-101/GO zaadsorbowało się aż 7,5 mmol/g CH₄ (0,120 g/g) – o ok. 1,5 mmol/g więcej CH₄ niż na MIL-101 [66]. Prostoliniowy kształt izoterm adsorpcji CH₄ uzyskiwany dla wyżej wymienionych materiałów potwierdza istnienie słabych oddziaływań adsorbat-adsorbent. Podobnie jak w przypadku H₂, efektywna adsorpcja CH₄ przebiega dopiero pod zwiększonym ciśnieniem.

PODSUMOWANIE

Hybrydowe materiały porowate składające się z sieci metalo-organicznych i materiałów grafenowych są bardzo atrakcyjne z punktu widzenia ich potencjalnych zastosowań do adsorpcji/magazynowania różnych gazów. Materiały te mogą być szczególnie użyteczne do pochłaniania i usuwania szkodliwych gazów i par. Dodatek tlenków grafenu do niektórych MOF-ów (np. Cu-BTC i MIL-101) powoduje zmiany strukturalne oraz zwiększenie powierzchni właściwych. Dodatkowo, wprowadzone warstwy grafenowe do struktur metalo-organicznych mogą znacznie zwiększać ich powierzchniowe siły dyspersyjne oraz ilość nienasyconych centrów aktywnych, co jest korzystne z uwagi na zastosowania adsorpcyjne. Jednymi z najbardziej efektywnych adsorbentów CO₂ są MOF-y zawierające miedź, domieszkowane małymi ilościami GO (do 9%). Adsorbują one do 9 mmol/g CO₂ w temperaturze 0°C pod ciśnieniem atmosferycznym. Okazuje się, że dodatek tlenków grafenu do MOF-ów może znacznie zwiększyć ich pojemności adsorpcyjne względem różnych VOCs. Obserwowano nawet 90% poprawę tych właściwości w przypadku adsorpcji *n*-heksanu na MIL-101 z dodatkiem rGO w porównaniu z MIL-101. Materiały MOF-grafen mogą okazać się użyteczne również do magazynowania gazowych surowców energetycznych, tzw. nośników energii, np. H₂ i CH₄. Ostatnio coraz częściej publikowane są prace wskazujące na ich lepsze właściwości adsorpcyjne względem tych gazów w stosunku do wyjściowych MOF-ów. Na przykład na Cu-BTC/GO zaadsorbowano 3,58% wag. H₂, w temp. -196°C pod ciśnieniem 40 bar, podczas gdy na Cu-BTC w tych warunkach adsorbował się 2,83% wag. H₂. Natomiast znaczny wzrost adsorpcji CH₄ (o 1,5 mmol/g, 25°C i 25 bar) obserwowano na materiale MIL-101/GO. Jak dotychczas najczęściej otrzymywany kompozytami MOF-grafen były materiały powstałe z połączenia tlenków grafenu z Cu-BTC, ZIF-8 lub MIL-101. Podsumowując należy podkreślić, że kompozyty MOF-grafen są uznawane za nową klasę adsorbentów, które często z sukcesem konkurują z innymi materiałami propozowanymi do pochłaniania/magazynowania gazów.

Praca była częściowo finansowana ze środków projektu 2016/23/B/ST5/00532 z Narodowego Centrum Nauki.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] N.P. Wickramaratne, M. Jaroniec, ACS Appl. Mater. Interfaces., 2013, **5**, 1849.
- [2] A. Wahby, J.M. Ramos-Fernández, M. Martínez-Escandell, A. Sepúlveda-Escribano, J. Silvestre-Albero, F. Rodriguez-Reinoso, ChemSusChem., 2010, **3**, 974.
- [3] M. Nandi, K. Okada, A. Dutta, A. Bhaumik, J. Maruyama, D. Derkx, H. Uyama, Chem. Commun., 2012, **48**, 10283.
- [4] F. Gholipour, M. Mofarahi, J. Supercrit. Fluids, 2016, **111**, 47.
- [5] A. Möller, A.P. Guimaraes, R. Gläser, R. Staudt, Micropor. Mesopor. Mater., 2009, **125**, 23.
- [6] X.S. Zhao, Q. Ma, G.Q. Lu, Energy Fuels, 1998, **12**, 1051.

- [7] V. Zelenáka, M. Badaničová, D. Halamová, J. Čejka, A. Zukal, N. Murafa, G. Goerigk, *Chem. Eng. J.*, 2008, **144**, 336.
- [8] M. Nandi, M. Sarkar, K. Sarkar, A. Bhaumik, *J. Phys. Chem. C*, 2009, **113**, 6839.
- [9] B. Szczęśniak, J. Choma, M. Jaroniec, *Micropor. Mesopor. Mat.*, 2018, **261**, 105.
- [10] G. Wang, B. Dou, Z. Zhang, J. Wang, H. Liu, Z. Hao, *J. Environ. Sci.*, 2015, **30**, 65.
- [11] J. Górką, A. Zawiślak, J. Choma, M. Jaroniec, *Appl. Surf. Sci.*, 2010, **256**, 5187.
- [12] R. Krishna, J.M. van Baten, *Separ. Purif. Technol.*, 2012, **87**, 120.
- [13] H. Oh, S. Maurer, R. Balderas-Xicotencatl, L. Arnold, O.V. Magdysyuk, G. Schütz, U. Müller, M. Hirscher, *Int. J. Hydrogen Energy*, 2017, **42**, 1027.
- [14] B. Szczęśniak, J. Choma, M. Jaroniec, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2017, **243**, 46.
- [15] B. Szczęśniak, Ł. Osuchowski, J. Choma, M. Jaroniec, *J. Porous Mater.*, 2017 DOI 10.1007/s10934-017-0475-1.
- [16] L. Ling, Y.Q. Wu, K.K. Sun, R. Zhang, L. Fana, K.K. Liang, L.B. Mao, *Mater. Lett.*, 2016, **162**, 207.
- [17] H. Wang, Q.-L. Zhu, R. Zou, Q. Xu, *Chem.*, 2017, **2**, 52.
- [18] Q.-L. Zhu, Q. Xu, *Chem. Soc. Rev.*, 2014, **43**, 5468.
- [19] C. Petit, T.J. Bandosz, *J. Colloid Interface Sci.*, 2015, **447**, 139.
- [20] X.-W. Liu, T.-J. Sun, J.-L. Hu, S.-D. Wang, *J. Mater. Chem. A*, 2016, **4**, 3584.
- [21] V. Jabbari, J.M. Veleta, M. Zarei-Chaleshtori, J. Gardea-Torresdey, D. Villagrán, *Chem. Eng. J.*, 2016, **304**, 774.
- [22] S. Li, X. Zhang, Y. Huang, *J. Hazard. Mater.*, 2017, **321**, 711.
- [23] S. Lim, K. Suh, Y. Kim, M. Yoon, H. Park, D.N. Dybtsev, K. Kim, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 7447.
- [24] J. Tang, R.R. Salunkhe, J. Liu, N.L. Torad, M. Imura, S. Furukawa, Y. Yamauchi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, **137**, 1572.
- [25] S. Wu, X. Shen, G. Zhu, H. Zhou, Z. Ji, L. Ma, K. Xu, J. Yang, A. Yuan, *Carbon*, 2017, **116**, 68.
- [26] S.-L. Li, Q. Xu, *Energy Environ. Sci.*, 2013, **6**, 1656.
- [27] Y. Ren, G.H. Chia, Z. Gao, *Nano Today*, 2013, **8**, 577.
- [28] W. Xia, A. Mahmood, R. Zou, Q. Xu, *Energy Environ. Sci.*, 2015, **8**, 1837.
- [29] A. Schoedel, Z. Ji, O.M. Yaghi, *Nat. Energy*, 2016, **1**, 16034.
- [30] N.L. Rosi, J. Eckert, M. Eddaoudi, D.T. Vodak, J. Kim, M. O'Keeffe, O.M. Yaghi, *Science*, 2003, **300**, 1127.
- [31] H. Furukawa, K.E. Cordova, M. O'Keeffe, O.M. Yaghi, *Science*, 2013, **341**, 974.
- [32] B. Li, H.-M. Wen, Y. Cui, W. Zhou, G. Qian, B. Chen, *Adv. Mater.*, 2016, **28**, 8819.
- [33] G. Férey, C. Serre, T. Devic, G. Maurin, H. Jobic, P.L. Llewellyn, G. De Weireld, A. Vimont, M. Daturi, J.-S. Chang, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 550.
- [34] H. Li, M. Eddaoudi, M. O'Keeffe, O.M. Yaghi, *Nature*, 1999, **402**, 276.
- [35] S.S. Chui, S.M. Lo, J.P. Charmant, A.G. Orpen, I.D. Williams, *Science*, 1999, **283**, 1148.
- [36] G. Férey, C. Serre, C. Mellot-Draznieks, F. Millange, J. Dutour, S. Surblé, I. Margiolaki, *Int. Ed.*, 2004, **43**, 6296.
- [37] G. Férey, C. Mellot-Draznieks, C. Serre, F. Millange, J. Dutour, S. Surblé, I. Margiolaki, *Science*, 2005, **309**, 2040.
- [38] H.K. Chae, D.Y. Siberio-Perez, J. Kim, Y. Go, M. Eddaoudi, A.J. Matzger, M. O'Keeffe, O.M. Yaghi, *Nature*, 2004, **427**, 523.
- [39] M. Dincă, A. Dailly, Y. Liu, C.M. Brown, D.A. Neumann, J.R. Long, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 16876.
- [40] M. Dincă, W.S. Han, Y. Liu, A. Dailly, C.M. Brown, J.R. Long, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, **46**, 1419.
- [41] J. Liu, P.K. Thallapally, B.P. McGrail, D.R. Brown, J. Liu, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 2308.

- [42] Y. Peng, V. Krungleviciute, I. Eryazici, J.T. Hupp, O.K. Farha, T. Yildirim, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 11887.
- [43] O.K. Farha, I. Eryazici, N.C. Jeong, B.G. Hauser, C.E. Wilmer, A.A. Sarjeant, R.Q. Snurr, S.T. Nguyen, A.Ö. Yazaydin, J.T. Hupp, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 15016.
- [44] K. Xi, S. Cao, X. Peng, C. Ducati, R.V. Kumar, A.K. Cheetham, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 2192.
- [45] S.J. Yang, T. Kim, J.H. Im, Y.S. Kim, K. Lee, H. Jung, C.R. Park, *Chem. Mater.*, 2012, **24**, 464.
- [46] N.L. Torad, M. Hu, S. Ishihara, H. Sukegawa, A.A. Belik, M. Imura, K. Ariga, Y. Sakka, Y. Yamachi, *Small*, 2014, **10**, 2096.
- [47] J.-K. Sun, Q. Xu, *Energy Environ. Sci.*, 2014, **7**, 2071.
- [48] Y. Tan, Z. Jia, P. Lou, Z. Cui, X. Guo., *J. Power Sources*, 2017, **341**, 68.
- [49] R. Chen, T. Zhao, T. Tian, S. Cao, P.R. Coxon, K. Xi, D. Fairen-Jimenez, R.V. Kumar, A.K. Cheetham, *APL Materials*, 2014, **2**, 124109.
- [50] J. Yuan, Q. Liu, S. Li, Y. Lu, S. Jin, K. Li, H. Chen, H. Zhang, *Synth. Met.*, 2017, 228,
- [51] A.J. Amali, J.-K. Sun, Q. Xu, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 1519.
- [52] P. Pachfule, D. Shinde, M. Majumder, Q. Xu, *Nat. Chem.*, 2016, **8**, 718.
- [53] M. Saraji, N. Mehrafza, *J. Chromatogr. A*, 2016, **1460**, 33.
- [54] A Almasoudi, R. Mokaya, *J. Mater. Chem.*, 2012, **22**, 146.
- [55] G. Zhu, X. Li, H. Wang, L. Zhang, *Catal. Commun.*, 2017, **88**, 5.
- [56] X. Liu, S. Zhang, Y. Xing, S. Wang, P. Yang, H. Li, *New J. Chem.*, 2016, **40**, 9679.
- [57] X. Ge, Z. Li, L. Yin, *Nano Energy*, 2017, **32**, 117.
- [58] Y. Li, J. Miao, X. Sun, J. Xiao, Y. Li, H. Wang, Q. Xia, Z. Li, *Chem. Eng. J.*, 2016, **298**, 191.
- [59] J. Bieniek, A. Majchrzak, I. Majchrzak-Kucęba, *Inż. Ochr. Środow.*, 2012, **15**, 427.
- [60] F. Xu, Y. Yu, J. Yan, Q. Xia, H. Wang, J. Li, Z. Li, *Chem. Eng. J.* 2016, **303**, 231.
- [61] A. Ganesan, M.M. Shajumon, *Micropor. Mesopor. Mat.*, 2016, **220**, 21.
- [62] T. Zelenka, *Micropor. Mesopor. Mat.*, 2016, **227**, 202.
- [63] C. Petit, T.J. Bandosz, *Advanced Materials, Adv. Mater.*, 2009, **21**, 4753.
- [64] S. Liu, L. Sun, F. Xu, J. Zhang, C. Jiao, F. Li, Z. Li, S. Wang, Z. Wang, X. Jiang, H. Zhou, L. Yang, C. Schick, *Energy Environ. Sci.*, 2013, **6**, 818.
- [65] Y. Zhao, M. Seredych, Q. Zhong, T. J. Bandosz, *RSC Advances*, 2013, **3**, 9932.
- [66] X. Zhou, W. Huang, J. Miao, Q. Xia, Z. Zhang, H. Wang, Z. Li, *Chem. Eng. J.*, 2015, **266**, 339.
- [67] H. Zhou, J. Zhang, J. Zhang, X.-F. Yan, X.-P. Shen, A.-H. Yuan, *Inorg. Chem. Commun.*, 2015, **54**, 54.
- [68] R. Menzel, D. Iruretagoyena, Y. Wang, S.M. Bawaked, M. Mokhtar, S.A. Al-Thabaiti, S.N. Basahel, M.S.P. Shaffer, *Fuel*, 2016, **181**, 531.
- [69] Y. Jin, C. Zhao, Z. Sun, Y. Lin, L. Chen, D. Wang, C. Shen, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 30763.
- [70] Z. Wang, C. Gao, Y. Liu, D. Li, W. Chen, Y. Ma, C. Wang, J. Zhang, *Mater. Lett.*, 2017, **193**, 216.
- [71] T. Wei, M. Zhang, P. Wu, Y.-J. Tang, S.-L. Li, F.-C. Shen, X.-L. Wang, X.-P. Zhou, Y.-Q. Lan, *Nano Energy*, 2017, **34**, 205.
- [72] Y. Zhang, G. Li, H. Lu, Q. Lv, Z. Sun, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 7594.
- [73] Y. Wang, W. Zhang, X. Wu, C. Luo, T. Liang, G. Yan, J. Magn. Magn. Mater., 2016, **416**, 226.
- [74] Q. Yang, J. Wang, W. Zhang, F. Liu, X. Yue, Y. Liu, M. Yang, Z. Li, J. Wang, *Chem. Eng. J.*, 2017, **313**, 19.
- [75] L. Huang, B. Liu, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 17873.
- [76] J.H. Lee, S. Kang, J. Jaworski, K.-Y. Kwon, M.L. Seo, J.Y. Lee, J.H. Jung, *Chem. Eur. J.*, 2012, **18**, 765.
- [77] X. Qiu, X. Wang, Y. Li, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 3874.
- [78] P.C. Banerjee, D.E. Lobo, R. Middag, W.K. Ng, M.E. Shaibani, M. Majumder, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2015, **7**, 3655.
- [79] A. Bieniek, M. Wiśniewski, A.P. Terzyk, P. Bolibok, M. Dembek, *Inż. Ochr. Środow.*, 2016, **19**, 319.

- [80] I. Ahmed, S.H. Jhung, Mater. Today, 2014, **17**, 136.
- [81] Y. Gao, D. Ma, C. Wang, J. Guan, X. Bao, Chem. Commun., 2011, **47**, 2432.
- [82] M.D. Stoller, S. Park, Y. Zhu, J. An, R.S. Ruoff, Nano Lett, 2008, **8**, 3498.
- [83] G. Kutlu, Y.B. Gomceli, T. Sonmez, L.E. Inan, J. Clin. Neurosci., 2009, **16**, 1296.
- [84] V.K. Saini, J. Pires, J. Environ. Sci., 2017, **55**, 321.
- [85] European Union, Air quality standards, 2016 [dostęp: 2016-05-27] <http://ec.europa.eu/environment/air/quality/standards.html>.
- [86] Z. Bao, L. Yu , Q. Ren, X. Lu, S. Deng, J. Colloid Interf. Sci., 2011, **353**, 549.
- [87] X. Hu, M. Radosz, K. A. Cybosz, M. Thommes, Environ. Sci. Technol., 2011, **45**, 7068.
- [88] R. Krishna, Jasper M. van Baten, Sep. Purif. Technol., 2012, **87**, 120.
- [89] M. Alhamami, H. Doan, C.-H. Cheng, Materials, 2014, **7**, 3198.
- [90] R. Sabouni, H. Kazemian, S. Rohani, Environ. Sci. Pollut. Res. Int., 2014, **21**, 5427.
- [91] Y. Zhao, M. Seredych, J. Jagiello, Q. Zhong, T.J. Bandosz, Chem. Eng. J., 2014, **239**, 399.
- [92] W. Huang, X. Zhou, Q. Xia, J. Peng, H. Wang, Z. Li, Ind. Eng. Chem. Res., 2014, **53**, 11176.
- [93] A. Policicchio, Y. Zhao, Q. Zhong, R. G. Agostino, T.J. Bandosz, ACS Appl. Mater. Interfaces, 2014, **6**, 101.
- [94] Y. Zhao, Y. Cao, Q. Zhong, J. Clean Energy Technol., 2014, **2**, 34.
- [95] Q. Wang, Y. Yang, F. Gao, J. Ni, Y. Zhang, Z. Lin, ACS App. Mater. Interfaces, 2016, **8**, 32477.
- [96] B. Chen, N.W. Ockwig, A.R. Millward, D.S. Contreras, O.M. Yaghi, Angew. Chem. Int. Ed., 2005, **44**, 4823.
- [97] Y. Chen, D. Lv, J. Wu, J. Xiao, H. Xi, Q. Xia, Z. Li, Chem. Eng. J., 2017, **308**, 1065.
- [98] J.B. DeCoste, G.W. Peterson, B.J. Schindler, K.L. Killops, M.A. Browe, J.J. Mahle, J. Mater. Chem. A, 2013, **1**, 11922.
- [99] X. Liu, H. Zhou, Y. Zhang, Y. Liu. A. Yuan, J. Chem., 2012, **30**, 2563.
- [100] X. Zhou, W. Huang, J. Shi, Z. Zhao, Q. Xia, Y. Li, H. Wang, Z. Li, J. Mater. Chem. A, 2014, **2**, 4722.
- [101] X. Sun, Y. Li, H. Xi, Q. Xia, RSC Adv., 2014, **4**, 56216.
- [102] L. Li, Z. Shi, H. Zhu, W. Hong, F. Xie, K. Sun, Water. Sci. Technol., 2016, **73**, 1728.
- [103] X. Sun, Q. Xia, Z. Zhao, Y. Li, Z. Li, Chem. Eng. J., 2014, **239**, 226.
- [104] X. Zhou, W. Huang, J. Liu, H. Wang, Z. Li, Chem. Eng. Sci., 2017, **167**, 98.
- [105] R. Kumar, K. Jayaramulu, T.K. Maji, C.N.R. Rao, Chem. Commun., 2013, **49**, 4947.
- [106] Y. Zhou, L. Zhou, X. Zhang, Y. Chen, Micropor. Mesopor. Mater., 2016, **225**, 488.
- [107] G.-G Liu, M.-X. Wan, Z.-H. Huang, F.-Y. Kang, New Carbon Mater., 2015, **30**, 566.
- [108] Y. Cao, Y. Zhao, Z. Lv, F. Song, Q. Zhong, J. Ind. Eng. Chem., 2015, **27**, 102.
- [109] L. Su, J. Hu, K. Wang, Y. Wang, W. Zhang, Y. Cao, N. Zhao. Mater. Manuf. Process., 2016, **31**, 141.
- [110] US Department Of Energy, Targets for onboard hydrogen storage systems for light-duty vehicles. http://energy.gov/sites/prod/files/2015/01/f19/fcto_myrrd_table_onboard_h2_storage_systems_doe_targets_ldv.pdf (2012) [dostęp: 31.05.2017].
- [111] S. Satyapal, J. Petrovic, C. Read, G. Thomas, G. Ordaz, Catal. Today, 2007, **120**, 246.
- [112] The Advanced Research Projects Agency – Energy (ARPA-E) of the U.S Department of Energy. DE-FOA-0000672: Methane Opportunities for Vehicular Energy (MOVE). [https://arpa-e-foa.energy.gov/Default.aspx?Search=move&SearchType=\[dostęp: 31.05.2017\]](https://arpa-e-foa.energy.gov/Default.aspx?Search=move&SearchType=[dostęp: 31.05.2017]).
- [113] J.A. Mason, M. Veenstra, J.R. Long, Chem. Sci., 2014, **5**, 32.
- [114] T.E. Rufford, S. Smart, G.C.Y. Watson, B.F. Graham, J. Boxall, J.C. Diniz da Costa, E.F. May, J. Petrol. Sci. Eng., 2012, **94–95**, 123.
- [115] M. Tagliabue, D. Farrusseng, S. Valencia, S. Aguado, U. Ravon, C. Rizzo, A. Corma, C. Mirodatos, Chem. Eng. J. 2009, **155**, 553.
- [116] H. Furukawa, N. Ko, Y. B. Go, N. Aratani, S.B. Choi, E. Choi, A.O. Yazaydin, R.Q. Snurr, M. O'Keefe, J. Kim, O.M. Yaghi, Science, 2010, **329**, 424.

- [117] K. Koh, A.G. Wong-Foy, A.J. Matzger, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 4184.
- [118] D. Yuan, D. Zhao, D. Sun, H.C. Zhou, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, **49**, 5357.
- [119] Y. Yan, I. Telepeni, S.H. Yang, X. Lin, W. Kockelmann, A. Dailly, A.J. Blake, W. Lewis, G.S. Walker, D.R. Allan, S.A. Barnett, N.R. Champness, M. Schröder, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 4092.
- [120] Y. Yan, X. Lin, S.H. Yang, A. J. Blake, A. Dailly, N.R. Champness, P. Hubberstey, M. Schröder, *Chem. Commun.* 2009, **7**, 1025.
- [121] O.K. Farha, A.Ö. Yazaydin, I. Eryazici, C.D. Malliakas, B.G. Hauser, M.G. Kanatzidis, S.T. Nguyen, R.Q. Snurr, J.T. Hupp, *Nat. Chem.*, 2010, **2**, 944.
- [122] M.P. Suh, H.J. Park, T.K. Prasad, D.-W. Lim, *Chem. Rev.*, 2012, **112**, 782.
- [123] B. Chen, S. Xiang, G. Qian, *Chem. Res.*, 2010, **43**, 1115.
- [124] Y.-G. Lee, H.R. Moon, Y.E. Cheon, M.P. Suh, *Chem. Int. Ed. Engl.*, 2008, **47**, 7741.
- [125] L.J. Murray, M. Dincă, J.R. Long, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**, 1294.
- [126] D. Zhao, D. Yuan, H.-C. Zhou, *Energy Environ. Sci.*, 2008, **1**, 222.
- [127] D. Saha, S. Deng, *Tsinghua Sci. Technol.*, 2010, **15**, 363.
- [128] H. Zhou, J. Zhang, J. Zhang, X. Yan, X. Shen, A. Yuan, *Int. J. Hydrogen Energ.*, 2015, **40**, 12275.
- [129] H. Zhou, X. Liu, J. Zhang, X. Yan, Y. Liu, A. Yuan, *Int. J. Hydrogen Energy*, 2014, **39**, 2160.
- [130] J. Zhang, X. Liu, H. Zhou, X. Yan, Y. Liu, A. Yuan, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 28908.
- [131] Y. Li, R.T. Yang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 8136.
- [132] Y. Li, R.T. Yang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 726.
- [133] Y. Li, R.T. Yang, *AJChE J.*, 2008, **54**, 269.
- [134] D. Alezi, Y. Belmabkhout, M. Suetin, P.M. Bhatt, Ł.J. Weseliński, V. Solovyeva, K. Adil, I. Spanopoulos, P.N. Trikalitis, A.-H. Emwas, M. Eddaaoudi, *J. Am. Chem. Soc.* 2015 , **137**, 13308.
- [135] L. Mahmoudian, A. Rashidi, H. Dehghani, R. Rahighi, *Chem. Eng. J.*, 2016, **304**, 784.
- [136] Y. Peng, G. Srinivas, C.E. Wilmer, I. Eryazici, R.Q. Snurr, J.T. Hupp, T. Yildirim, O.K. Farha, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 2992
- [137] B. Li, H.-M. Wen, W. Zhou, J.Q. Xu, B. Chen, *Chem.*, 2016, **1**, 557.
- [138] A.A. García Blanco, A.F. Vallone, S.A. Korili, A. Gil, K. Sapag, *Micropor. Mesopor. Mater.*, 2016, **224**, 323.
- [139] Y. Shen, Z. Li, L. Wang, Y. Ye, Q. Liu, X. Ma, Q. Chen, Z. Zhang, S. Xiang, *J. Mater. Chem. A*, 2015, **3**, 593.

Praca wpłynęła do Redakcji 20 lipca 2017

MODULOWANIE WŁAŚCIWOŚCI PEPTYDÓW PENETRUJĄCYCH DO KOMÓREK

MODULATING PROPERTIES OF THE CELL PENETRATING PEPTIDES

Wojciech Lipiński*, Beata Kolesińska

Instytut Chemii Organicznej, Politechniki Łódzkiej

ul. Żeromskiego 116, 90-924 Łódź

**e-mail: wojtek.p.lipinski@gmail.com*

Abstract

Wprowadzenie

1. Peptydy penetrujące błony komórkowe
 - 1.1. Definicja peptydów penetrujących błony komórkowe
 - 1.2. Klasyfikacja CPPs
 - 1.3. Modulowanie właściwości CPPs
 2. Mechanizm przenikania CPPs przez błony komórkowe
 - 2.1. Endocytoza
 - 2.2. Transport bezpośredni
 3. Zastosowanie CPPs jako transporterów związków chemicznych do komórek
 - 3.1. Aktywowanie CPPs – wzrost selektywności przenikania do komórek
 4. Zastosowanie CPPs w terapii i diagnostyce
- Podsumowanie
- Podziękowanie
- Piśmiennictwo cytowane



inż. Wojciech Lipiński studiuje Chemicę na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej. Badania do pracy magisterskiej prowadzi w zespole dr hab. inż. Beaty Kolesińskiej. Zainteresowania naukowe to aktywne biologicznie peptydy i materiały peptydowe.



dr hab. inż. Beata Kolesińska, prof. PŁ jest pracownikiem Instytutu Chemii Organicznej Politechniki Łódzkiej. Jej zainteresowania naukowe koncentrują się wokół syntezy peptydów o zróżnicowanej aktywności biologicznej i ich szerokim wykorzystaniu, poczynając od leków o budowie peptydowej, materiałów peptydowych tworzonych w procesie samoorganizacji peptydów, badań nad agregacją peptydów/białek i poszukiwaniu inhibitorów tego procesu, a skończywszy na oddziaływaniach peptydów z białkami (przeciwciałami). Autor 74 prac naukowych oraz 28 patentów i zgłoszeń patentowych.

ABSTRACT

Cell penetrating peptides (CPPs) are short peptides able to efficiently cross cellular membrane. The group includes great diversity of sequences and besides capability to enter various types of cells, their characteristic feature is lack of toxicity. CPPs can be divided according to their origin (natural and synthetic) or according to their physicochemical properties responsible for the cellpenetrating ability (cationic, amphipathic and hydrophobic).

Properties of CPPs are closely related to their mechanism of internalisation. Endocytic pathway is probably the dominating mechanism for majority of CPPs, but less common energyindependent internalisation (occurring via inverted micelle, carpet-like, barrel stave pore or toroidal pore model may also play a relevant part in the uptake across membranes.

CPPs have been applied in transporting various compounds. They are very effective in delivering small molecules (fluorophores, drugs, peptides), macromolecules (proteins, nucleic acids) and even nanoparticles (metal nanoparticles, liposomes). Conjunction of CPP and cargo can be achieved either covalently (peptide bond, sulphide bridge etc.) or noncovalently (electrostatic or hydrophobic interaction, hydrogen bonding).

Ability to unspecific enter almost any kind of cell and tissue becomes a great problem in the case of *in vivo* applications. Another disadvantage of CPPs is their low plasma stability. Many strategies have been suggested to overcome these issues. Selectivity can be improved by attaching targeting ligands (e.g. short peptides, antibodies, proteins, folic acid or hyaluronic acid) or by incorporating CPPs into macromolecular drug carriers, which exploit the so called enhanced permeability and retention (EPR) effect. The most recent and most sophisticated way of improving CPPs' stability and selectivity is the synthesis of activatable cell penetrating peptides (ACPPs). The deactivating moiety may consist of anionic sequence, polymer chain or smaller protecting groups. The deactivating parts are connected to the delivery system *via* linker that can be cleaved under conditions characteristic for the site of action. ACPPs may be activated by enzymes, pH and oxidative potential change, temperature or radiation.

CPPs may find application in tumour therapy, diagnostics and the combination of both – theranostics. Despite many successful studies in delivering drugs and tags *in vivo* and *in vitro*, CPPs have passed only few clinical trials (some are being run currently). It is sure that this research area will develop in next years.

Keywords: cell penetrating peptides (CPPs), activatable cell penetrating peptides (ACPPs), cargo, transport into the cells, mechanism of penetration

Słowa kluczowe: peptydy penetrujące do komórek, aktywowlane peptydy zdolne do przenikania przez błony komórkowe, cargo, transport różnych związków do komórki, mechanizm przenikania przez błony komórkowe

WPROWADZENIE

W 1988 r. dwie niezależne grupy badawcze [1, 2] zaobserwowały, że białko tat wirusa HIV-1 zdolne jest do efektywnego przenikania przez błonę komórkową. Ponadto wykazano, że białko to wiąże się z DNA jądrowym i wpływa na jego ekspresję. Innym polipeptydem wykazującym zdolność przenikania przez błonę komórkową jest białko kodowane przez geny homeotyczne muszki owocowej (*Drosophila homeobox*), odpowiedzialne za morfogenezę [3]. Zdolność przenikania błon komórkowych przez polipeptydy była na tyle zaskakująca i intrygująca, że niemal natychmiast podjęto poszukiwania najkrótszych fragmentów wykazujących taką aktywność. Stwierdzono, że w przypadku białka wywodzącego się z homeodomery Antennapedia jest to 16-aminokwasowy peptyd [4] o sekwencji RQIKIWFQNR-RMKWKK, znany obecnie jako penetratyna. Zidentyfikowano również 11-aminokwasowy peptyd wywodzący się z białka tat [5, 6] o sekwencji GRKKRRQRRRPQ, powszechnie nazywany peptydem TAT.

Odkrycia te dały impuls do dalszych badań nad peptydami zdolnymi do przenikania błon komórkowych oraz nad możliwościami ich szerokiego wykorzystania w praktyce. Obecnie w literaturze naukowej opisane są setki peptydów penetrujących komórki [7, 8], określanych akronimem CPPs, utworzonym z angielskiego terminu *cell penetrating peptides*. Zainteresowanie CPPs wynika z przekonania o ich zdolności do transportu przez błony komórkowe różnego rodzaju związków.

1. PEPTYDY PENETRUJĄCE BŁONY KOMÓRKOWE

1.1. DEFINICJA PEPTYDÓW PENETRUJĄCYCH BŁONY KOMÓRKOWE

Peptydy penetrujące błony komórkowe są krótkimi peptydami zawierającymi zwykle do 40 reszt reszt aminokwasowych. Z punktu widzenia ich struktury pierwoszorządowej charakteryzują się znaczną różnorodnością. Ich jedyną cechą wspólną jest zdolność do penetracji błon komórkowych i przenikania do wnętrza komórek. Do ogólnych właściwości CPPs zalicza się również ich niską toksyczność.

Wykazano, że charakteryzują się one zdolnością do przenikania do wnętrza niemalże wszystkich testowych pod tym kątem komórek zwierząt [9], roślin, drożdży i bakterii [10, 11]. Posiadają one ponadto zdolność transportu do wnętrza komórek szerokiej gamy związków o zróżnicowanych strukturach [7]. Wśród niewielu przykładów wykazujących ograniczenia CPPs są komórki linii MDCK (*Madin Darby Canine Kidney*) [12] niepodatne na penetrację przez dotychczas znane CPPs, w tym przez znakowany fluorescencyjnie peptyd TAT. Opisano pojedyncze przypadki cząsteczek, których CPPs nie mogą transportować przez błonę komórkową (należy do nich np. fragment A toksyny błoniczej) [13].

1.2. KLASYFIKACJA CPPs

Proponowane są różne kryteria klasyfikacji CPPs. Jeden z funkcjonujących podziałów oparty jest na pochodzeniu peptydów. Pierwszą grupę CPPs stanowią peptydy pochodzenia naturalnego. Do grupy tej należą: peptyd TAT, penetratyna, peptyd pVEC o sekwencji LLIILRRIRKQAHAAHSK (fragment kadheryny mysiego nabłonka, VE-cadherin) [14] oraz peptyd (HGLASTLTRWAHYNALIRAFGGG) wywodzący się z białka gH625, glikoproteiny H wirusa opryszczki [15]. Kolejnych peptydów o zdolności do penetrowania błony poszukuje się w obrębie białek wiążących się z heparyną, białek oddziaływujących z kwasami nukleinowymi, naturalnych peptydów przeciwdrobnoustrojowych wydzielanych przez komórki śród-błonka i fagocyty oraz białek wirusowych [16]. Drugą grupę CPPs stanowią peptydy syntetyczne, które projektowane są w oparciu o motywów strukturalnych CPPs. Nowe CPPs odkrywane są często na drodze przeszukiwania bibliotek peptydowych, korzystając z metody ekspozycji fagowej lub ekspozycji RNA.

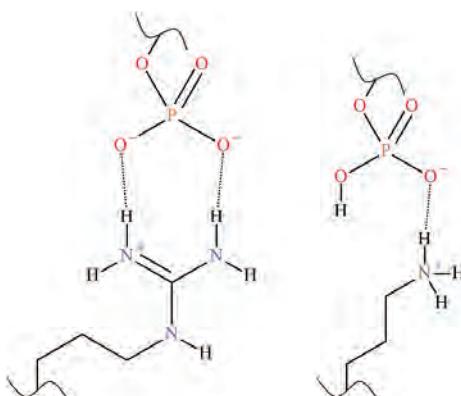
Podział peptydów penetrujących komórkę można także dokonać biorąc pod uwagę ich właściwości fizykochemiczne, determinujące zdolność do przenikania przez błonę lipidową. Stąd wyróżnia się CPPs: kationowe, amfifilowe i hydrofobowe.

Kationowe CPPs

Większość opisanych CPPs posiada wypadkowy ładunek dodatni, jednak do grupy kationowych peptydów penetrujących komórkę zalicza się jedynie te, które zawierają dodatnio naładowane reszty aminokwasowe, warunkujące zdolność do przenikania przez błonę. W oparciu o tę definicję naturalne CPPs, takie jak peptyd TAT i penetratyna, zaliczyć można do grupy kationowych peptydów penetrujących komórkę.

Obecność zasadowych reszt aminokwasowych w sekwencji CPPs zwiększa zdolność ich przenikania przez błonę komórkową dzięki silnemu oddziaływaniu z ujemnie naładowanymi lipidami i polisacharydami błon komórkowych. Dowodem na kluczową rolę zasadowych reszt aminokwasowych w strukturach kationowych CPPs był wynik eksperymentu, w którym kolejne reszty peptydu TAT [17] oraz penetratyny [18] zamieniane były na reszty alaniny.

Wykazano, że CPPs zawierające reszty argininy penetrują błony komórkowe znacznie efektywniej niż analogi zawierające reszty pozostałych aminokwasów zasadowych: lizyny, ornityny czy histydyny [19]. Efekt ten przypisuje się silnym wiązaniom wodorowym pomiędzy grupą gunidynową a resztami fosforanowymi [20] oraz anionowymi grupami polisacharydów membranowych [21].



Rysunek 1. Wiązania wodorowe pomiędzy grupą guanidynową reszty argininy lub grupą aminową reszty lizyny a grupą fosforanową: Silne oddziaływanie argininy z błoną lipidową wynika z tworzenia dwóch wiązań wodorowych pomiędzy grupą guanidynową a resztami kwasowymi na powierzchni błony komórkowej. Grupa aminowa lizyny utworzyć może tylko jedno wiązanie wodorowe

Figure 1. Hydrogen bonds between guanidinium group of arginine residue or amine function of lysine and phosphate group: Strong interaction between arginine and lipid membrane stems from the formation of two hydrogen bonds between guanidinium group and acid residues on the membrane surface. Amine group of lysine can form only one H-bond

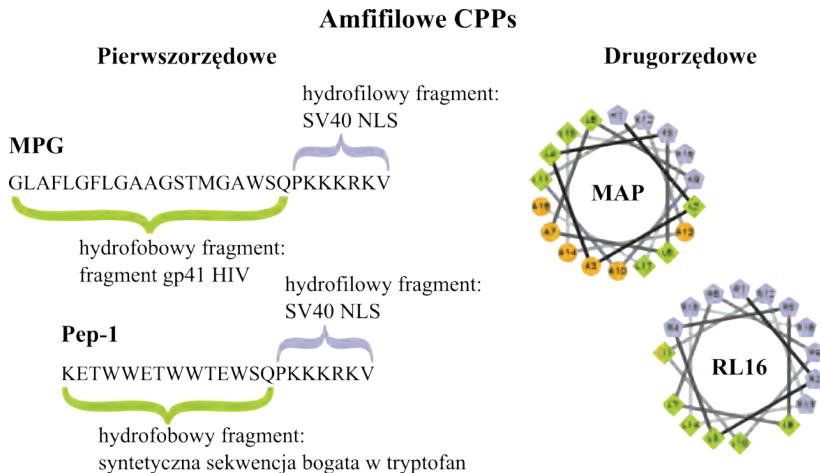
Obecność takich oddziaływań potwierdziły również wyniki izotermicznej kalorymetrii miareczkowej [22, 23]. Po dostrzeżeniu szczególnej roli reszt argininy w transporcie przez błonę otrzymano CPPs składające się wyłącznie z tego aminokwasu. Poliargininy zawierające co najmniej sześć reszt aminokwasowych charakteryzowały się efektywnym przenikaniem przez błonę komórkową. Uznaje się, że optymalna liczba reszt aminokwasowych w łańcuchu CPP wynosi 8–9 [24, 25]. Jednakże nawet peptyd złożony z jedenastu reszt argininy [26] przewyższa zdolność do przenikania zarówno penetratyne jak i peptyd TAT.

Użyteczność CPPs nie jest oczywiście w prosty sposób zależna od liczby reszt argininy w łańcuchu peptydowym. Porównanie modyfikowanych argininą polimerowych nanocząstek wykazało, że cząstki modyfikowane ośmioma resztami (R_8) wnikały co prawda do komórek efektywniej od nanomateriału modyfikowanego tylko czterema resztami argininy, jednak stwierdzono, że w obu przypadkach ich transport zachodzi według odmiennych mechanizmów [27].

Uważa się, że w szczególnych przypadkach aktywność penetrująca kationowych CPPs może wynikać z ich możliwości do przyjmowania struktury helikalnej. Przykładem może być „miniatura białko 5.3” o sekwencji GPSQPTYPGDDAPVR-DLIRFYRDLRRLNVVTRHRY, którego pięć reszt argininy zlokalizowanych jest po jednej stronie helisy („penta-arg”). Wykazał on lepsze właściwości penetrujące od TAT oraz R8, co związane jest z jego zdolnością do szybkiego opuszczania endosomów [28]. Formułowane są również obawy przed nazbyt szerokim wykorzystaniem polikationowych CPPs, wynikające z braku dostatecznej znajomości mechanizmów wiązania ich z DNA [29] i ewentualnych następnych zmian w regulacji i ekspresji genów.

AMFIFILOWE CPPs

Amfifilowe CPPs podzielone zostały na pierwszorzędowe i drugorzędowe. Amfifilowość pierwszorzędowych CPPs wynika bezpośrednio z sekwencji aminokwasowej peptydu, gdzie obecne są dwa jednoznacznie zdefiniowane fragmenty: jeden składający się z reszt aminokwasów hydrofobowych i drugi zawierający reszty o charakterze hydrofilowym. W drugorzędowych amfifilowych CPPs sekwencja nie zawiera wyraźnych regionów hydrofobowych i hydrofilowych, a ich właściwości amfifilowe są skutkiem przyjmowania odpowiedniej konformacji przez łańcuch peptydowy [16].



Rysunek 2. Amfifilowe CPPs dzielą się na pierwszorzędowe (przykłady z zaznaczonymi fragmentami hydrofilowymi i hydrofobowymi) oraz drugorzędowe (przedstawione projekcje α -helis przykładowych drugorzędowych amfifilowych CPPs)

Figure 2. Amphipathic CPPs can be divided into primary (examples with indicated hydrophobic and hydrophilic fragments) and secondary (projections of α -helices of secondary amphipathic CPPs)

Wiele pierwszorzędowych amfifilowych CPPs zsyntetyzowano łącząc, wywodzące się z różnych białek, domeny hydrofobowe z peptydem lokalizującym jądro komórkowe (ang. *nuclear localization sequence*, NLS). NLSs to krótkie hydrofilowe peptydy, rozpoznawane przez białka porów jądrowych. NLSs zawierają wiele reszt aminokwasów zasadowych, jednak same nie są zdolne do przenikania przez błonę komórkową. Przykładem wykorzystania NLS jest koniugat o sekwencji GLAFLG-FLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV, złożony z fragmentu NLS (wywodzącego się z antygenu T wirusa SV40) oraz hydrofobowej domeny glikoproteiny wirusa HIV-1. Wykorzystany został jako układ transportujący do komórek niekowalencyjnie związane z peptydem geny (*peptide-based gene delivery system*) [30]. Grupę CPPs wykazujących zdolność transportowania do komórek różnego rodzaju związków (cargo) bez konieczności kowalencyjnego łączenia CPPs określono symbolem Pep [31]. Najlepiej poznanym przykładem Pep był Pep-1 [32] o sekwencji KETWWETWW-

TEWSQPKKKRKV. Jest to koniugat bogatego w reszty tryptofanu hydrofobowego peptydu z NLS z antygenem T wirusa SV40.

Drugorzędowe amfifilowe CPPs posiadają zdolność przyjmowania konformacji amfifilowej α -helisy lub β -kartki. W konformacjach tych reszty hydrofilowe i hydrofobowe ulokowane są po przeciwnych stronach uporządkowanej struktury. Wiele peptydów penetrujących błony komórkowe posiada właściwości amfifilowe i wiele z nich tworzy struktury helikalne, ale do grupy amfifilowych CPPs zalicza się tylko te, których zdolność do penetrowania błony nie zależy od wypadkowego ładunku po stronie hydrofilowej.

Do porównania udziału oddziaływań hydrofobowych i elektrostatycznych w przenikaniu przez błony komórkowe CPPs wykorzystano dwie niezależne metody. Jedna z nich polegała na uzyskaniu pochodnych amfifilowego CPP (ang. *model amphipatic peptide*, MAP) o wypadkowym ładunku obojętnym oraz o ładunku ujemnym. Stwierdzono, że oba peptydy posiadały zdolność do przenikania do komórek [33]. W drugiej metodzie, porównano oddziaływanie penetratyny (RQIKIWFQNRRMKWKK) i peptydu RL16 (RRLRLLRRLRRLRR) z wielowarstwowymi liposomami zbudowanymi z anionowych i amfoterycznych lipidów [34]. Stwierdzono, że penetratyna przybiera konformację α -helisy jedynie w trakcie oddziaływania z anionowymi lipidami, co ułatwia jej przenikanie przez błony, nie oddziałuje zaś z amfoterycznymi lipidami, co potwierdza duże znaczenie oddziaływań elektrostatycznych. Natomiast peptyd RL16 przyjmuje konformację amfifilowej α -helisy w roztworze buforu i oddziałuje zarówno z anionowymi jak i obojętnymi lipidami. Obecność wielu reszt argininy skutkuje silnymi oddziaływaniami pomiędzy RL16 a anionowymi lipidami, co paradoksalnie może sprzyjać wiązaniu peptydu do powierzchni liposomu i ograniczać jego przenikanie. Podobne badania wykonano również dla większej grupy peptydów i wykazano, że wiele z nich może przyjmować uporządkowane struktury w obecności anionowych lipidów, co umożliwia im przenikanie przez błonę [35].

Amfifilowych CPPs o konformacji β -harmonijki opisanych zostało znacznie mniej w porównaniu do CPPs o strukturze ahelikalnej. Ograniczenie ich zastosowania wynika z podatności do agregacji i obniżonej rozpuszczalności. Przykładem rozpuszczalnego CPP o strukturze β -harmonijki jest peptyd VT5 o sekwencji aminokwasowej DPKGDPKGVTVTVTGTGKGDPKPD [36, 37]. Gdy peptyd poddano modyfikacji poprzez wprowadzenie reszt D-aminokwasów w pozycje 13 i 14 (D-Val¹³, D-Thr¹⁴), okazało się, że utracił on zdolność tworzenia struktury β -harmonijki i niemalże całkowicie zdolność przenikania przez błonę komórkową [36]. Innym przykładem CPP o strukturze β -harmonijki jest fragment ludzkiej aneksyny, znany jako peptyd AA3H o strukturze MASIWVGHRG. Wykazano w badaniach *in vitro*, że peptyd ten charakteryzuje się wyższą zdolnością penetracji błon komórkowych od peptydu TAT [38].

W literaturze chemicznej opisana jest również trzecia grupa amfifilowych CPPs, czyli peptydy bogate w prolinę [39]. Ich szczególną właściwością jest zdol-

ność do tworzenia poliprolinowych helis, głównie typu PPII (lewośkrętna helisa pozbawiona wiązań wodorowych) [16]. Jednym z CPPs bogatych w reszty proliny jest peptyd Bac₁₋₂₄ o sekwencji RRIRPRPPRPLRPRPRLPFPRPG, wyodrębniony z białka przeciwdrobnoustrojowego Bac 7 [40]. Znane są również peptydy syntetyczne o sekwencjach (PRR)_n i (PPR)_n (n = 3–6), z których najdłuższe wykazały silniejszą zdolność do przenikania przez błonę komórkową od poliargininy [41]. Do grupy tej zaliczany jest również peptyd SAP [42] o sekwencji (VRLPPP)₃, który stanowi modyfikację motywów strukturalnych γ-zeiny (białka kukurydzego bogatego w prolinę) [43]. Modyfikacja polega na zastąpieniu reszt histydyny resztami argininy. Pochodna SAP, w której reszty argininy zastąpiono resztami kwasu glutamino-wego, również przenika przez błony komórkowe [42]. Potwierdza to, że zdolność do penetracji wynika w głównej mierze z drugorzędowej struktury, a nie z obecności dodatkowo naładowanych łańcuchów bocznych.

HYDROFOBOWE CPPS

Grupa hydrofobowych CPPs jest zdecydowanie mniej liczna od grupy peptydów kationowych oraz amfifilowych. Należą do niej peptydy o właściwościach penetrujących, zawierające apolarne reszty aminokwasowe lub hydrofobowy fragment niepeptydowy odpowiedzialny za zdolność do transportu przez błonę. Przewaga reszt hydrofobowych i ładunek wypadkowy bliski zeru sprzyjają transportowi bezpośredniemu [44]. Naturalnym hydrofobowym CPP jest peptyd FGF12₁₄₀₋₁₄₉ o sekwencji PIEVC MYREP, będący fragmentem czynnika wzrostu 12 fibroblastów [45]. Kolejnym przykładem może być peptyd C105Y o sekwencji CSIPPEVKFNKP-FVYLI, wywodzący się z α₁-antytrypsyny [46].

Do hydrofobowych CPPs zaliczyć można również peptyd Xentry o strukturze LCLRPVG wyizolowany z białka X wirusa zapalenia wątroby typu B, choć sami autorzy opisują peptyd jako nieprzystający do żadnej z wymienionych powyżej grup CPPs [47]. Fakt ten dokumentuje, jak bardzo klasyfikacja CPP jest umowna. Xentry wyróżnia zdolność do przenikania jedynie do komórek produkujących syndekan, obecny w wielu komórkach (w szczególności w komórkach nabłonka) [47].

Zaproponowano również kilka sposobów poprawiania właściwości penetrujących a tym samym również transportujących CPPs przez dołączenie hydrofobowych fragmentów niepeptydowych. Jednym z nich jest prenylowanie peptydów, czyli przyłączenie jednostek izoprenoidowych (15-węglowego farnezylu lub 20-węglowego geranylgerenu). Prenylowanie peptydów ułatwia ich przenikanie przez błonę na drodze transportu pasywnego, niewymagającego dostarczenia energii [48]. Inny sposób włączenia hydrofobowego fragmentu polega na dobudowaniu reszty kwasu tłuszczyńskiego do N-końca peptydu [49]. Modyfikowane w ten sposób peptydy nazywa się pepducynami (*pepducins*). Obecność długiego łańcucha alifatycznego skutkuje często gromadzeniem się peptydu na powierzchni błony komórkowej i tylko w niektórych przypadkach wspomaga przenikanie przez błonę. Przykładowo,

modyfikowany łańcuchem lipidowym transportan 10 przenika z większą wydajnością, ale lipidowana pochodna R9 lub penetratyny nie wykazuje lepszej zdolności przenikania przez błony komórkowej w porównaniu do peptydu niemodyfikowanego [49].

Poza zastosowaniem opisanych modyfikacji, zdolność wybranych peptydów do przenikania przez błony komórkowe może być zwiększoną przez usztywnienie struktury α -helisy mostkami węglowodorowymi (*stapled peptides*) [50, 51]. Należy podkreślić, że usztywnianie peptydów poprzez tworzenie mostków nie zawsze poprawia ich zdolność przenikania przez błony komórkowe. Do chwili obecnej mechanizm oddziaływania i penetracja błon komórkowych przez usztywnione analogii CPPs nie jest dokładnie poznany [52].

1.3. MODULOWANIE WŁAŚCIWOŚCI CPPS

Poza wspomnianymi już aminokwasami zasadowymi niektóre aminokwasy włączone w sekwencje CPPs poprawiają ich zdolność penetracji. Na właściwości CPPs korzystnie wpływać może obecność histydyny, chociaż nie wykazuje ona tak silnych oddziaływań z błoną lipidową jak arginina czy lizyna. Wartość pK_{aH} histydyny ($pK_{\text{aH}} \approx 6$) jest nieznacznie niższa od fizjologicznego pH (ok. 7,4). Reszty histydyny ulegają protonowaniu wewnątrz endosomów, gdzie pH wynosi około 5–6,5. Gromadzenie się ładunku wewnątrz endosomu destabilizuje membranę lipidową i ułatwia „ucieczkę” jego zawartości do cytoplazmy. Modyfikowany peptyd TAT z dołączonymi resztami histydyny sprawniej przedostaje się do cytoplazmy niż peptyd niemodyfikowany [53]. Podobnie modyfikowana pochodna nonaargininy (HR9 o sekwencji CHHHHHRRRRRRRRHHHHHC) również wykazuje lepsze właściwości transportujące niż R9 [54]. Modyfikacjom resztami histydyny poddano także rodzinę PepFect, drugorzędowych amfifilowych CPPs [55]. W tym wypadku protonowanie reszt histydyny powodowało destabilizację struktury α -helisy, skutkującą łatwiejszą ucieczką z endosomu.

Szczególną rolę w tranporcie przez błonę lipidową odgrywa także tryptofan. Spośród wszystkich reszt hydrofobowych w penetratynie jedynie wymiana tryptofanu skutkuje ograniczeniem zdolności do przenikania przez błonę komórkową [56]. Zaprojektowano i przebadano wiele syntetycznych CPPs celem wyjaśnienia, jaki jest wypadkowy efekt wywołany obecnością reszt argininy i tryptofanu. Przykładami mogą być (i) peptyd RW9 [57] o sekwencji RRWWRRWRR, (ii) cykliczny deka-peptyd z ułożonymi na przemian resztami tryptofanu i argininy [WR]5 o sekwencji c(RWRWRWRWRW) [58] oraz (iii) samoorganizujące się CPPs złożone z tryptofanu, lizyny i glutaminy [59]. Analog RW9 z resztami tryptofanu zamienionymi na reszty fenyloalaniny wiązał się z błoną komórkową, ale nie przenikał do wnętrza komórki [60]. Uważa się, że tryptofan zdolny jest do tworzenia wyjątkowo korzystnych oddziaływań ze składnikami błony komórkowej poprzez wiązania wodorowe oraz oddziaływanie hydrofobowe. Założenie to oparte jest na obserwacji, że natu-

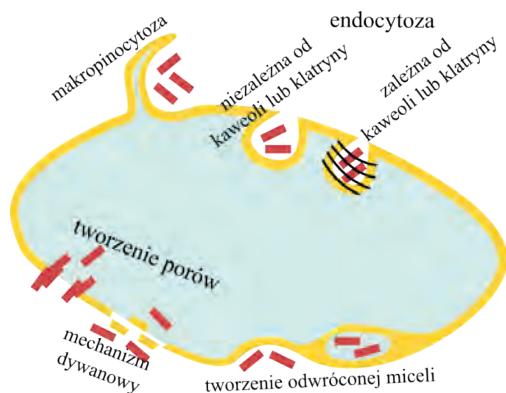
ralne białka transbłonowe zawierają znaczące ilości tego aminokwasu [61]. Ponadto sugeruje się, że obecność tryptofanu w sekwencji CPPs sprzyjać może przenikaniu na drodze endocytozy, dzięki promowaniu oddziaływań z glikozaminoglikanami [62].

Właściwości CPPs poprawić można także poprzez wbudowanie do łańucha peptydowego reszty cysteiny. Jej rolą jest stabilizowanie peptydu przez tworzenie międzycząsteczkowych mostków disulfidowych. Na potwierdzenie tej tezy wskazuje się odporność na degradację enzymatyczną maurokalcyну zawierającą trzy mostki sulfidowe [63]. Obecność cysteiny umożliwia tworzenie struktur usieciowanych poprzez powolne utlenianie grup tiolowych. Stosując jako monomery polilizynę [64] i poliargininę [65] modyfikowane cysteiną zsyntetyzowano kationowe makrocząsteczki tworzące kompleksy z kwasami nukleinowymi. Utworzone kompleksy posiadały zdolność przenikania do wnętrza komórek i ulegały następcej redukcji z uwalnieniem DNA lub RNA. Cysteina okazała się także niezbędna do zachowania właściwości penetrujących wspomnianego już peptydu Xentry, jednak jej rola w procesie transportu tego peptydu nie została jeszcze wyjaśniona [66].

Modyfikacje, które nie występują w prostych naturalnych polipeptydach zbudowanych z kodowanych aminokwasów, także mogą wpływać korzystnie na właściwości CPPs. Do modyfikacji tych należą acylowanie resztami kwasów tłuszczykowych, prenylowanie oraz cyklizacje, które zwiększą hydrofobowość układu. Wbudowanie ornityny do łańucha peptydowego pozwala na uzyskanie aktywności zbliżonej do argininy [67], zaś obecność fosfotyrozyny i/lub fosfotreoniny zwiększa hydrofilowość peptydu [68]. Wbudowywanie niekodowanych reszt aminokwasowych o konfiguracji D- lub β -aminokwasów poprawia odporność CPPs na degradację enzymatyczną [69, 70].

2. MECHANIZM PRZENIKANIA CPPS PRZEZ BŁONY KOMÓRKOWE

Od momentu odkrycia CPPs podejmowane są próby wyjaśnienia mechanizmu przenikania peptydów przez błonę komórkową. Pierwsze badania nad penetratyną, TAT, poliargininą oraz transportanem wskazywały, że peptydy te przenikają przez błony komórkowe na drodze niewymagającej dostarczenia energii i bez udziału białek receptorowych i transporterowych [4, 6, 22, 71]. Jednakże późniejsze badania wykazały, że, poza wyjątkowymi przypadkami, transport przez błony komórkowe zachodzi głównie na drodze endocytozy [72]. Od tego czasu zaproponowano wiele różnych dróg przenikania CPPs do komórek i obecnie przyjmuje się, że nie istnieje uniwersalny mechanizm tłumaczący transport wszystkich rodzajów CPPs (Rys. 3).



Rysunek 3. Mechanizmy transportu CPPs przez błonę: CPPs mogą przenikać do wnętrza komórki na drodze endocytozy (makropinocytozy oraz pinocytozy zależnej lub niezależnej od receptorów) lub w wyniku transportu bezpośredniego (przez tworzenie porów lub odwróconej miceli).

Figure 3. Mechanisms of transmembrane transport of CPPs: CPPs may internalise into cells via endocytic pathway (macropinocytosis or receptor-dependent and receptor-independent pinocytosis) or through direct transport (via pore or inverted micelle formation).

Różne czynniki (budowa CPPs, wypadkowy ładunek CPPs, stężenie peptydu, temperatura oraz rodzaj komórek) decydują o mechanizmie przenikania CPPs przez błonę komórkową. Przenikanie zachodzić może na drodze endocytozy lub na drodze transportu bezpośredniego.

2.1. ENDOCYTOZA

Endocytoza polega na tworzeniu pęcherzyków (endosomów) przez fragment błony komórkowej, które następnie przemieszczają do wnętrza komórki. Jednym z rodzajów endocytozy jest fagocytoza, która zachodzi w wyspecjalizowanych komórkach (np. makrofagach) i pozwala przenosić do wnętrza komórek duże struktury (wirusy, inne komórki itd). Kolejnym typem endocytozy jest pinocytoza, którą do transportu różnorodnych związków chemicznych rozpuszczalnych w wodzie wykorzystuje większość komórek [73]. Komórki nieustannie wchłaniają fragment błony komórkowej i odnawiają równoważnik całej jej powierzchni nawet kilka razy w ciągu godziny [74], dlatego wszystkie związki wykazujące powinowactwo do błony komórkowej (np. kationowe peptydy) są łatwo zamkane wewnątrz pęcherzyka i transportowane do wnętrza komórki, proces taki nazywany jest pinocytozą adsorpcyjną. Czynniki wzrostu i inne związki sygnałowe indukują makropinocytozę, która pozwala na transport relatywnie dużych objętości roztworów. Jednakże zdecydowanie najwydajniej przebiega proces endocytozy indukowanej przez receptory [75]. Z receptorami ulokowanymi na powierzchni błon komórkowych związanych jest kilka rodzajów pinocytozy. Różnią się one sposobem formowania endosomów. W procesie tym pośredniczyć może klatryna (endocytoza klatrynozależna) jak rów-

nież bogate w lipidy domeny błonowe (endocytoza traw lipidowych, do tego typu należy także endocytoza zależna od kaweoli) (Rys. 3). Endocytoza może również przebiegać z wykorzystaniem innych, nieznanych jeszcze mechanizmów. Zawsze jednak, by cargo mogło być transportowane do wnętrza komórki, musi istnieć mechanizm przenikania (ucieczki) z endosomu [76]. Związki, które nie są zdolne do szybkiej ucieczki z pęcherzyka nie są dobrymi transporterami, ponieważ zamknięty w endosomie materiał ulega trawieniu.

Obecnie uważa, się, że endocytoza jest jedną z najważniejszych dróg przenikania CPPs do wnętrza komórek. Obserwacja ta dotyczy głównie CPPs obdarzonych ładunkiem [73, 77]. Poznano kilka białek odpowiedzialnych za indukowanie endocytozy pod wpływem CPPs bogatych w argininę. Są to między innymi syndekan-4 [78, 79] (proteoglikan) oraz laminina [80] (glikoproteina). Zidentyfikowano także geny warunkujące endocytotozę, a tym samym również transport poliargininy [81]. Wykazano ponadto, że oddziaływanie kationowych CPPs z wchodząącymi w skład błony komórkowej glikozaminoglikanami (ang. *glycosaminoglycans*, GAGs) oraz proteoglikanami [11, 82] są istotnym czynnikiem warunkującym przenikanie do komórek. Oddziaływanie z glikozaminoglikanami jest zapewne pierwszym z etapów transportu TAT [83, 84], penetratyny [85, 86] i poliargininy [22]. Rolę GAGs potwierdziły eksperymenty z komórkami pozbawionymi membranowych proteoglikanów [87] oraz badania termodynamiczne [22, 88, 89]. Wyniki badań termodynamicznych dowodzą także, że oddziaływanie różnych kationowych CPPs z glikozaminoglikanami są znacznie silniejsze w porównaniu do oddziaływań z lipidami [90]. Udział proteoglikanów w transporcie pęcherzykowym początkowo budził pewne kontrowersje, jednak obecnie istnieje wiele dowodów wskazujących na indukowanie endocytozy przez proteoglikany [91]. Wykazano również, że CPPs oddziałując z proteoglikanami indukują makropinocytzę [92]. Endocytoza bierze udział w transporcie nie tylko kationowych CPPs, ale również amfifilowych [93, 94] i hydrofobowych CPPs [47]. Wykorzystując inhibitory różnych ścieżek endocytozy wykazano, że kationowe CPPs przenikają do komórek głównie poprzez makropinocytzę, natomiast amfifilowe CPPs poprzez endocytozę klatrynozależną [95, 96], nie wykluczono jednak udziału innych dróg transportu.

2.2. TRANSPORT BEZPOŚREDNI

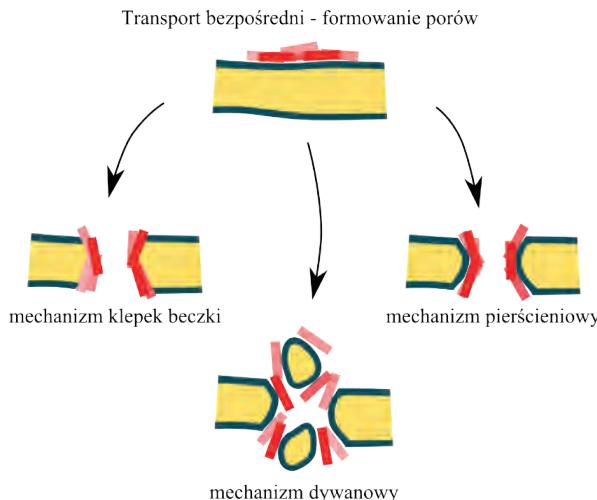
Transport bezpośredni może być oparty na mechanizmie odwróconych miceli lub przebiegać z tworzeniem porów w membranie [73]. Odwrócona micela [97] powstaje, gdy w wyniku gromadzenia się CPPs przy błonie komórkowej fragment membrany ulega deformacji. Odwrócona pęcherzyk zamknięty wewnętrz hydofilowy peptyd, jednocześnie przenikając do hydrofobowej warstwy błony komórkowej (Rys. 4).



Rysunek 4. Mechanizm odwróconej miceli jako przykład transportu bezpośredniego do wnętrza komórki: W trakcie transportu zachodzącego zgodnie z mechanizmem odwróconej miceli wewnętrz membrany tworzy się pęcherzyk z hydrofilowymi głowami fosfolipidów skierowanymi do wewnątrz i hydrofobowymi łańcuchami skierowanymi na zewnątrz. Wewnętrz pęcherzyka znajduje się transportowane cargo

Figure 4. Mechanism of reverse micelle as an example of direct transport into the cell: During internalisation through inverted micelle formation, a vesicle is formed with hydrophilic groups of phospholipids facing its interior and hydrophobic groups directed outwards. The cargo stays inside the vesicle

Odwrócona micela przemieszcza się w kierunku wewnętrznej powierzchni błony i finalnie uwalnia zamknięte cargo. Formowanie porów w błonie komórkowej może zachodzić na drodze trzech mechanizmów (Rys. 5): pierścieniowego [98] (*toroidal pore*), wówczas łańcuchy peptydu układają się w poprzek membrany (wzdłuż porów), co powoduje jej zawinięcie hydrofilową stroną do wnętrza poru; klepek beczki [99] (*barrel stave pore*), łańcuchy peptydu układają się w poprzek membrany (peptyd ma kontakt z hydrofobową warstwą błony komórkowej) oraz dywanowego [100] (*carpet*), gdy znaczne nagromadzenie CPPs przy powierzchni błony powoduje jej całkowitą destabilizację.



Rysunek 5. Tworzenie porów w błonie komórkowej jako przykład transportu bezpośredniego do wnętrza komórki: Przenikanie do wnętrza komórki poprzez tworzenie porów może zachodzić na drodze trzech różnych mechanizmów: klepek beczki, pierścieniowego i dywanowego

Figure 5. Formation of pores in the cell membrane as an example of direct transport into cell: Internalisation via pore formation may occur via one of three pathways: barrel stave, toroidal or carpet-like

Choć dostępnych jest wiele dowodów na niezależne od endocytozy przenikanie CPPs, w literaturze brakuje potwierdzenia dominacji konkretnego mechanizmu transportu bezpośredniego. Możliwość tworzenia odwróconych miceli przez penetratyne wykazały eksperymenty NMR [101], jednak kationowe CPPs bez elementów hydrofobowych prawdopodobnie nie mogą wykorzystywać tej drogi do przenikania. Jednocześnie mechanizmy przebiegające z tworzeniem porów i destabilizacją błony nie korelują z niską toksycznością większości CPPs [73]. Dla kationowych CPPs przyjmuje się, (jeśli przenikają błonę komórkową na drodze innej od endocytozy), że proces ten przebiega według mechanizmu bliskiemu odwróconej miceli, nazywanym adaptacyjną translokacją (*adaptive translocation*) [102–104], przy czym nie jest to jedyna możliwa ścieżka transportu.

Przenikanie na drodze transportu bezpośredniego potwierdzono dla wielu peptydów penetrujących komórki w warunkach wykluczających przebieg endocytozy, a także z wykorzystaniem liposomów. Obserwowano bowiem przenikanie do komórek poliarginin zarówno w obecności inhibitorów endocytozy [105, 106] oraz w temperaturze 4°C [107, 108]. Oprócz tego, heksarginina i TAT przenikały do wnętrza jednowarstwowych liposomów o różnych rozmiarach [109–111]. Nie powodowały przy tym wycieku zawartego w nich barwnika, natomiast peptyd R₆W przenikał do liposomów, powodując powolną ucieczkę ich zawartości, co sugerować może mechanizm oparty na tworzeniu porów. Eksperyment na modelowych układach wielofazowych wykazał zdolność dyfuzji poliargininowych CPPs przez warstwę hydrofobową [112].

W przypadku amfifilowych i hydrofobowych CPPs bezpośrednie przenikanie może zachodzić w większym stopniu niż w przypadku peptydów kationowych [42, 113], choć nie wszystkie badania to potwierdzają [114]. Zdolność do transportu na drodze niezależnej od endocytozy sugerowana jest dla peptydów: MAP [33] oraz dla Pep-1 [31]. Amfifilowe CPPs mogą przenikać do wnętrza liposomów [108]. Co ciekawe, bezpośredni transport amfifilowych peptydów zdaje się być zależny od obecności glikozaminoglikanów w błonie, w odróżnieniu od kationowych CPPs, w przypadku których obecność GAG nie wpływa na przenikanie do liposomów [115].

Mechanizm przenikania bezpośredniego jest wciąż przedmiotem licznych kontrowersji. Mimo że badania eksperimentalne dostarczają wielu dowodów przemawiających za zdolnością CPPs do transportu bezpośredniego, pojawiają się też prace wykluczające tę drogę przenikania, lub wykazujące jej minimalny udział [83, 116, 117]. Kontrowesjonalne jest również bezpośrednie przenoszenie wyników badań z liposomami na procesy zachodzące w żywych komórkach i ogólnie zastosowanie modeli *in vitro* do opisu przenikania przez komórki *in vivo*. Najrozsądniej wydaje się przyjąć, że mechanizm przenikania CPPs jest zależny nie tylko od ich budowy, ale również od stężenia CPPs, przy czym postuluje się, że przy niskich stężeniach promowana jest endocytoza, natomiast przy wysokich transport bezpośredni [118]. Mechanizm zależy również od rozmiaru transportowanych cząsteczek, przy czym

większy rozmiar sprzyja endocytozie [119]. Wśród innych czynników wpływających na mechanizm przenikania wymienić można także rodzaj transportowanych cząsteczek [120], komórek do których zachodzi przenikanie [121] i inne.

3. ZASTOSOWANIE CPPs JAKO TRANSPORTERÓW ZWĄZKÓW CHEMICZNYCH DO KOMÓREK

Od momentu odkrycia CPPs zaproponowano dla nich wiele różnorodnych zastosowań, jednak główne ich wykorzystanie dotyczy transportu związków leczniczych i obrazujących. CPPs charakteryzują się wysoką skutecznością *in vitro* w dostarczaniu do komórek fluoroforów, małocząsteczkowych leków, białek, peptydów, kwasów nukleinowych czy nanocząstek. Ponadto wykazano, że CPPs zdolne są do transportu substancji aktywnych w warunkach *in vivo*. Koniugat β -galaktozydazy z fragmentami białka tat₁₋₇₂ oraz tat₃₇₋₇₂ [122, 123] w badaniach na myszach wykazywał aktywność enzymatyczną we wszystkich tkankach organizmu, a najwyższą aktywność obserwowano w sercu, wątrobie, trzustce, płucach i mięśniach szkieletowych. Podobne zdolności do transportu *in vivo* potwierdzono dla wielu innych CPPs [124–127] (Tab. 1).

Tabela 1. Przykłady wykorzystania CPPs do transportu przez błonę komórkową różnych ładunków (cargo) w postaci prostych koniugatów i kompleksów [122–127]

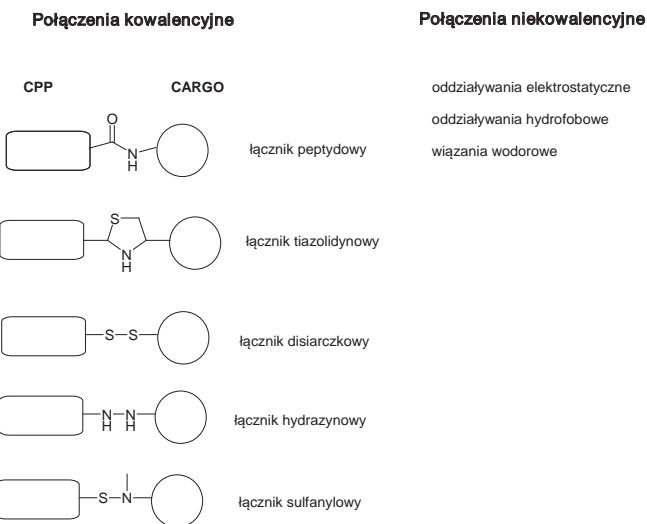
Table 1. The table gathers examples of CPPs applications for transmembrane transport of various cargos as simple conjugates or complexes [122–127]

CPPs	Cargo	Typ połączenia CPP-cargo	Test	Rezultat
Transportan-penetratyna	siRNA	koniugat – wiązanie kowalencyjne	<i>in vitro</i>	Wejście do komórki wraz z efektem biologicznym
Penetratyna	siRNA	koniugat – wiązanie kowalencyjne	<i>in vitro</i>	Wejście do komórki wraz z efektem biologicznym
Tat	siRNA	koniugat – wiązanie kowalencyjne	<i>in vitro</i>	Wejście do komórki wraz z efektem biologicznym
Tat, penetratyna	siRNA	koniugat – wiązanie kowalencyjne	<i>in vitro</i>	Wejście do komórki wraz z efektem biologicznym
MPG	siRNA	kompleks – wiązanie niekowalencyjne	<i>in vitro</i>	Wejście do komórki wraz z efektem biologicznym
Tat	PNA	koniugat – wiązanie kowalencyjne	<i>in vitro</i>	Wejście do komórki wraz z efektem biologicznym
Transportan	PNA	koniugat – wiązanie kowalencyjne	<i>in vitro</i>	Wejście do komórki wraz z efektem biologicznym
Penetratyna-NLS	PNA	koniugat – wiązanie kowalencyjne	<i>in vitro</i>	Wejście do komórki wraz z efektem biologicznym
Transportan10	Plazmid	kompleks – wiązanie niekowalencyjne	<i>in vitro</i>	Wejście do komórki wraz z efektem biologicznym

CPPs	Cargo	Typ połączenia CPP-cargo	Test	Rezultat
Tat	Plazmid	kompleks – wiązanie niekowalencyjne	<i>in vitro</i>	Wejście do komórki wraz z efektem biologicznym
Tat-fag	Plazmid	kompleks – wiązanie niekowalencyjne	<i>in vitro</i>	Wejście do komórki wraz z efektem biologicznym
Tat	β -galaktozydaza	koniugat – wiązanie kowalencyjne	<i>in vivo</i>	Wejście do komórki wraz z efektem biologicznym
Tat	GFP	koniugat – wiązanie kowalencyjne	<i>in vivo</i>	Wejście do komórki
Tat	insulina	koniugat – wiązanie kowalencyjne	<i>in vitro</i>	Transport transepitelialny
Tat, Tenetratyna Transportan MAP	Penta-peptyd	koniugat – wiązanie kowalencyjne	<i>in vitro</i>	Wejście do komórki
R ₇ , R ₇ W	Tri-, tetra-peptyd	koniugat – wiązanie kowalencyjne	<i>in vitro</i>	Wejście do komórki
R ₈	Anhydraza węglanowa	koniugat – wiązanie kowalencyjne	<i>in vitro</i>	Wejście do komórki wraz z efektem biologicznym
R ₆ , R ₈ , R ₁₀	insulina	ko-administratracja	<i>in situ</i>	Transport transepitelialny i efekt biologiczny
R ₇	Cyklosporyna A	koniugat – wiązanie kowalencyjne	<i>in vivo</i>	Wejście do komórki wraz z efektem biologicznym
Pep-1	Białko 27 ^{kip1} Inhibitor cyklu komórkowego	kompleks – wiązanie niekowalencyjne	<i>in vitro</i>	Wejście do komórki wraz z efektem biologicznym
Pep-1	β -galaktozydaza GFP	kompleks – wiązanie niekowalencyjne	<i>in vitro</i>	Wejście do komórki wraz z efektem biologicznym
Pep-1 YTA2 pVEC	β -galaktozydaza streptawidyna	ko-administratracja	<i>in vitro</i>	Wejście do komórki wraz z efektem biologicznym

Istnieją dwa sposoby łączenia CPPs z transportowanym ładunkiem: trwały koniugat połączony wiązaniem kowalencyjnymi oraz kompleks uzyskiwany na drodze oddziaływań niekowalencyjnych (Rys. 6). Z punktu widzenia trwałości korzystniejsze jest tworzenie kowalencyjnie połączonych koniugatów, jednak może to skutkować ograniczeniem lub utratą zdolności przenikania do komórek, a także wpływać na aktywność ładunku. Krótkie interferujące RNA (siRNA) transportowane jako kompleks (oddziaływanie jonowe) z CPP zachowują swoją aktywność [128], podczas gdy próby transportu kowalencyjnie związanych kompleksów CPP-siRNA zakończyły się niepowodzeniem [129]. Również w przypadku transportu białek i peptydów nie ma prostej recepty pozwalającej określić w jakiej postaci ładunek powinien być transportowany za pomocą CPP do wnętrza komórek. W literaturze

turze opisane są przykłady transportu przez błony komórkowe niekowalencyjnych kompleksów białek z CPPs [130, 131].



Rysunek 6. Przykłady koniugatów z CPP: CPP można łączyć z transportowaną substancją poprzez wiązanie kowalencyjne. Alternatywą jest tworzenie kompleksu niekowalencyjnego

Figure 6. Examples of conjugates with CPP: CPP may be connected with cargo via covalent linkage. Alternatively, noncovalent complex can be formed

Oprócz wspomnianych zalet, CPPs posiadają jedną zasadniczą wadę, a mianowicie brak selektywności dostarczania cargo do tkanek i komórek w organizmie żywym [7, 132] i wykazują jednakową zdolność wnikania do wszystkich rodzajów komórek eukariotycznych. Z punktu widzenia wykorzystania *in vivo* również niska odporność CPPs na degradację enzymatyczną stwarza problemy. Z tego względu podjęte zostały próby opracowania strategii pozwalających na wykorzystanie funkcji transporterowej CPPs z poprawioną selektywnością oraz stabilnością. Modyfikowane CPPs znalazły zastosowanie jako układy transporujące leki przeciwnowotworowe, stąd też celem badań było opracowanie strategii pozwalających na selektywne wprowadzanie ładunku do komórek nowotworowych [7, 8].

3.1. AKTYWOWANIE CPPs – WZROST SELEKTYWNOŚCI PRZENIKANIA DO KOMÓREK

Strategia wykorzystania ligandów naprowadzających

Przenikanie CPPs do wnętrza komórek wynika z oddziaływania kationowych CPPs z anionowymi fragmentami lipidów lub glikozaminoglikanów. Są to składniki błon komórkowych wszystkich typów komórek, zarówno zdrowych jak i nowotwo-

rowych. W szczególnych przypadkach możliwe jest jednak wykorzystanie zwiększonej ilości anionowych składników błon fizjologicznych w komórkach nowotworowych. Siarczan chondroityny produkowany jest przez komórki nowotworowe w większej ilości i efekt ten został wykorzystany do poprawy selektywności przenikania do komórek nowotworowych koniugatów CPPs z lekami przeciwnowotworowymi. Niewielką poprawę selektywności obserwowno dla kompleksów penetratyny [133] z terapeutykami. Dopiero wykorzystanie peptydu BR2 (RAGLQFPVGRLRRLLR) opartego na strukturze buforyny IIb jako CPP znaczaco poprawiło selektywność oddziływania z komórkami nowotworowymi [134].

W wielu przypadkach błony komórek nowotworowych charakteryzują się zwiększoną ilością (nadekspresja) wybranych białek receptorowych. Wykorzystując nadekspresję wybranych receptorów błonowych w komórkach nowotworowych możliwe jest więc zwiększenie selektywności działania poprzez tworzenie koniugatów zawierających lek-CPP-ligand. W układzie takim ligand pełni rolę związku naprowadzającego. Jako ligandy najczęściej wykorzystuje się kwas hialuronowy [135, 136], przeciwciała [137], kwas foliowy [138, 139] oraz aktywne biologicznie peptydy: transferynę [140] i bombezynę [141], RGD [142, 143] i NGR [144, 145].

Makrocząsteczki oraz nanocząsteczki jako nośniki koniugatów CPP-cargo

Jako nośniki wielu leków, w tym również przeciwnowotworowych, stosowane są związki wielkocząsteczkowe oraz nanocząstki. Takie podejście znalazło również zastosowanie w transporcie koniugatów CPPs z lekami. Wykorzystanie makrocząstek zapewnia ochronę przed degradacją zarówno CPP jak i transportowanego leku oraz umożliwia bardziej selektywne dotarcie nośnika do tkanki nowotworowej. Selektynność transportu do tkanki nowotworowej wynika z efektu wyższej przepuszczalności i retencji (ang. *enhanced permeability and retention*, EPR) [146, 147]. Makrocząsteczki w ograniczonym stopniu przenikają z krwiobiegu w zdrowych tkankach. Ze względu na nietypową fizjologię tkanki nowotworowej oraz fakt, że jej naczynia krwionośne są przepuszczalne zarówno dla związków niskocząsteczkowych jak i makrocząstek, ma miejsce zwiększone dostarczanie makromolekuł do tkanki nowotworowej. Efekt ten został wykorzystany do selektywnego kierowania terapeutyków, określonego teminem biernego naprowadzania [7]. Przyjmuje się, że granicą zapewniającą selektywność makrocząstek wobec tkanki nowotworowej jest ciężar cząsteczkowy 40 kDa [146]. Zjawisko EPR wykorzystywane jest również w przypadku nanocząstek, przy czym naczynia krwionośne w obrębie tkanki nowotworowej umożliwiają przenikanie zarówno pojedynczych cząstek nano jak i ich agregatów. Przykładem ilustrującym ten efekt jest zwiększoną selektywność działania koniugatów TAT z deksorubicyną osadzonych na nanocząstkach złota [148].

Zazwyczaj platformy dostarczania leków oparte na makrocząsteczkach lub nanocząstkach dodatkowo zawierają elementy zwiększające jeszcze selektywność np. naprowadzające ligandy lub systemy aktywowania w miejscu działania. Bazą

dla nośników zawierających CPPs mogą być polimery [139], dendrymery [142] czy liposomy [140]. W literaturze opisane są przykłady wykorzystania peptydów zdolnych do agregacji, a powstające agregaty mogą stanowić platformy do przenoszenia leków [149].

CPPs osadzane są również na wirusach, które są niejako naturalnymi nośnikami substancji do wnętrza komórek. Peptyd TAT osadzony na adenowirusach nadawał im zdolność przenikania do komórek pozbawionych receptorów wirusów Coxsackie i adenowirusów (ang. *Coxsackievirus and adenovirus receptor*, CAR) [150–152].

Taktyka aktywowania CPPs w miejscu ich działania

Przedstawione powyżej metody poprawiania selektywności działania CPPs i ich koniugatów z terapeutykami (wbudowywanie fragmentów naprowadzających, metoda EPR) czasami są niewystarczające do uzyskania wysokiej specyficzności przenikania do komórek nowotworowych [153]. W celu uzyskania oczekiwanej selektywności działania koniugatów CPPs z terapeutykami opracowano wiele strategii polegających na hamowaniu zdolności przenikania CPPs przez błony komórkowe aż do momentu osiągnięcia właściwego miejsca działania. Działania takie polegają na dobudowywaniu do CPPs układów osłaniających, co jest możliwe przez stosowanie pochodnych o znacznej zawadzie sterycznej lub układów ekranujących dodatni ładunek CPPs. Przykładowo wspomniany wcześniej peptyd Xentry jest dezaktywowany gdy do jego sekwencji dobudowany jest anionowy peptyd będący mimetykiem heparyny [66].

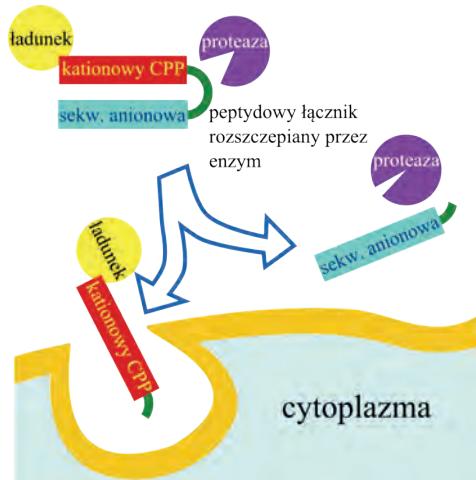
Elementy osłaniające usuwane są po dotarciu koniugatu CPP-terapeutyk do tkanki zmienionej chorobowo. Do usuwania osłon stosuje się bądź różnice w środowisku fizjologicznym komórek nowotworowych (np. odmienne pH) lub różnice w aktywności specyficznych enzymów. Ponadto wykorzystywane są do tego celu bodźce fizyczne takie jak: temperatura, ultradźwięki czy naświetlanie [7, 8]. Nośniki z zablokowaną aktywnością CPP nazywa się często aktywowlonymi peptydami penetrującymi komórki (ang. *activatable cell penetrating peptides*, ACPP). Używa się też nazwy aktywowane peptydy penetrujące komórki, choć pojęcie *aktywowlany* lepiej oddaje ich potencjał do bycia *aktywowanymi* w miejscu działania.

Modyfikowane CPPs jako nośniki aktywowane enzymatycznie

Środowisko nowotworu oraz tkanek z rozwiniętym stanem zapalnym charakteryzuje się wyższym poziomem wielu enzymów m.in. proteaz, esteraz i glikozydaz [154]. W przypadku nowotworów obserwuje się znacznie wyższy poziom metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej (ang. *matrix metalloproteinases*, MMP), które umożliwiają szybką przebudowę macierzy pozakomórkowej. Na szczególną uwagę

w grupie metaloproteinaz zasługują MMP-2 oraz MMP-9, których podwyższony poziom obserwuje się w wielu rodzajach nowotworów [7, 154]. Skuteczność strategii wykorzystującej metaloproteinazy *in vivo* jest jednak ograniczona ze względu na obecność tych enzymów także w zdrowych tkankach, co oznacza możliwość aktywowania koniugatu CPP-terapeutyk również poza tkanką nowotworową. Obserwacja ta skłania do poszukiwań innych, specyficznych dla nowotworów enzymów [155].

Pierwszym zaproponowanym rozwiązańem opartym na enzymatycznej aktywacji było dołączenie do CPP złożonego z dziewięciu reszt argininy (R9) innego peptydu zbudowanego z dziewięciu reszt kwasu glutaminowego. Pomiędzy peptydami wbudowany był łącznik PLG↓LAG, rozcinany w miejscu oznaczonym strzałką przez enzym MMP-2 [156].



Rysunek 7. Przykład aktywowlanego CPP: do kationowego CPP dołączony jest dezaktywujący fragment polianionowy, po rocięciu łącznika pod działania protezy, „wolny” CPP przenika przez błonę komórkową [w oparciu o 156]

Figure 7. Example of activatable CPP with deactivating polyanionic chain connected to the cationic CPP: after cleavage of the linker by protease, free CPP can transport the cargo [based on 156]

Testy *ex vivo* pozwalają przypuszczać, że nośnik aktywowany MMP-2 może być wykorzystany do obrazowania nowotworów. Podobne rozwiązania wykorzystano do transportu deksorubicyny połączonej z wyżej wymienionym peptydem [157] jak również do transportu środków kontrastujących do obrazowania MR i znaczników fluorescencyjnych [158].

Ciekawym rozwiązaniem jest modyfikacja łańcuchów bocznych aminokwasów grupami usuwanymi enzymatycznie. Modyfikacja jednej z reszt lizyny peptydu TAT aminokwasem lub dipeptydem okazała się wystarczająca do zahamowania jego przenikania przez błony komórkowe. Odszczepienie dodatkowo wprowadzonego fragmentu zachodzi pod działaniem aminopeptydazy N lub dipeptydylopepty-

dazy IV [159]. Przyłączenie tripeptydu AAN pozwoliło uzyskać CPP aktywowany endopeptydazą C13 [160].

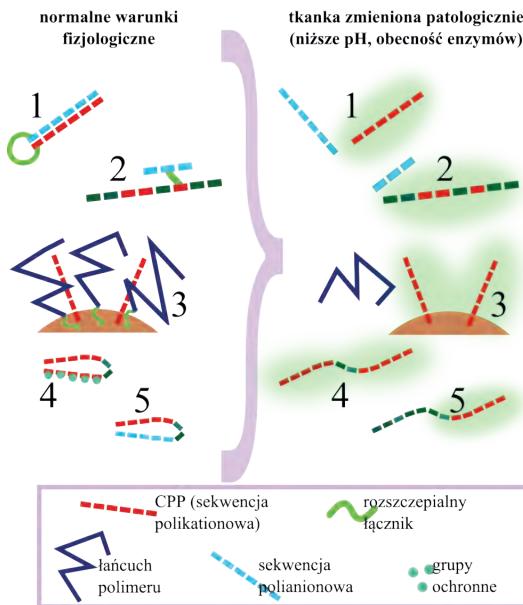
Alternatywne podejście polega na osłonięciu CPPs pochodnymi poli(glikolu etylenowego), które usuwane są pod wpływem działania enzymów. Przykładem takiego rozwiązania jest koniugat złożony z poliargininy, pochodnej PEG oraz nanocząstek tlenku żelaza [161], który został wykorzystany do bioobrazowania. Podobne rozwiązanie zastosowano w syntezie koniugatu złożonego z plazmidowego DNA (ładunku), peptydu PepFect14 (pełniącego rolę CPP), który połączony był z cząsteczkami PEG usuwanymi pod wpływem działania enzymów [162].

Modyfikowane CPPs jako nośniki aktywowane zmianą pH lub zmianą potencjału utleniająco-redukującego

Cechą odróżniającą tkankę nowotworową od zdrowej jest również pH. Średnie pH komórek nowotworowych wynosi 7,0, zaś tkanki zdrowej 7,5 [163]. Odczyn płynu międzykomórkowego w guzach nowotworowych zwykle jest kwasowy [164]. Do konstruowania aktywowanych niskim pH peptydów penetrujących wykorzystano łączniki trwałe w normalnych warunkach fizjologicznych, a ulegające rozszczepieniu w środowisku kwasowym.

Przykładem takiego rozwiązania są aktywowalne liposomy modyfikowane poliargininą poprzez rozszczepiany w środowisku kwaśnym łącznik hydrazonowy [165]. Inne rozwiązanie polega na wprowadzaniu kwasowolabilnych grup osłaniających do łańuchów bocznych zasadowych aminokwasów. Boczne grupy aminowe lizyny w peptydzie CR₈G₃PK₆ acylowano bezwodnikiem 2,3-dimetylmaleinowym. Utworzone wiązanie amidowe ulegało hydrolizie w obniżonym pH tkanki nowotworowej, uwalniając aktywny CPP [166]. Aktywacja peptydu penetrującego może następować także w wyniku odwracalnego procesu protonowania. Peptyd GALA o sekwencji WEAALAEALAEHLAEALAEALAA w środowisku kwasowym jest konformerem o α-helikalnej strukturze, co gwarantuje jego zdolność do penetrowania błon komórkowych. Gdy łańuchy boczne obecnych w peptydzie reszt kwasu glutaminowego są zdeprotonowane w zasadowym środowisku, struktura helikalna ulega destabilizacji i peptyd traci zdolność do przenikania przez błony komórkowe [167, 168].

Aktywne w niskim pH CPPs można uzyskać poprzez wbudowywanie w łańuch peptydowy reszt histydyny. Dodanie fragmentu naprzemiennie ułożonych reszt histydyny i kwasu glutaminowego pozwala uwarzyćliwić na pH peptydy penetrujące o zróżnicowanych sekwencjach aminokwasowych [169]. Podobny efekt można uzyskać poprzez wymianę reszt lizyny na reszty histydyny [170].



Rysunek 8. Przykładowe strategie tworzenia aktywowlanych CPPs: 1) sekwencje polianionowe i polikatijnowe połączone rozszczepialnym łącznikiem [15]; 2) fragment blokujący przyłączony do łańucha bocznego kationowego aminokwasu w CPP [158, 159]; 3) CPPs osłonięte polimerami dołączonymi do nośnika poprzez rozszczepialny łącznik [156, 157]; 4) modyfikacja wybranych reszt kationowych CPPs grupami anionowymi [163]; 5) peptyd przybierający aktywną konformację jedynie w pH patologicznym [164–167]

Figure 8. The examples of strategies of formation activatable CPPs: 1) polyanionic and polycationic fragments connected with cleavable linker [153]; 2) blocking fragment connected to the side chain of basic residue of the CPP [158, 159]; 3) shielding polymer chains connected to the carrier with a cleavable linker [156, 157]; 4) modification of cationic parts of CPP with anionic groups [163]; 5) peptide adopting its active conformation only at pathologic pH [164–167]

Zaproponowano także aktywowlane peptydy penetrujące komórki, w których grupy osłaniające CPPs odszczepiane są w wyniku redukcji lub utlenienia. Peptyd M918 o sekwencji MVTVLFKRLIRRACGPPRVKV traci zdolność do przenikania po dobudowaniu do jego struktury łańcuchów PEG [171]. Polimer przyłączono do bocznych grup aminowych lisyny poprzez ugrupowanie azabenzenowe, które rozszczepiane jest w wyniku redukcji. Wykazano, że proces redukcji może być katalizowany przez bakteryjną azoreduktazę w okrężnicy. Znane są również CPPs aktywowane w wyniku utlenienia nadtlenkiem wodoru. Zdolność ta może być wykorzystana do nakierowywania aktywnych substancji do tkanek znajdujących się w stanie stresu oksydacyjnego. Kluczowym elementem warunkującym takie rozwiązanie jest połączenie aktywnej poliargininy z osłaniającym związkiem polianionowym poprzez resztę kwasu 4-boronomigdałowego [172].

Modyfikowane CPPs jako nośniki aktywowane termicznie

CPPs transportujące terapeutiki aktywować można również zewnętrznymi czynnikami fizycznymi. Jednym z nich jest stosowana w terapii nowotworów miejscowa hipertermia, czyli kontrolowane przegrzewanie komórek guza. W podejściu tym najczęściej stosowane są liposomy uwalniające zawartość w podwyższonej temperaturze [173]. Coraz większe zainteresowanie wzbudza podejście wykorzystujące tzw. peptydy elastynopodobne (ang. *elastin-like polypeptide*, ELP) [174]. Mają one postać postać rozpuszczalnych monomerów w temperaturze fizjologicznej, zaś w warunkach hipertermii tworzą agregaty. Dołączenie do nich koniugatu CPP-cargo umożliwia tworzenie nośników, które przenikają przez błonę jedynie po procesie agregacji [175–177]. Lokalna hipertermia wywoływana może być przepływem prądu elektrycznego lub ultradźwiękami [178]. Ta ostatnia metoda cieszy się jednak większą popularnością i jest częściej wykorzystywana [145] jako czynnik warunkujący hipertemię. Przykładem takiego podejścia jest wykorzystanie opakowanego w nanosferę kompleksu CPP-deksorubicyna do selektywnego transportu i uwalniania leku przeciwnowotworowego. Jako naprowadzający czynnik fizyczny coraz częściej stosowane jest także zlokalizowane pole magnetyczne [179, 180].

Modyfikowane CPPs jako nośniki aktywowane światłem

Podejmowane są również próby wykorzystania promieniowania elektromagnetycznego do aktywacji nośników leków. Aktywowanie światłem pozwala uzyskać wysoką precyję zarówno obszarową jak i czasową. Przykładem takiego podejścia są liposomy modyfikowane CPPs, w których grupy aminowe w łańuchach bocznych lisyny osłaniane są działaniem chloromrówczanu 4,5-dimetoksy-2-nitrobenzylu, który usuwany jest promieniowaniem UV [181].

Jeszcze korzystniejsze jest zastosowanie promieniowania podczerwonego, które głębiej penetruje tkankę. Znane jest podobne do opisanego powyżej rozwiązanie, w którym reszty lisyny zablokowane były usuwanym pod działaniem promieniowania podczerwonego grupami 1-(bromometylo)-4,5-dimetoksy-2-nitrobenzylowymi [144, 182]. Bazując na osłonie 4,5-dimetoksy-2-nitrobenzylowej opracowano również system uwalniający polianionową sekwencję CPP po naświetlaniu promieniowaniem IR [183].

4. ZASTOSOWANIE CPPs W TERAPII I DIAGNOSTYCE

W diagnostyce nowotworów, a także w diagnostyce połączonej z terapią (teranostyce) wykorzystywane są systemy transportujące nanocząstki metali. Do ukrankowanej radioterapii wykorzytywane są wzbogacone lutetem-177 nanocząstki złota, które kowalecyjnie połączone są z TAT [141]. Modyfikowane nanorurki

złota, przenikające przez błony po ich modyfikowaniu za pomocą CPPs zostały wykorzystane do selektywnego dostarczania związków fotouczulających [138] do tkanek nowotworowych.

Peptydy penetrujące do komórek wykorzystano także do transportu kropek kwantowych. Kropki kwantowe mogą być funkcjonalizowane za pomocą CPPs na dwóch drogach: poprzez tworzenie kowalencyjnie połączonych koniugatów lub w postaci kompleksów, w których nie ma konieczności tworzenia wiązań kowalencyjnych pomiędzy CPP a ładunkiem [184]. Modyfikowane za pomocą CPPs kropki kwantowe wykorzystano do znakowania komórek macierzystych w celu śledzenia ich dystrybucji *in vivo* [185].

Ze zdolnością CPPs do przenikania przez błonę komórkową związana jest także ich zdolność do przenikania przez inne bariery biologiczne, takie jak bariera krew-mózg, bariera jelitowa czy skóra [8]. Wiele badań na modelach *in vitro* sugeruje, że nośniki oparte na CPPs mogą dostarczać terapeutyki do mózgu przekraczając barierę krew-mózg [186, 187]. Badania *in vivo* modyfikowanych za pomocą peptydu TAT liposomów potwierdziły ich selektywność wobec komórek glejaka [188]. Dalsze badania z użyciem peptydów elastynopodobnych modyfikowanych za pomocą CPPs wykazały jednak, że proces przenikania do centralnego układu nerwowego, po podaniu donosowym, nie jest dostatecznie efektywny [189].

Coraz częściej podejmowane są również próby wykorzystania CPPs do transportu leków polipeptydowych. Badania te zmierzają do opracowania rozwiązania, w którym możliwe będzie uzyskanie wydajnego wchłaniania podawanych dojelitowo peptydów. Badania wchłaniania i dystrybucji podawanej doustnie insuliny wykazały znacznie wyższą skuteczność wchłaniania koniugatów insuliny z poliargininą, TAT i penetratyną w porównaniu do wchłaniania hormonu niemodyfikowanego [190, 191]. Atrakcyjnym rozwiązaniem jest zastosowanie CPPs do transportu substancji terapeutycznych przez skórę, która jest nieprzepuszczalna dla związków makrocząsteczkowych w tym również polipeptydów. Wykazano, że poliarginina zapewnia transport transdermalny cyklosporyny A [192], natomiast penetratyna i inne CPPs umożliwiają transport soli sodowej diklofenaku [193].

Mimo licznych propozycji zastosowań CPPs w terapii i diagnostyce, popartych obiecującymi wynikami wstępnych badań *in vitro* i *in vivo*, do tej pory nie ma jeszcze żadnej terapii wykorzystującej peptydy penetrujące do komórek. Kontynuowane są testy kliniczne wykorzystujące głównie TAT [194] (GRKKRRQRR-RPQ) oraz p28 (LSTAADMQGVTDGMASGLDKDYLKPDD) [7] jako układy transportujące. Najbardziej zaawansowane są badania nad zastosowaniem peptydu TAT jako czynnika wspomagającego dostarczanie inhibitorów kinazy C ϵ oraz C δ (leki przeciwbólowe, przeciw niedokrwienne i przeciwzwawałowe), inhibitorów kinaz aktywowanych stresem (leki przeciwudarowe i przeciwko wypadaniu włosów) czy transport przez skórę botuliny [195]. Uzyskano też obiecujące wyniki wstępnych badań klinicznych dla hybrydowego peptydu złożonego z fragmentu sekwencji receptora NMDA oraz TAT (Tat-NR2B9c lub NA-1). Hybryda wykazuje zdolność

blokowania neurotoksycznych ścieżek sygnałowych i tym samym hamuje uszkodzenie mózgu związane z udarem [196]. Peptyd p28 badany jest pod kątem wykorzystania w leczeniu nowotworów [197, 198]. Obecnie w trakcie badań klinicznych jest kompleks złożony z peptydu DTS-108, inhibitora topoizomerazy i przeciwnika skierowanego przeciwko ludzkiemu CPP (DPV1047). Peptyd DTS-108 wykazuje aktywność CPP (zawiera pięć resz argininy oraz dwie reszty lizyny warunkujące zdolność przenikania błon komórkowych) [199, 200].

PODSUMOWANIE

Synteza i poznanie obszaru zastosowania peptydów penetrujących do komórek jest wyjątkowo intensywnie rozwijanym obszarem badawczym. Choć bezpośrednie praktyczne wykorzystanie CPPs jest ograniczone przez ich niedostateczną selektywność i niską stabilność, uzyskany postęp w działaniach zmierzających do wyeliminowania tych nieporządzanych właściwości wskazuje na ogromny potencjał owych prostych ale bardzo zróżnicowanych strukturalnie peptydów. Działania te powinny otworzyć szerokie możliwości wykorzystania CPPs w dostarczaniu terapeutyków, a także w diagnostyce i w teranostyce.

PODZIĘKOWANIE

Niniejsza praca została sfinansowana z projektów badawczych Politechniki Łódzkiej (Grant I-18/501/6245/pl1 oraz I-18/501/6255/pl1).

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] A.D. Frankel, C.O. Pablo, *Cell*, 1988, **55**, 1189.
- [2] M. Green, P.M. Loewenstein, *Cell*, 1988, **55**, 1179.
- [3] A. Joliot, C. Pernelle, H. Deagostini-Bazin, A. Prochiantz, *Proc. Natl Acad. Sci.*, 1991, **88**, 1864.
- [4] D. Derossi, A.H. Joliot, G. Chassaing, A. Prochiantz, *J. Biol. Chem.*, 1994, **269**, 10444.
- [5] S. Fawell, J. Seery, Y. Daikh, C. Moore, L.L. Chen, B. Pepinsky, J. Barsoum, *Proc. Natl Acad. Sci.*, 1994, **91**, 664.
- [6] E. Vives, P. Brodin, B. Lebleu, *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 16010.
- [7] D. Raucher, J. Su Ryu, *Trends Mol. Med.*, 2015, **21**, 560.
- [8] D. Zhang, J. Wang, D. Xu, *J. Control. Release*, 2016, **229**, 130.
- [9] E. Vivès, *J. Control. Release*, 2005, **109**, 77.
- [10] D.M. Copolovici, K. Langel, E. Eriste, Ü. Langel, *ACS Nano*, 2014, **8**, 1972.
- [11] A. Chugh, F. Eudes, *J. Pept. Sci.*, 2008, **14**, 477.
- [12] S.D. Krämer, H. Wunderli-Allenspach, *Biochim. Biophys. Acta*, 2003, **1609**, 161.
- [13] P.Ø. Falnes, J. Wesche, S. Olsnes, *Biochemistry*, 2001, **40**, 4349.
- [14] A. Elmquist, M. Lindgren, T. Bartfai, Ü. Langel, *Exp. Cell Res.*, 2001, **269**, 237.

- [15] S. Galdiero, A. Falanga, M. Vitiello, H. Browne, C. Pedone, M. Galdiero, *J. Biol. Chem.*, 2005, **31**, 28632.
- [16] F. Miletti, *Drug Discov. Today*, 2012, **17**, 850.
- [17] P.A. Wender, D.J. Mitchell, K. Pattabiraman, E.T. Pelkey, L. Steinman, J.B. Rothbard, *Proc. Natl Acad. Sci.*, 2000, **97**, 13003.
- [18] P.M. Fischer, N.Z. Zhelev, S. Wang, J.E. Melville, R. Fähraeus, D.P. Lane, *J. Pept. Res.*, 2000, **55**, 163.
- [19] D.J. Mitchell, D.T. Kim, L. Steinman, C.G. Fathman, J.B. Rothbard, *J. Pept. Res.*, 2000, **56**, 318.
- [20] J.B. Rothbard, E. Kreider, C.L. VanDeusen, L. Wright, B.L. Wylie, P.A. Wender, *J. Med. Chem.*, 2002, **45**, 3612.
- [21] A. Walrant, C. Bechara, I.D. Alves, S. Sagan, *Nanomedicine*, 2012, **7**, 133.
- [22] E. Gonçalves, E. Kitas, J. Seelig, *Biochemistry*, 2005, **44**, 2692.
- [23] J.L. Zaro, W.-C. Shen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, **307**, 241.
- [24] S. Futaki, T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda, Y. Sugiura, *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 5836.
- [25] G. Tünnemann, G. Ter-Avetisyan, R.M. Martin, M. Stöckl, A. Herrmann, M.C. Cardoso, *J. Pept. Sci.*, 2008, **14**, 469.
- [26] S.W. Jones, R. Christison, K. Bundell, C.J. Voyce, S.M.V. Brockbank, P. Newham, M.A. Lindsay, *Brit. J. Pharmacol.*, 2005, **145**, 1093.
- [27] J. Zhou, Y. Chau, *Biomater. Sci.*, 2016, **4**, 1462.
- [28] J.S. Appelbaum, *Chem. Biol.*, 2012, **19**, 819.
- [29] A. Ziegler, J. Seelig, *Biochemistry*, 2007, **46**, 8138.
- [30] M.C. Morris, P. Vidal, L. Chaloin, F. Heitz, G. Divita, *Nucleic Acids Res.*, 1997, **25**, 2730.
- [31] E. Gros, S. Deshayes, M.C. Morris, G. Aldrian-Herrada, J. Depollier, F. Heitz, G. Divita, *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, **1758**, 384.
- [32] M.C. Morris, J. Depollier, J. Mery, F. Heitz, G. Divita, *Nat. Biotechnol.*, 2001, **19**, 1173.
- [33] A. Scheller, J. Oehlke, B. Wiesner, M. Dathe, E. Krause, M. Beyermann, M. Melzig, M. Bienert, *J. Pept. Sci.*, 1999, **5**, 185.
- [34] I.D. Alves, N. Goasdoué, I. Correia, S. Aubry, C. Galanth, S. Sagan, S. Lavielle, G. Chassaing, *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, **1780**, 948.
- [35] E. Eiríksdóttir, K. Konate, Ü. Langel, G. Divita, S. Deshayes, *Biochim. Biophys. Acta*, 2010, **1798**, 1119.
- [36] E. Krause, M. Beyermann, H. Fabian, M. Dathe, S. Rothmund, M. Bienert, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1996, **48**, 559.
- [37] J. Oehlke, E. Krause, B. Wiesner, M. Beyermann, M. Bienert, *FEBS Lett.*, 1997, **415**, 196.
- [38] H.Y. Kim, S.Y. Yum, G. Jang, D.-R. Ahn, A. Ahn, *Sci. Rep.*, 2015, **5**, 11719.
- [39] S. Pujals, E. Giralt, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2008, **60**, 473.
- [40] K. Sadler, K.D. Eom, J.L. Yang, Y. Dimitrova, J.P. Tam, *Biochemistry*, 2002, **41**, 14150.
- [41] D.S. Daniels, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 14578.
- [42] I. Martín, M. Teixidó, E. Giralt, *Chembiochem.*, 2011, **12**, 896.
- [43] M.I. Geli, M. Torrent, D. Ludevid, *Plant Cell*, 1994, **6**, 1911.
- [44] J.R. Marks, J. Placone, K. Hristova, W.C. Wimley, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 8995.
- [45] F. Nakayama, T. Yasuda, S. Umeda, M. Asada, T. Imamura, V. Meineke, M. Akashi, *J. Biol. Chem.*, 2011, **286**, 25823.
- [46] M. Rhee, P. Davis, *J. Biol. Chem.*, 2006, **281**, 1233.
- [47] K. Montrose, Y. Yang, X. Sun, S. Wiles, G. W. Krissansen, *Sci. Rep.*, 2013, **3**, 1661.
- [48] J.D. Ochocki, U. Igbaavboa, W.G. Wood, E.V. Wattenberg, M.D. Distefano, *Chem. Biol. Drug Des.*, 2010, **76**, 107.

- [49] M. M  e, S. EL Andaloussi, P. Lundin, N. Oskolkov, H.J. Johansson, P. Guterstam,   . Langel, J. Control. Release, 2009, **19**, 221.
- [50] S. Patel, M.R. Player, Expert. Opin. Investig. Drugs, 2008, **17**, 1865.
- [51] J.R. LaRochelle, G.B. Cobb, A. Steinauer, E. Rhoades, A. Schepartz, J. Am. Chem. Soc., 2015, **137**, 2536.
- [52] Q. Chu, R.E. Moellering, G.J. Hilinski, Y.-W. Kim, T.N. Grossmann, J.T.-H. Yeh, G.L. Verdine, Med. Chem. Commun., 2015, **6**, 111.
- [53] S. L. Lo, S. Wang, Biomaterials, 2008, **29**, 2408.
- [54] B.R. Liu, Y.W. Huang, J.G. Winiarz, H.J. Chiang, H.J. Lee, Biomaterials, 2011, **32**, 3520.
- [55] J. Regberg, L. Vasconcelos, F. Madani,   . Langel, M. H  llbrink, Int. J. Pharm., 2016, **501**, 32.
- [56] P.M. Fischer, N.Z. Zhelev, S. Wang, J.E. Melville, R. F  hraeus, D.P. Lane, J. Pept. Res., 2000, **55**, 163.
- [57] D. Delaroche, B. Aussedat, S. Aubry, G. Chassaing, F. Burlina, G. Clodic, G. Bolbach, S. Lavielle, S. Sagan, Anal. Chem., 2007, **79**, 1932.
- [58] A.N. Shirazi, N.S. El-Sayed, R.K. Tiwari, K. Tavakoli, K. Parang, Curr. Drug Deliv., 2016, **13**, 409.
- [59] D. Xu, D. Dustin, L. Jiang, D.S. Samways, H. Dong, Chem. Commun., 2015, **51**, 11757.
- [60] M.-L. Jobin, M. Blanchet, S. Henry, S. Chaignepain, C. Manigand, S. Castano, S. Lecomte, F. Burlina, S. Sagan, I.D. Alves, Biochim. Biophys. Acta, 2015, **1848**, 593.
- [61] A.J. de Jesus, T.W. Allen, Biochim. Biophys. Acta, 2013, **1828**, 864.
- [62] C. Bechara, M. Pallerla, Y. Zaltsman, F. Burlina, I.D. Alves, O. Lequin, S. Sagan, FASEB J., 2013, **27**, 738.
- [63] P. Perret, M. Ahmadi, L. Riou, S. Bacot, J. Pecher, C. Poillot, A. Broisat, C. Ghezzi, M. De Waard, Int. J. Mol. Sci., 2015, **16**, 27730.
- [64] D. Oupick  , A.L. Parker, L.W. Seymour, J. Am. Chem. Soc., 2002, **124**, 8.
- [65] J. Yoo, D.-Y. Lee, V. Gujrati, N.S. Rejinold, K.M. Lekshmi, S. Uthaman, C. Jeong, I.-K. Park, S. Jon, Y.-C. Kim, J. Control. Release, 2016, **246**, 142.
- [66] K. Montrose, Y. Yang, G.W. Krissansen, Sci. Rep., 2014, **4**, 4900.
- [67] J. Regberg, A. Srimanee, M. Erlandsson, R. Sillard, D.A. Dobchev, M. Karelson,   . Langel, Int. J. Pharm., 2014, **464**, 111.
- [68] N. Oskolkov, Int. J. Pept. Res. Ther., 2011, **17**, 147.
- [69] N. Purkayastha, K. Eyer, T. Robinson, P.S. Dittrich, A.K. Beck, D. Seebach, B. Kolesinska, R. Cadalbert, Chem. Biodivers., 2013, **10**, 1165.
- [70] T. Kato, H. Yamashita, T. Misawa, K. Nishida, M. Kurihara, M. Tanaka, Y. Demizu, M. Oba, Bioorg. Med. Chem., 2016, **24**, 2681.
- [71] M. Pooga, M. H  llbrink, M. Zorko,   . Langel, FASEB J., 1998, **12**, 67.
- [72] J.P. Richard, K. Melikov, E. Vives, C. Ramos, B. Verbeure, M.J. Gait, L.V. Chernomordik, B. Lebleu, J. Biol. Chem., 2003, **278**, 585.
- [73] S. Trabulo, A.L. Cardoso, M. Mano, M.C. Pedroso de Lima, Pharmaceuticals, 2010, **3**, 961.
- [74] R.M. Steinman, I.S. Mellman, W.A. Muller, Z.A. Cohn, J. Cell Biol., 1983, **96**, 1.
- [75] S.D. Conner, S.L. Schmid, Nature, 2003, **422**, 37.
- [76] J.L. Zaro, W.-C. Shen, Front. Chem. Sci. Eng., 2015, **9**, 407.
- [77] F. Madani, S. Lindberg, U. Langel, S. Futaki, A. Gr  slund, J. Biophys., 2011, **2011**, 414729.
- [78] Y. Kawaguchi, T. Takeuchi, K. Kuwata, J. Chiba, Y. Hatanaka I. Nakase, S. Futaki, Bioconjug. Chem., 2016, **27**, 1119.
- [79] T. Letoha, A. Keller-Pint  , E. Kusz, C. Kolozsi, Z. Bozs  , G. T  th, C. Vizler, Z. Ol  h, L.Szil  k, Biochim. Biophys. Acta, 2010, **1798**, 2258.
- [80] J. Zhou, W. Liu, R.-C. Pong, G. Hao, X. Sun, J.-T. Hsieh, Amino Acids, 2012, **42**, 1253.
- [81] T. Tsumuraya, M. Matsushita, PLoS One, 2014, **9**, e86639.
- [82] S. Futaki, I. Nakase, A. Tadokoro, T. Takeuchi, A.T. Jones, Biochem. Soc. Trans., 2007, **35**, 784.

- [83] J.P. Richard, K. Melikov, H. Brooks, P. Prevot, B. Lebleu, L.V. Chernomordik, *J. Biol. Chem.*, 2005, **280**, 15300.
- [84] M. Tyagi, M. Rusnati, M. Presta, M. Giacca, *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 3254.
- [85] H.L. Åmand, H.A. Rydberg, L.H. Fornander, P. Lincoln, B. Nordén, E.K. Esbjörner, *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, **1818**, 2669.
- [86] F. Illien, N. Rodriguez, M. Amoura, A. Joliot, M. Pallerla, S. Cribier, F. Burlina, S. Sagan, *Sci. Rep.*, 2016, **6**, 36938.
- [87] S.M. Fuchs, R.T. Raines, *Biochemistry*, 2004, **43**, 2438.
- [88] A. Ziegler, J. Seelig, *Biophys. J.*, 2008, **94**, 2142.
- [89] Y. Takechi-Haraya, R. Nadai, H. Kimura, K. Nishitsuji, K. Uchimura, K. Sakai-Kato, K. Kawakami, A. Shigenaga, T. Kawakami, A. Otaka, H. Hojo, N. Sakashita, H. Saito, *Biochim. Biophys. Acta*, 2016, **1858**, 1339.
- [90] L.E. Prevette, N.C. Benish, A.R. Schoenecker, K.J. Braden, *Biophys. Chem.*, 2015, **207**, 40.
- [91] H.C. Christianson, M. Belting, *Matrix Biol.*, 2014, 35, 51.
- [92] I. Nakase, A. Tadokoro, N. Kawabata, T. Takeuchi, H. Katoh, K. Hiramoto, M. Negishi, M. Nomizu, Y. Sugiura, S. Futaki, *Biochemistry*, 2007, **46**, 492.
- [93] I. Mäger, E. Eiríksdóttir, K. Langel, S. El Andaloussi, Ü. Langel, *Biochim. Biophys. Acta*, 2010, **1798**, 338.
- [94] P. Lundin, H. Johansson, P. Guterstam, T. Holm, M. Hansen, Ü. Langel, S. EL Andaloussi, *Bioconjug. Chem.*, 2008, **19**, 2535.
- [95] K. Matsuzaki, O. Murase, N. Fujii, K. Miyajima, *Biochemistry*, 1996, **35**, 11361.
- [96] S.J. Ludtke, K. He, W.T. Heller, T.A. Harroun, L. Yang, H.W. Huang, *Biochemistry*, 1996, **35**, 13723.
- [97] D. Derossi, S. Calvet, A. Trembleau, A. Brunissen, G. Chassaing, A. Prochiantz, *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**, 18188.
- [98] L. Yang, T. A. Harroun, T. M. Weiss, L. Ding, H. W. Huang, *Biophys. J.*, 2001, **81**, 1475.
- [99] G. Baumann, P. Mueller, *J. Cell. Biochem.*, 1974, **2**, 538.
- [100] Y. Pouny, D. Rapaport, A. Mor, P. Nicolas, Y. Shai, *Biochemistry*, 1992, **31**, 12416.
- [101] J.-P. Berlose, O. Convert, D. Derossi, A. Brunissen, G. Chassaing, *Eur. J. Biochem.*, 1996, **242**, 372.
- [102] E.G. Stanzl, B.M. Trantow, J.R. Vargas, P.A. Wender, *Acc. Chem. Res.*, 2013, **46**, 2944.
- [103] M. Di Pisa, G. Chassaing, J.-M. Swiecicki, *Biochemistry*, 2015, **54**, 194.
- [104] S. Kawamoto, M. Takasu, T. Miyakawa, R. Morikawa, T. Oda, S. Futaki, H. Nagao, *J. Chem. Phys.*, 2011, **134**, 095103.
- [105] I. Nakase, M. Niwa, T. Takeuchi, K. Sonomura, N. Kawabata, Y. Koike, M. Takehashi, S. Tanaka, K. Ueda, J.C. Simpson, A.T. Jones, Y. Sugiura, S. Futaki, *Mol. Ther.*, 2004, **10**, 1011.
- [106] M. Fretz, J. Jin, R. Conibere, N.A. Penning, S. Al-Taei, G. Storm, S. Futaki, T. Takeuchi, I. Nakase, A.T. Jones, *J. Control. Release*, 2006, **116**, 247.
- [107] M. Kosuge, T. Takeuchi, I. Nakase, A.T. Jones, S. Futaki, *Bioconjug. Chem.*, 2008, **19**, 656.
- [108] M.M. Fretz, N.A. Penning, S. Al-Taei, S. Futaki, T. Takeuchi, I. Nakase, G. Storm, A.T. Jones, *Biochem. J.*, 2007, **403**, 335.
- [109] A. Mishra, G. Hwee Lai, N.W. Schmidt, V.Z. Sun, A.R. Rodriguez, R. Tong, L. Tang, J. Cheng, T.J. Deming, D.T. Kamei, G.C.L. Wong, *Proc. Natl Acad. Sci.*, 2011, **108**, 16883.
- [110] J.M. Swiecicki, M. Di Pisa, F. Burlina, P. Lécorché, C. Mansuy, G. Chassaing, S. Lavielle, *Biopolymers*, 2015, **104**, 533.
- [111] P. Säälik, A. Niinep, J. Pae, M. Hansen, D. Lubenets, Ü. Langel, M. Pooga, *J. Control. Release*, 2011, **153**, 117.
- [112] D. Herce, A.E. Garcia, M.C. Cardoso, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 17459.
- [113] E. Eiríksdóttir, K. Konate, Ü. Langel, G. Divita, S. Deshayes, *Biochim. Biophys. Acta*, 2010, **1798**, 1119.

- [114] C.L. Watkins, P. Brennan, C. Fegan, K. Takayama, I. Nakase, S. Futaki, A.T. Jones, *J. Control. Release*, 2009, **140**, 237.
- [115] J. Pae, L. Liivamägi, D. Lubenets, P. Arukuusk, Ü. Langel, M. Pooga, *Biochim. Biophys. Acta*, 2016, **1858**, 1860.
- [116] E. Harreither, H.A. Rydberg, H.L. Åmand, V. Jadhav, L. Fliedl, C. Benda, M.A. Esteban, D. Pei, N. Borth, R. Grillari-Voglauer, O. Hommerding, F. Edenhofer, B. Nordén, J. Grillari, *Cell Regen.*, 2014, **3**, 2.
- [117] A. Fittipaldi, A. Ferrari, M. Zoppé, C. Arcangeli, V. Pellegrini, F. Beltram, M. Giacca, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 34141.
- [118] C.-Y. Jiao, D. Delaroche, F. Burlina, I.D. Alves, G. Chassaing, S. Sagan, *J. Biol. Chem.*, 2009, **284**, 33957.
- [119] F. Simeoni, M.C. Morris, F. Heitz, G. Divita, *Nucleic Acids Res.*, 2003, **31**, 2717.
- [120] B.R. Liu, M.-H. Chan, H.-H. Chen, S.-Y. Lo, Y.-W. Huang, H.-J. Lee, [w:] *Cell Membrane*, Nova Science Publishers, Inc., 2013.
- [121] J.C. Mai, H. Shen, S.C. Watkins, T. Cheng, P.D. Robbins, *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**, 30208.
- [122] S. Fawell, J. Seery, Y. Daikh, C. Moore, L.L. Chen, B. Pepinsky, J. Barsoum, *Proc. Natl Acad. Sci.*, 1994, **91**, 664.
- [123] S.R. Schwarze, A. Ho, A. Vocero-Akbani, S.F. Dowdy, *Science*, 1999, **285**, 1569.
- [124] D. Sarko, B. Beijer, R.G. Boy, E.-M. Nothelfer, K. Leotta, M. Eisenhut, A. Altmann, U. Haberkorn, W. Mier, *Mol. Pharmaceutics*, 2010, **7**, 2224.
- [125] A. Bolhassani, B. S. Jafarzade, G. Mardani, *Peptides*, 2017, **87**, 50.
- [126] Ülo Langel, *Cell-Penetrating Peptides*, Humana Press Inc., 2015.
- [127] Langel, Ülo, *Cell-Penetrating Peptides. Methods and Protocols*, CRC Press, 2011.
- [128] K. Ezzat, E.M. Zaghloul, S.E.L. Andaloussi, T. Lehto, R. El-Sayed, T. Magdy, C.I.E. Smith, Ü. Langel, *J. Control. Release*, 2012, **162**, 1.
- [129] S.A. Moschos, S.W. Jones, M.M. Perry, A.E. Williams, J.S. Erjefalt, J.J. Turner, P.J. Barnes, B.S. Sproat, M.J. Gait, M.A. Lindsay, *Bioconjug. Chem.*, 2007, **18**, 1450.
- [130] Z. Wang, Y. Chen, E. Liu, J. Gong, S. M. Cheol, Y. Huang, *Protein Pept. Lett.*, 2014, **21**, 1129.
- [131] N. Kamei, E.J.B. Nielsen, T. Nakakubo, Y. Aoyama, U.L. Rahbek, B.L. Pedersen, M. Takeda-Morishita, *J. Pharm. Sci.*, 2016, **105**, 747.
- [132] S.R. Schwarze, K.A. Hruska, S.F. Dowdy, *Trends Cell Biol.*, 2000, **10**, 290.
- [133] S. Liu, H. Yang, L. Wan, J. Cheng, X. Lu, *Cancer Biother. Radiopharm.*, 2013, **28**, 289.
- [134] K.J. Lim, B.H. Sung, J.R. Shin, Y.W. Lee, D.J. Kim, K.S. Yang, S.C. Kim, *PLoS One*, 2013, **8**, e66084.
- [135] W. Wang, M. Li, Z. Zhang, C. Cui, J. Zhou, L. Yin, H. Lv, *Carbohydr. Polym.*, 2017, **156**, 97.
- [136] Y. Yamada, M. Hashida, H. Harashima, *Biomaterials*, 2015, **52**, 189.
- [137] M.C. Shin, J. Zhang, K.A. Min, K. Lee, C. Moon, J.P. Balthasar, V.C. Yang, *J. Control. Release*, 2014, **194**, 197.
- [138] N. Li, T. Li, C. Liu, S. Ye, J. Liang, H. Han, *J. Biomed. Nanotechnol.*, 2016, **12**, 878.
- [139] J. Chen, S. Li, Q. Shen, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2012, **47**, 430.
- [140] G. Sharma, A. Modgil, B. Layek, K. Arora, C. Sun, B. Law, J. Singh, *J. Control. Release*, 2013, **167**, 1.
- [141] N. Jiménez-Mancilla, G. Ferro-Flores, C. Santos-Cuevas, B. Ocampo-García, M. Luna-Gutiérrez, E. Azorín-Vega, K. Isaac-Olivé, M. Camacho-López, E. Torres-García, *J. Label Compd. Radiopharm.*, 2013, **56**, 663.
- [142] J. Li, X. Zhang, M. Wang, X. Li, H. Mu, A. Wang, W. Liu, Y. Li, Z. Wu, K. Sun, *Int. J. Pharm.*, 2016, **501**, 112.
- [143] Y. Liu, L. Mei, Q. Yu, Q. Zhang, H. Gao, Z. Zhang, Q. He, *Amino Acids*, 2015, **47**, 2533.
- [144] X. Xie, Y. Yang, Y. Yang, H. Zhang, Y. Li, X. Mei, *Drug Deliv.*, 2016, **23**, 2445.
- [145] W. Lin, X. Xie, J. Deng, H. Liu, Y. Chen, X. Fu, H. Liu, Y. Yang, *J. Drug Target.*, 2016, **24**, 134.

- [146] Y. Matsumura, H. Maeda, *Cancer Res.*, 1986, **46**, 6387.
- [147] H. Maeda, G.Y. Bharate, J. Daruwalla, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2009, **71**, 409.
- [148] R.A. Morshed, M.E. Murosaki, Q. Dai, M.L. Wegscheid, B. Auffinger, D. Yu, Y.Han, L. Zhang, M. Wu, Y. Cheng M. S. Lesniak, *Mol. Pharm.*, 2016, **13**, 1843.
- [149] J. Zhang, M. Li. Z. Yuan, D. Wu, J. Chen, J. Feng, *J. Nanopart. Res.*, 2016, **18**, 299.
- [150] D. Yu, C. Jin, J. Leja, N. Majdalani, B. Nilsson, F. Eriksson, M. Essand, J. Virol., 2011, **85**, 13114.
- [151] Y. Eto, Y. Yoshioka, R. Asavatanabodee, S. Kida, M. Maeda, Y. Mukai, H. Mizuguchi, K. Kawasaki, N. Okada, S. Nakagawa, *Peptides*, 2009, **30**, 1548.
- [152] Y. Liu, Y. J. Kim, M. Ji, J. Fang, N. Siriwon, L.I. Zhang, P. Wang, *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, 2014, **1**, 12.
- [153] D.C. Anderson, E. Nichols, R. Manger, D. Woodle, M. Barry, A.R. Fritzberg, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, **194**, 876.
- [154] H. He, L. Sun, J. Ye, E. Liu, S. Chen, Q. Liang, M.C. Shin, V.C. Yang, *J. Control. Release*, 2016, **240**, 67.
- [155] S.M. van Duijnhoven, M.S. Robillard, K. Nicolay, H. Grüll, *Contrast Media Mol. Imaging*, 2015, **10**, 59.
- [156] T. Jiang, E.S. Olson, Q.T. Nguyen, M. Roy, P.A. Jennings, R.Y. Tsien, *Proc. Natl Acad. Sci.*, 2004, **21**, 17867.
- [157] N.Q. Shi, W. Gao, B. Xiang, X.R. Qi, *Int. J. Nanomedicine*, 2012, **7**, 1613.
- [158] C.D. Malone, E.S. Olson, R.F. Mattrey, T. Jiang, R.Y. Tsien, Q.T. Nguyen, *PLoS One*, 2015, **10**, e0137104.
- [159] S.A. Bode, M.B. Hansen, R.A. Oerlemans, J.C. van Hest, D.W. Löwik, *Bioconjug. Chem.*, 2015, **26**, 850.
- [160] Z. Liu, M. Xiong, J. Gong, Y. Zhang, N. Bai, Y. Luo, L. Li, Y. Wei, Y. Liu, X. Tan, R. Xiang, *Nat. Commun.*, 2014, **5**, 4280.
- [161] T.J. Harris, G. von Maltzahn, M.E. Lord, J.-H. Park, A. Agrawal, D.-H. Min, M.J. Sailor, S.N. Bhatia, *Small*, 2008, **4**, 1307.
- [162] K.-L. Veiman, K. Künnapuu, T. Lehto, K. Kiisholts, K. Pärn, Ü. Langel, K. Kurrikoff, *J. Control. Release*, 2015, **209**, 238.
- [163] I.F. Tannock, D. Rotin, *Cancer Res.*, 1989, **49**, 4373.
- [164] X. Zhang, Y. Lin, R.J. Gillies, *J. Nucl. Med.*, 2010, **51**, 1167.
- [165] Y. Ding, D. Sun, G.L. Wang, H.G. Yang, H.F. Xu, J.H. Chen, Y. Xie, Z. Q. Wang, *Int. J. Nanomedicine*, 2015, **10**, 6199.
- [166] H. Cheng, J.-Y. Zhu, X.-D. Xu, W.-X. Qiu, Q. Lei, K. Han, Y.-J. Cheng, X.-Z. Zhang, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2015, **7**, 16061.
- [167] D.K. Schach, W. Rock, J. Franz, M. Bonn, S.H. Parekh, T. Weidner, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, **137**, 12199.
- [168] J.E. Baio, D. Schach, A.V. Fuchs, L. Schmüser, N. Billecke, C. Bubeck, K. Landfester, M. Bonn, M. Bruns, C.K. Weissac, T. Weidner, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 273.
- [169] C. Sun, W.-C. Shen, J. Tu, J. L. Zaro, *Mol. Pharm.*, 2014, **11**, 1583.
- [170] W. Zhang, J. Song, B. Zhang, L. Liu, K. Wang, R. Wang, *Bioconjug. Chem.*, 2011, **22**, 1410.
- [171] S.H. Lee, E. Moroz, B. Castagner, J.C. Leroux, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 12868.
- [172] R. Weinstain, E.N. Savariar, C.N. Felsen, R.Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 874.
- [173] Y. Yang, Y. Yang, X. Xie, X. Cai, H. Zhang, W. Gong, Z. Wang, X. Mei, *Biomaterials*, 2014, **35**, 4368.
- [174] S.R. MacEwan, A. Chilkoti, *Biopolymers*, 2010, **94**, 60.
- [175] S.M. Hearst, Q. Shao, M. Lopez, D. Raucher, P.J. Vig, *J. Neurochem.*, 2014, **131**, 101.
- [176] L.R. Walker, J.S. Ryu, E. Perkins, L.R. McNally, D. Raucher, *Drug Des. Devel. Ther.*, 2014, **8**, 1649.
- [177] S.R. MacEwan, A. Chilkoti, *Nano Lett.*, 2014, **14**, 2058.

- [178] S.-K. Wu, C.-F. Chiang, Y.-H. Hsu, T.-H. Lin, H.-C. Liou, W.-M. Fu, W.-L. Lin, *Int. J. Nanomedicine*, 2014, **9**, 4485.
- [179] W. Lin, X. Xie, Y. Yang, X. Fu, H. Liu, Y. Yang, J. Deng, *Drug Deliv.*, 2016, **23**, 3436.
- [180] Y. Yang, X. Xie, X. Xu, X. Xia, H. Wang, L. Li, W. Dong, P. Ma, Y. Yang, Y. Liu, X. Mei, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2016, **146**, 607.
- [181] H. Li, T. Y. Tsui, W. Ma, *J. Pharm. Pharmacol.*, 2015, **67**, 1215.
- [182] Y. Yang, Y.F. Yang, X.Y. Xie, Z.Y. Wang, W. Gong, H. Zhang, Y. Li, F.L. Yu, Z.P. Li, X.G. Mei, *Biomaterials*, 2015, **48**, 84.
- [183] Y. Yang, X. Xie, Y. Yang, Z. Li, F. Yu, W. Gong, Y. Li, H. Zhang, Z. Wang, X. Mei, *Mol. Pharmaceutics*, 2016, **13**, 1508.
- [184] S.M. Farkhani, M. Johari-Ahar, P. Zakeri-Milani, J. Shahbazi Mojarrad, H. Valizadeh, *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.*, 2016, **44**, 1424.
- [185] S.Q. Wu, C.W. Chi, C.X. Yang, X.P. Yan, *Anal. Chem.*, 2016, **88**, 4114.
- [186] X. Zhao, T. Shang, X. Zhang, T. Ye, D. Wang, L. Rei, *Nanoscale Res. Lett.*, 2016, **11**, 451.
- [187] K.-H. Lin, S.-T. Hong, H.-T. Wang, Y.-L. Lo, A. M.-Y. Lin, J. C.-H. Yang, *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, **17**, E1998.
- [188] X. Chen, M. Yuan, Q. Zhang, Y.T. Yang, H. Gao, Q. He, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2016, **17**, 636.
- [189] J.W. McGowan, Q. Shao, P.J. Vig, G.L. Bidwell III, *Drug Des. Devel. Ther.*, 2016, **10**, 2803.
- [190] S. Zhu, S. Chen, Y. Gao, F. Guo, F. Li, B. Xie, J. Zhou, H. Zhong, *Drug Deliv.*, 2016, **23**, 1980.
- [191] Y. Daimon, N. Kamei, K. Kawakami, M. Takeda-Morishita, H. Izawa Y. Takechi-Haraya, H. Saito, H. Sakai, M. Abe, K. Ariga, *Mol. Pharmaceutics*, 2016, **13**, 4034.
- [192] J.B. Rothbard, S. Garlington, Q. Lin, T. Kirschberg, E. Kreider, P.L. McGrane, P.A. Wende, P.A. Khavari, *Nat. Med.*, 2000, **6**, 1253.
- [193] M. Cohen-Avrahami, D. Libster, A. Aserin, N. Garti, *J. Phys. Chem. B.*, 2011, **115**, 10189.
- [194] M. Rizzuti, M. Nizzardo, C. Zanetta, A. Ramirez, S. Corti, *Drug Discov. Today*, 2015, **20**, 76.
- [195] R.R. Sawant, N.R. Patel, V. . Torchilin, *Eur. J. Nanomed.*, 2013, **5**, 141.
- [196] M. DHill, R.H. Martin, D. Mikulis, J.H. Wong, F.L. Silver, K.G. terBrugge, G. Milot, W.M. Clark, R.L. MacDonald, M.E. Kelly, M. Boulton, I. Fleetwood, C. McDougall, T. Gunnarsson, M. Chow, C. Lum, R. Dodd, J. Poublanc, T. Krings, A.M. Demchuk, M. Goyal, R. Anderson, J. Bishop, D. Garman, M. Tymianski, *Lancet Neurol.*, 2012, **11**, 942.
- [197] M.A. Warso, J.M. Richards, D. Mehta, K. Christov, C. Schaeffer, L. Rae Bressler, T. Yamada, D. Majumdar, S.A. Kennedy, C.W. Beattie, T.K. Das Gupta, *Br. J. Cancer*, 2013, **108**, 1061.
- [198] H. Kim, S. Moodley, M. Liu, *Drug Deliv. Transl. Res.*, 2015, **5**, 275.
- [199] R. Coriat S.J. Faivre, O. Mir, C. Dreyer, S. Ropert, M. Bouattour, R. Desjardins, F. Goldwasser, E. Raymond, *Int. J. Nanomed.*, 2016, **11**, 6207.
- [200] C. de Coupade, A. Fittipaldi, V. Chagnas, M. Michel, S. Carlier, E. Tasciotti, A. Darmon, D. Ravel, J. Kearsey, M. Giacca, F. Cailler, *Biochem. J.*, 2005, **390**, 407.

METODY CHEMICZNEJ LIGACJI W SYNTEZIE PEPTYDÓW I BIAŁEK – CZĘŚĆ I

CHEMICAL LIGATION METHODS IN THE SYNTHESIS OF PEPTIDES AND PROTEINS – PART I

**Magdalena Kropidłowska*, Katarzyna Jędrzejewska,
Ewa Wieczerzak**

*Katedra Chemii Biomedycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdańskiego
ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk
e-mail: magdalena.kropidlowska@phdstud.ug.edu.pl

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Natywna chemiczna ligacja (NCL)

1.1. Mechanizm oraz warunki reakcji NCL

1.2. Zalety i ograniczenia reakcji NCL

2. Kinetyczne kontrolowane ligacje (KCL)

3. NCL peptydów niezawierających w sekwencji reszty cysteiny

3.1. NCL z wykorzystaniem selenocysteiny

3.2. NCL z wykorzystaniem reszty histydyny

3.3. Chemiczna modyfikacja produktów NCL

3.3.1. Alkilowanie i tioalkilowanie

3.3.2. Katalityczna desulfuryzacja reszt cysteiny

3.3.3. Alkilowanie homocysteiny

3.4. Zastosowanie grup pomocniczych

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

Mgr Magdalena Kropidłowska ukończyła studia magisterskie na Wydziale Chemiczny Uniwersytetu Gdańskiego, broniąc w 2014 roku pracę pt. „Zastosowanie natywnej chemicznej ligacji do syntezy C-terminalnego fragmentu cystatyny C”. W tym samym roku rozpoczęła studia doktoranckie w Katedrze Chemicznej Biomedycznej Uniwersytetu Gdańskiego. Swoją pracę doktorską realizuje pod kierownictwem prof. dr hab. Franciszka Kasprzykowskiego. W ramach pracy doktorskiej zajmuje się poszukiwaniem modulatorów aktywności ludzkiego proteasomu h20S wśród związków pochodzenia naturalnego, takich jak polifenole i peptydy cykliczne izolowane z cyjanobakterii.

Mgr Katarzyna Jędrzejewska, absolwentka Uniwersytetu Gdańskiego na Wydziale Chemiczny. W 2016 roku uzyskała tytuł magistra na kierunku Chemiczna, pracę dyplomową wykonywała w Katedrze Chemicznej Biomedycznej. Obecnie jest słuchaczką Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemiczny UG, gdzie wykonuje pracę doktorską pod kierunkiem dr hab. Elżbiety Jankowskiej. W swoich badaniach zajmuje się projektowaniem i syntezą peptydów i peptydomimetyków, których sekwencje oparte są na strukturach naturalnych białkowych aktywatorów proteasomu oraz ich badaniem pod kątem możliwości modulowania aktywności ludzkiego proteasomu h20S.

Dr Ewa Wieczerek, absolwentka Wydziału Chemiczny Uniwersytetu Gdańskiego. Obecnie jest adiunktem w Katedrze Chemicznej Biomedycznej na Wydziale Chemiczny UG. W swojej pracy naukowej zajmuje się projektowaniem, syntezą i badaniami biologicznymi peptydów i peptydomimetyków o potencjalnym działaniu terapeutycznym (inhibitatory proteaz cysteinyowych, inhibitatory/aktywatory proteasomu). Jej zainteresowania naukowe dotyczą również poszukiwania struktur wiodących umożliwiających projektowanie związków o potencjalnym działaniu terapeutycznym wśród substancji pochodzenia naturalnego.

ABSTRACT

Proteins are biological macromolecules affecting very important functions in the body. They are involved in many biochemical processes. They can perform catalytic functions acting as enzymes. They also participate in the transport of many small molecules and ions – for example one molecule of hemoglobin carries four molecules of oxygen. In addition, proteins serve as antibodies and are involved in transmission of nerve impulses as receptor proteins. Because peptides and proteins perform so important functions, to study them it is essential to obtain these compounds in the greatest possible amounts. The compounds can be obtained generally by three main methods:

- by isolation of the native peptides and proteins
- by expression in microorganisms
- by chemical synthesis.

Each of the above methods has its advantages and disadvantages, but only the chemical synthesis gives the possibility to introduce modifications to the structure of the resulting protein, such as the insertion of new functional groups, to give the product in the final form and with satisfactory yield.

In this review we present the application of chemical ligation methods in the synthesis of peptides and proteins. We describe in details mechanism of native chemical ligation method and the conditions necessary to carry the reaction [1]. The synthesis of long polypeptide chains by kinetically controlled ligation (KCL) is also depicted [2]. This part of the paper also details a number of approaches to non-cysteine containing peptides by chemical ligation methods.

Keywords: Native chemical ligation, NCL, Kinetic controlled ligation, KCL, peptide synthesis

Słowa kluczowe: Natywna chemiczna ligacja, NCL, Kinetyczne kontrolowana ligacja, KCL, synteza peptydów

WYKAZ STOSOWANYCH SYMBOLI I OZNACZEŃ

Boc	– grupa <i>tert</i> -butoksykarbonylowa
C-peptyd	– fragment peptydowy, na którego N-końcu znajduje się reszta cysteiny
Fmoc	– grupa fluorenylo-9-metoksykarbonylowa
KCL	– kinetyczne kontrolowana ligacja (ang. <i>Kinetically Controlled Ligation</i>)
MESNA	– 2-merkaptotetanosulfonian sodu
Mpa	– kwas 3-merkaptopropionowy
MPAA	– kwas 4-merkaptofenylooctowy
NCL	– natywna chemiczna ligacja (ang. <i>Native Chemical Ligation</i>)
N-peptyd	– fragment peptydowy, na którego C-końcu znajduje się ugrupowanie tioestrowe
SAr	– tioester arylowy
SDS	– dodecylosiarczan sodu
SR	– tioester alkilowy
TCEP	– tris(2-karboksyetylo)fosfina
TFA	– kwas trifluorooctowy
Thz	– tiazolidyna
TMSBr	– bromotrimetylosilan
Xaa	– reszta aminokwasu

WPROWADZENIE

Białka to makromolekuły biologiczne spełniające bardzo ważne funkcje w organizmie. Biorą udział w wielu procesach biochemicalnych. Struktury te mogą pełnić funkcje katalityczne, działając jako enzymy. Uczestniczą też w transporcie wielu małych cząsteczek i jonów – przykładowo jedna cząsteczka hemoglobiny przenosi cztery cząsteczki tlenu. Ponadto białka służą jako przeciwciała oraz biorą udział w przekazywaniu impulsów nerwowych jako białka receptorowe. W związku z tym, że peptydy i białka pełnią tak ważne funkcje, aby móc te funkcje badać istotna staje się możliwość pozyskiwania tych związków w jak największej ilości. Białka pozykuje się generalnie za pomocą trzech głównych metod:

- wykorzystując izolację natywnych peptydów i białek,
- za pomocą ekspresji w mikroorganizmach,
- poprzez chemiczną syntezę.

Każda z powyższych metod ma swoje zalety i wady, ale jedynie chemiczna synteza daje możliwość wprowadzenia modyfikacji w budowę otrzymywanego białka, takiej jak na przykład wprowadzenie nienaturalnych grup funkcyjnych, co prowadzi do otrzymania produktu w ostatecznej formie i z zadowalającą wydajnością.

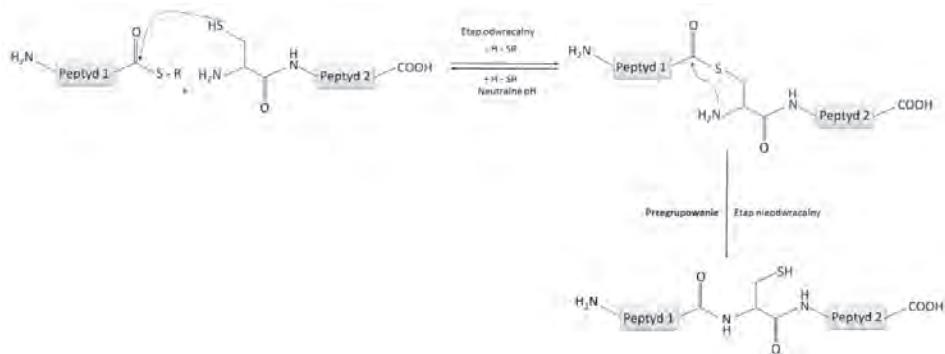
Powszechnie stosowaną techniką syntezy fragmentów peptydowych jest opracowana przez Bruce'a Merrifielda w drugiej połowie XX w. metoda syntezy na nośniku stałym [3]. Otrzymane w ten sposób, liniowe fragmenty peptydowe składające się z 30–40 reszt aminokwasów, można połączyć w większe cząsteczki za pomocą sprzągania. Podczas łączenia dwóch fragmentów peptydowych z osłoniętymi grupami funkcyjnymi, tworzy się selektywnie wiązanie peptydowe, a w następnej kolejności usuwane są grupy ochronne. Ze względu na możliwość wystąpienia epimeryzacji oraz agregacji dużych odcinków peptydowych oraz częste problemy z ich rozpuszczalnością, strategia ta jest znacznie ograniczona [4]. Dlatego też aby otrzymać większe fragmenty peptydowe coraz częściej stosuje się chemoselektywne reakcje ligacji nieosłoniętych fragmentów peptydowych takie jak natywna chemiczna ligacja (NCL) czy kinetyczna kontrolowana ligacja (KCL).

1. NATYWNA CHEMICZNA LIGACJA

Natywna chemiczna ligacja została opisana po raz pierwszy przez Kenta i Dawsona w 1994 roku [5]. Jest to chemoselektywna reakcja kondensacji dwóch niechronionych fragmentów peptydowych, które można otrzymać za pomocą syntezy na nośniku stałym stosując strategię Boc lub Fmoc. Fragmenty biorące udział w reakcji zostały tak zaprojektowane, by reagowały ze sobą tylko poszczególne grupy funkcyjne – tzn. tioester znajdujący się na C-końcu jednego peptydu (*N*-peptyd) z grupą tiolową cysteiny znajdującej się na *N*-końcu drugiego peptydu (*C*-peptyd). Głównym produktem reakcji jest białko lub peptyd z natywnym wiązaniem amidowym w miejscu ligacji.

1.1. MECHANIZM ORAZ WARUNKI REAKCJI NCL

Natywna chemiczna ligacja jest techniką chemoselektywnego łączenia fragmentów peptydowych, opierającą się na procesie przegrupowania. Mechanizm reakcji jest dwuetapowy (Schemat 1). W pierwszym etapie następuje atak nukleofilowej grupy tiolowej reszty cysteiny znajdującej się na N-końcu jednego fragmentu peptydowego na elektrofilowy atom węgla grupy tioestrowej znajdującej się na C-końcu drugiego fragmentu peptydowego. Ten etap reakcji to odwracalna trans-tioestryfikacja, w wyniku której powstaje produkt pośredni związany wiązaniem tioestrowym, zawierający wolną grupę aminową. Zachodzi ona w obecności egzogennego tiolowego katalizatora, zwiększającego wydajność reakcji. W kolejnym etapie następuje wewnętrzczasteczkowy atak nukleofilowy wolnej pary elektroneowej atomu azotu z grupy aminowej na karbonylowy atom węgla tioestru i spontaniczne, nieodwracalne przegrupowanie, zachodzące poprzez pięcioczłonowy stan przejściowy, skutkujące przeniesieniem acylu $S\rightarrow N$. Prowadzi to do powstania produktu ostatecznego połączonego natywnym wiązaniem peptydowym, a w odpowiednio dobranych warunkach otrzymane białko bądź polipeptyd może uzyskać strukturę trzeciorzędową dzięki pofałdowaniu. Ponadto produkt otrzymywany jest w ostatecznej formie i nie ma konieczności dalszych modyfikacji. Zaletą reakcji jest brak racemizacji reszty aminokwasowej znajdującej się przy tioestrze N-peptydu [6].

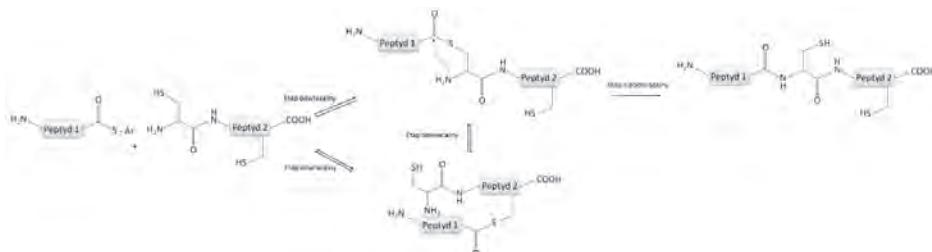


Schemat 1. Mechanizm reakcji natywnej chemicznej ligacji

Scheme 1. Mechanism of native chemical ligation reaction

Odwracalność pierwszego etapu gwarantuje, że produkt powstanie z dużą wydajnością, nawet jeśli w łańcuchu któregoś z peptydów znajdowały się dodatkowe reszty cysteiny. Świadczy to o regioselektywności reakcji. Występowanie dodatkowych reszt cysteiny wewnętrznych reagujących fragmentów peptydowych nie ma wpływu na wydajność reakcji, ponieważ nie uczestniczą one w reakcji NCL. Nieodwracalne przeniesienie acylu $S\rightarrow N$ jest możliwe jedynie dla N-końcowej reszty cysteiny i zachodzi poprzez pięcioczłonowy stan przejściowy w drugim etapie reakcji ligacji. Każda pozostała reszta cysteiny uczestnicząca w tworzeniu tioestru szybko wraca

do pierwotnego stanu (Schemat 2) dzięki obecności nadmiaru tiolowego katalizatora [7].



Schemat 2. Równowaga pomiędzy tioestrami peptydów
Scheme 2. Equilibrium between peptide thioesters

1.2. ZALETY I OGRANICZENIA REAKCJI NCL

Główną zaletą natywnej chemicznej ligacji są łagodne warunki reakcji, która zachodzi w buforze wodnym o obojętnym pH (6,8–7,0) zawierającym 6M wodny roztwór chlorowodorku guanidyny. Neutralne środowisko jest istotne z dwóch powodów:

- kwasowe warunki nie sprzyjają zachodzeniu reakcji NCL, gdyż spada reaktywność grupy tiolowej oraz grupy aminowej cysteiny znajdującej się na N-końcu C-peptydu,
- w warunkach zasadowych tioestry są niestabilne, gdyż ulegają utlenieniu, poza tym w silnie zasadowych warunkach reszta lisyny staje się podatna na reakcję z tioestrem.

Dzięki zastosowaniu łagodnych warunków, NCL rozwiązuje problemy z racemizacją i rozpuszczalnością występujące w klasycznej syntezie peptydów z wykorzystaniem fragmentów osłoniętych. Metoda ta umożliwia tworzenie dużych łańcuchów peptydowych, gdyż nie ma naturalnych barier dla wydajnego sprzągania długich fragmentów peptydowych.

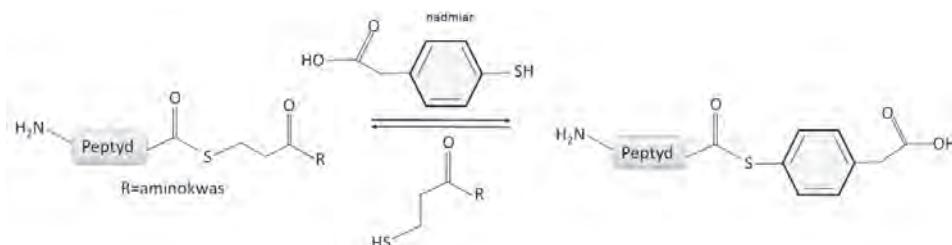
Natywna chemiczna ligacja jest reakcją chemoselektywną, ponieważ w jej wyniku nie tworzą się produkty uboczne, będące wynikiem reakcji z niezabezpieczonymi grupami funkcyjnymi aminokwasów obecnych w łańcuchach reagujących fragmentów peptydowych.

Czynnikiem ograniczającym reakcję NCL jest to, że zachodzi wyłącznie w peptydach zawierających na N-końcu resztę cysteiny, czyli jeden z aminokwasów rzadko występujących w białkach. Jeśli w odpowiednim miejscu w białku nie występuje cysteina ograniczenie to można jednak przewyciążyć, między innymi wprowadzając ten aminokwas w miejscu zachodzenia ligacji. Sklonność cysteiny do tworzenia wiązań disulfidowych sprawia jednak, że wprowadzenie dodatkowych grup tiolowych do sekwencji może wpływać niekorzystnie na strukturę bądź funkcje

tworzonego białka. Może to uniemożliwić jego właściwe pofałdowanie, bądź zakłócić funkcjonowanie białka już pofałdowanego [8].

W przypadku gdy któryś z reagujących fragmentów peptydowych nie jest rozpuszczalny w standardowych warunkach reakcji, można dodać odczynnika denaturującego (chlorowodorek guanidyny, mocznik) lub detergentów takich jak dodecylosiarczan sodu (SDS) [9].

Bardzo ważnym czynnikiem w reakcji NCL jest budowa tioestru, który musi wykazywać dość wysoką reaktywność. Tioestry arylowe są bardziej reaktywne, ale mniej stabilne od alkilowych, a co za tym idzie trudniejsze do otrzymania. Przez to powszechnie syntezuje się tioestry peptydowe jako pochodną alkilową m.in. 4-merkaptoetanosulfonianu sodu (MESNA) i dopiero w następnej kolejności przekształca je za pomocą reakcji transtioestryfikacji w tioestry arylowe dodając pochodne tiofenoli np. rozpuszczalnego w wodzie kwasu 4-merkaptophenylooctowego (MPAA) [10] (Schemat 3).



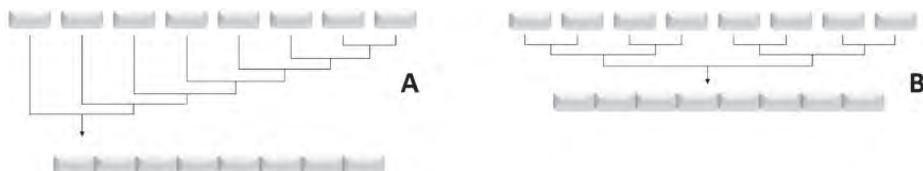
Schemat 3. Reakcja wymiany tioestru alkilowego na tioester arylowy
Scheme 3. Exchange reaction of alkyl to aryl thioester

MPAA charakteryzuje się uniwersalnością i efektywnością, gdyż peptydy i białka otrzymane przy jego pomocy uzyskuje się z wysoką wydajnością. Dodatkowo katalizator ten rozpuszcza się w wodzie, a jego zapach nie jest drażniący, czego można by się spodziewać po związkowi siarki. Tioestry alkilowe bardzo szybko i niemal całkowicie podlegają reakcji transtioestryfikacji pod wpływem MPAA, jest on też idealną grupą odchodzącą w reakcji NCL.

Na szybkość reakcji NCL ma również wpływ charakter C-końcowej reszty aminokwasowej tioestru. Badania przeprowadzone przez Dawsona ze współpracownikami wykazały, że wszystkie 20 naturalnych aminokwasów ulega natywnej chemicznej ligacji [11], jednak reakcja będzie najszybsza i najwydajniejsza w przypadku gdy zastosuje się najmniej rozbudowany aminokwas poprzedzający C-końcową grupę tioestrową, taki jak glicyna lub alanina. Peptydy zawierające takie mało rozgałęzione aminokwasy reagują ilościowo w mniej niż 4 godziny, natomiast tioestry, które są poprzedzone β -rozgałęzionymi aminokwasami, jak izoleucyna i walina lub prolinę nie dają ilościowej przemiany nawet po 48 godzinach. W celu zwiększenia efektywności reakcji podczas syntezy z użyciem zatłoczonych sterycznie tioestrów wymagane jest zastosowanie bardziej reaktywnych tioli jako katalizatorów [10].

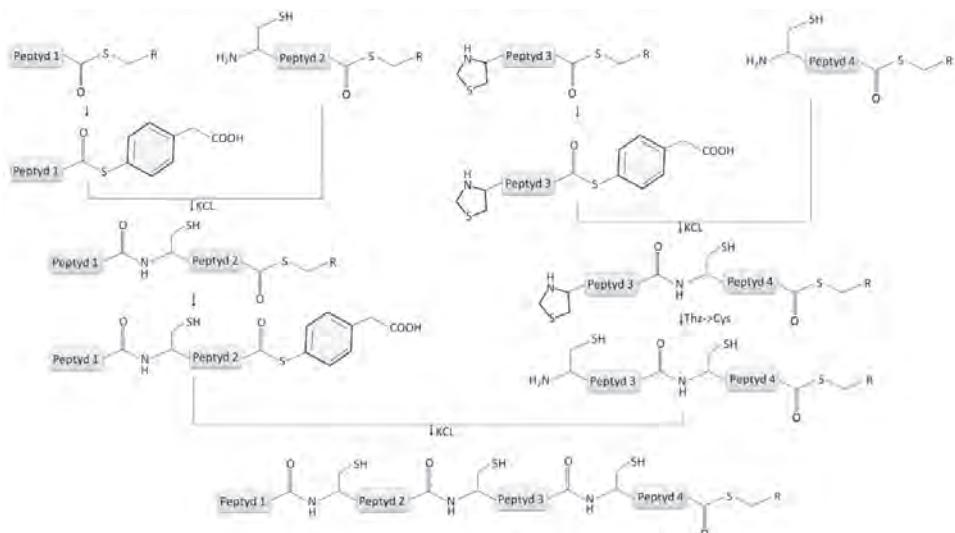
2. KINETYCZNIE KONTROLOWANA LIGACJA

Synteza długich łańcuchów polipeptydowych oraz białek metodą chemicznej ligacji często wymaga połączenia trzech, a nawet więcej niechronionych fragmentów peptydowych. Najlepszym rozwiązaniem byłaby synteza zbieżna, w której reakcje biegną równolegle, dzięki czemu osiąga się większe wydajności niż w przypadku ligacji sekwencyjnej, jednakże peptydy nieposiadające osłon mogłyby reagować chaotycznie, tworząc nieodpowiednie produkty (Schemat 4).



Schemat 4. Porównanie dwóch strategii syntezy chemicznej: a – sekwencyjnej ligacji, b – ligacji zbieżnej
Scheme 4. Comparison of two chemical synthesis strategies: a – sequential ligation, b – convergent ligation

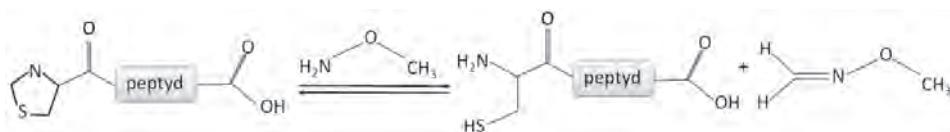
Związanie kilku nieposiadających żadnych osłon fragmentów peptydowych, w odpowiedniej kolejności, jest możliwe dzięki kinetycznemu kontrolowanemu ligacjom (KCL) (Schemat 5). W reakcji tej wykorzystywane są różnice w reaktywności tioestrów alkilowych i arylowych w reakcji chemicznej ligacji. Poprzez wprowadzenie bardziej reaktywnego tioestru arylowego do fragmentu peptydowego mającego ulec w pierwszej kolejności ligacji, można uporządkować kolejność zachodzących reakcji [2, 12].



Schemat 5. Reakcja kinetycznej kontrolowanej ligacji (KCL)
Scheme 5. The reaction of kinetically controlled ligation (KCL)

Głównym problemem jest ewentualna reaktywność wewnętrznych fragmentów polipeptydu, które zawierają nie tylko resztę cysteiny na N-końcu, ale i na C-końcu ugrupowanie tioesterowe.

Reakcja KCL może zachodzić zarówno w kierunku od C- do N-końca, jak i od N- do C-końca, natomiast reakcja NCL jedynie od N- do C-końca. Gdy reakcja KCL zachodzi od C-końca do N-końca można zablokować tymczasowo resztę cysteiny wewnętrznych fragmentów za pomocą ugrupowania tiazolidynowego (Thz). Po przeprowadzeniu reakcji z użyciem tioestru, pierścień Thz można otworzyć używając chlorowodorku metoksyaminy w środowisku kwaśnym co prowadzi do odtworzenia reszty cysteiny (Schemat 6) [13]. Łagodne utlenianie w końcowym etapie reakcji, po utworzeniu całego łańcucha polipeptydowego, powoduje utworzenie mostków disulfidowych, a białko ulega pofałdowaniu [6, 14].



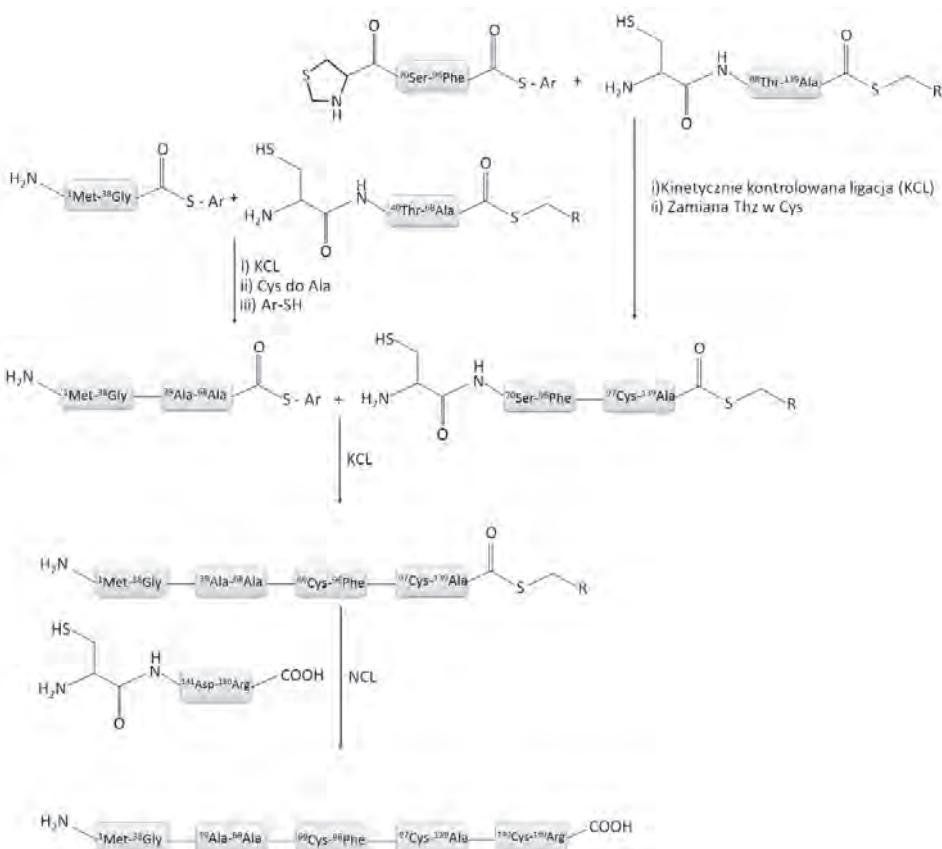
Schemat 6. Reakcja otwierania pierścienia tiazolidyny (Thz)

Scheme 6. Thiazolidine (Thz) ring opening reaction

Przykładem enzymu otrzymanego za pomocą KCL i NCL jest 203-aminokwasowy homodimer proteazy HIV-1. Zsyntezowane z czterech fragmentów peptydowych białko wykazywało pełną aktywność enzymatyczną [15].

Na drodze KCL i NCL otrzymano również wykazujący pełną aktywność katalityczną ludzki lizozym. Jest to enzym zbudowany ze 130 reszt aminokwasowych, w tym osmu reszt cysteiny. Jego syntezę przeprowadzono łącząc cztery fragmenty peptydowe [14].

Poprzez połączenie pięciu fragmentów peptydowych natomiast przeprowadzono syntezę białka nowotworowego NY-ESO-1 zbudowanego ze 180 reszt aminokwasowych. W syntezie przeprowadzono desulfuryzację wprowadzonych trzech nienatywnych reszt cysteiny, a także przekształcenie utlenionej formy metioniny do natywnej metioniny (Schemat 7) [16].



Schemat 7. Reakcje ligacji prowadzące do otrzymania białka nowotworowego NY-ESO-1 zbudowanego ze 180 reszt aminokwasowych
 Scheme 7. The ligation reactions leading to tumor protein NY-ESO-1, composed of 180 amino acid residues

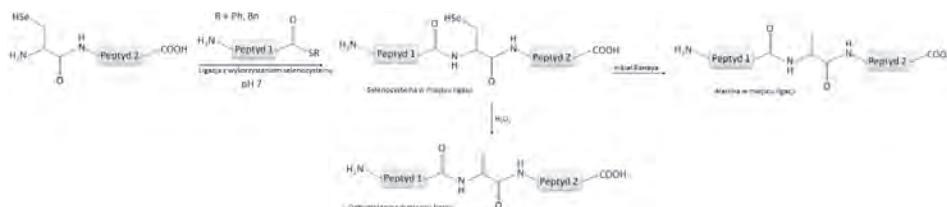
3. NCL PEPTYDÓW NIEZAWIERAJĄCYCH W SEKWENCJI RESZTY CYSTEINY

Reakcja NCL jest bardzo przydatną metodą pozwalającą na otrzymanie białek oraz polipeptydów zawierających natywne wiązanie peptydowe. Problem pojawi się, gdy w sekwencji otrzymywanego białka nie występuje reszta cysteiny, która musi być obecna na *N*-końcu C-peptydu by reakcja zaszła. Te ograniczenia można przewyściężyć poprzez zastosowanie specjalnie opracowanej strategii w syntezie metodą NCL, gdzie resztę cysteiny wprowadza się na miejsce innej reszty aminokwasowej, a po zakończeniu reakcji ligacji tak modyfikuje łańcuch boczny by otrzymać oczekiwany sekwencję. Kolejną metodą jest przeprowadzenie reakcji NCL z wykorzystaniem innego aminokwasu na *N*-końcu C-peptydu niż cysteina, a następnie

modyfikacja powstałego łańcucha bocznego lub zastosowanie grupy pomocniczej zawierającej w swojej budowie grupę tiolową [9].

3.1. NCL Z WYKORZYSTANIEM SELENOCYSTEINY

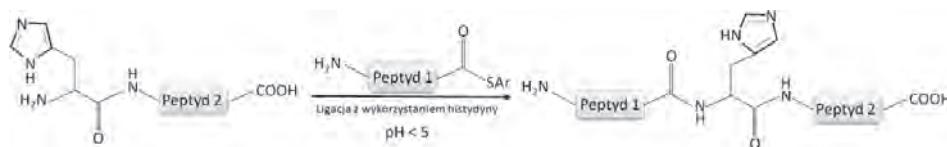
Jedną z metod syntezy białek niezawierających w swojej sekwencji cysteiny jest wprowadzenie w jej miejsce rzadkiego aminokwasu – selenocysteiny (Sec). Reakcja ligacji z grupą selenowodorową zachodzi szybko i z wysoką wydajnością, gdyż nukleofil selenowy jest bardziej kwasowy i nukleofilowy niż grupa tiolowa. Produkty NCL zawierające selenocysteinę można poddać dalszym modyfikacjom. Selenocysteinę można przekształcić w resztę alaniny przy zastosowaniu niklu Raneya, natomiast zastosowanie nadtlenku wodoru podczas oksydacyjnej eliminacji prowadzi do otrzymania dehydroalaniny w miejscu ligacji (Schemat 8) [17].



Schemat 8. Reakcja ligacji z wykorzystaniem Sec na N-końcu C-peptydu
Scheme 8. Ligation reaction with Sec residue at N-terminus of C-peptide

3.2. NCL Z WYKORZYSTANIEM HISTYDYNY

Następnym przykładem zastosowania aminokwasu innego niż cysteina jest użycie histydyny na N-końcu C-peptydu. Ugrupowanie imidazolowe pełni rolę nukleofila, przyspieszającego reakcję przeniesienia acylu na atom azotu grupy aminowej w warunkach kwasowych (Schemat 9) [18].



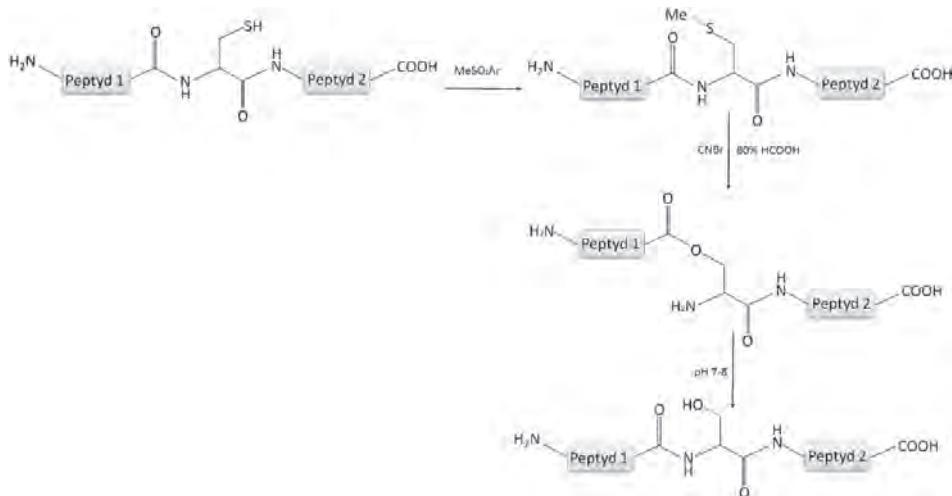
Schemat 9. Reakcja ligacji z wykorzystaniem histydyny na N-końcu C-peptydu
Scheme 9. Reaction of histidine ligation at N-terminus of C-peptide

3.3. CHEMICZNA MODYFIKACJA PRODUKTÓW NCL

Produkt otrzymany metodą ligacji można w różny sposób zmodyfikować chemicznie. W wyniku tych modyfikacji w miejscu cysteiny otrzymuje się reszty takich aminokwasów jak: alanina, seryna, glutamina, kwas glutaminowy czy lisyna, co prowadzi do otrzymania białka o zupełnie nowych właściwościach.

3.3.1. Alkilowanie i tioalkilowanie

Do modyfikacji reszty cysteiny wykorzystywane są właściwości nukleofilowe grupy tiolowej oraz jej podatność na alkilowanie i tioalkilowanie. Reszta cysteiny obecna w białkach może zostać przekształcona w procesie tioalkilowania metanotiosulfonianem metylu w analog metioniny. Można również otrzymać analog lisyny w reakcji z bromoetyloaminą [19] lub analog seryny w reakcji metylowania cysteiny 4-nitrobenzenosulfonianem metylu, a następnie wewnątrzcząsteczkowego przegrupowania z bromocyanem (CNBr) w kwasie mrówkowym, na skutek czego, w lekko zasadowym środowisku, następuje przeniesienie acylu $O\rightarrow N$ (Schemat 10) [20].



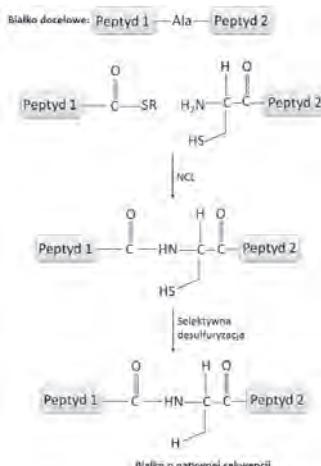
Schemat 10. Reakcja przekształcenia cysteiny w serynę w wyniku metylowania, a następnie wewnątrzcząsteczkowego przegrupowania z CNBr w kwasie mrówkowym

Scheme 10. The conversion of cysteine to serine residue due to the methylation and intramolecular rearrangement with CNBr in the formic acid

3.3.2. Katalityczna desulfuryzacja reszt cysteiny

Desulfuryzacja jest jedną z najpowszechniejszych i najprostszych metod modyfikacji produktu ligacji. Polipeptyd zawierający wolną grupę tiolową jest prze-

kształcany w natywny analog poprzez zastosowanie niklu Raneya lub borku niklu. Metoda ta umożliwia syntezę peptydów czy białek niezawierających w sekwencji reszty cysteiny. Reakcję NCL można przeprowadzić w miejscu gdzie w oczekiwanej sekwencji znajduje się reszta alaniny. Podczas syntezy C-peptydu w miejsce alaniny wprowadza się cysteinę, następnie przeprowadza reakcję NCL, po czym po desulfuryzacji otrzymuje się produkt zawierający w miejscu ligacji oczekiwanaą resztę alaniny (Schemat 11) [21].



Schemat 11. Syntesa białka metodą NCL wraz z desulfuryzacją reszty Cys prowadzącą do otrzymania Ala w miejscu ligacji

Scheme 11. Synthesis of a protein by NCL with desulfurization of Cys residue leading to Ala at the ligation site

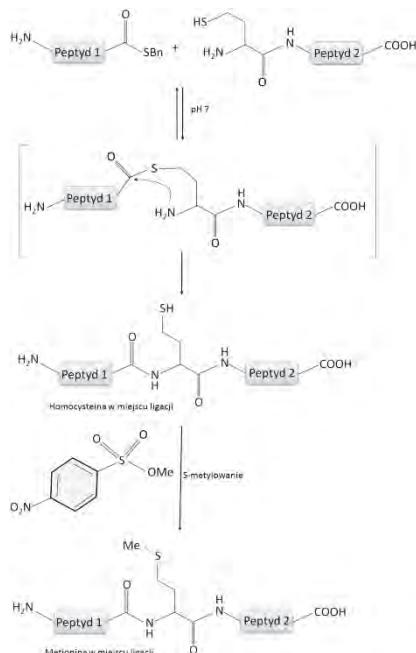
Główna wadą desulfuryzacji jest stosowany podczas reakcji katalizator niklowy, który często powoduje agregację i doprowadza do różnych reakcji ubocznych, takich jak epimeryzacja drugorzędowych alkoholi, a także desulfuryzacja tioesterów w resztach tiazolidyny (Thz) i metioniny. Opracowano metodę pokonującą te ograniczenia – zastosowano katalizator o budowie rodnikowej (VA-044). Katalizator ten jest rozpuszczalny w wodzie i ma bardzo niską temperaturę rozpadu [22].

Desulfuryzację można przeprowadzić również po reakcji NCL w miejscu, gdzie w sekwencji białka znajduje się fenyloalanina lub walina. W przypadku gdy celem jest otrzymanie białka zawierającego resztę waliny, w pozycję β lub γ tego aminokwasu wprowadza się tymczasowo grupę tiolową. Grupa tiolowa w pozycji γ będzie grupą pierwszorzędową, a więc bardziej reaktywną niż w pozycji β [23]. W przypadku fenyloalaniny grupę tiolową wprowadza się w pozycję β , co prowadzi do produktu ligacji zawierającego β -merkaptofenyloalaninę [24]. Po przeprowadzeniu obu opisanych reakcji ligacji należy wykonać desulfuryzację co prowadzi do otrzymania produktu połączonego natywnym wiązaniem peptydowym z waliną lub fenyloalaniną w miejscu ligacji.

3.3.3. Alkilowanie homocysteiny

Ligacja fragmentów peptydowych może zajść, gdy na *N*-końcu C-peptydu znajduje się homocysteina. Reakcja ta zachodzi analogicznie do NCL jednak w tym przypadku tworzy się 6-członowy stan przejściowy, a produkt końcowy połączony natywnym wiązaniem peptydowym w miejscu ligacji posiada homocysteinę (Schemat 12).

Otrzymany produkt z homocysteiną w miejscu ligacji można następnie zmodyfikować np. poddając go reakcji alkilowania *p*-nitrobenzenosulfonianem metylu co prowadzi do peptydu posiadającego resztę metioniny w miejscu ligacji [6, 25].

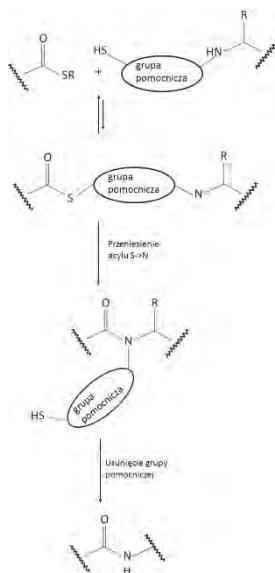


Schemat 12. Ligacja z wykorzystaniem homocysteiny na *N*-końcu C-peptydu
Scheme 12. Ligation using homocysteine at the *N*-terminus of the C-peptide

3.4. ZASTOSOWANIE GRUP POMOCNICZYCH

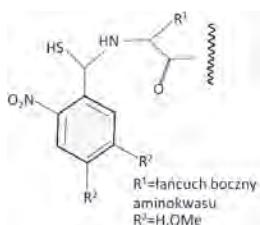
Ligacja peptydów niezawierających reszty cysteiny może zachodzić także w obecności grup pomocniczych zawierających grupę tiolową. Wprowadza się ją w pobliżu *N*-końca C-peptydu, a następnie przeprowadza reakcję ligacji. Po powstaniu produktu pośredniego połączonego wiązaniem tioestrowym dochodzi do wewnętrzcząsteczkowego przegrupowania jak w przypadku reakcji NCL, a następnie z nowo powstałego produktu usuwa się grupy pomocnicze (Schemat 13).

Praktyczne grupy pomocnicze powinny cechować się łatwością wprowadzania do fragmentu poddawanego syntezie, powinny łatwo i szybko ulegać ligacji w denaturującym buforze wodnym oraz łatwo ulegać usunięciu w łagodnych warunkach [6, 26].



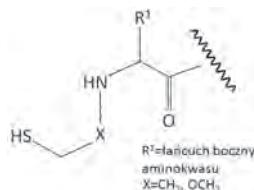
Schemat 13. Reakcja ligacji w obecności grup pomocniczych
Scheme 13. Ligation reaction in the presence of auxiliary groups

Grupy pomocnicze to związki organiczne wśród których wyróżnić możemy grupy fotolabilne (Schemat 14). Są one związkami N^{α} -1-arylo-2-merkaptopoetylowymi i zawierają w swojej budowie *o*-nitrobenzen, pozwalający na efektywne łączenie dwóch fragmentów peptydowych. Produkty ligacji uzyskuje się z wysoką wydajnością, po czym grupę pomocniczą usuwa się za pomocą światła. Głównym ograniczeniem metody jest możliwość otrzymywania peptydów zawierających w miejscu ligacji tylko nierozbudowane sterycznie aminokwasy, takie jak glicyna-alanina i glicyna-glicyna [7, 27].



Schemat 14. Grupa fotolabilna
Scheme 14. Photocleavable auxiliary group

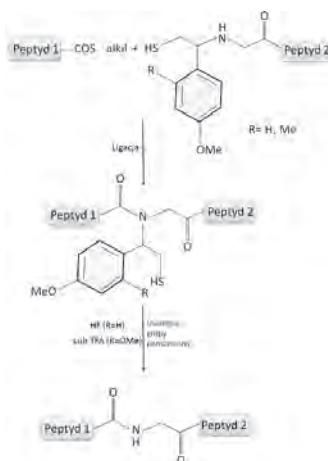
Kolejnym przykładem często wprowadzanych na N-koniec C-peptydu grup pomocniczych są grupy etanotiolowe i oksyeananotiolowe (Schemat 15.). Po wprowadzeniu grupy do fragmentu peptydowego zostaje przeprowadzona reakcja NCL, po czym wiązanie N-O znajdujące się w grupie oksyeananotiolowej może zostać zredukowane cynkiem w środowisku kwaśnym co prowadzi do otrzymania natywnego wiązania peptydowego w miejscu ligacji [28], natomiast grupa etanotiolowa nie zostaje usunięta z peptydu. Związki te wielokrotnie sprawdziły się w syntezie peptydów trudnych i problematycznych takich jak peptydy cykliczne.



Schemat 15. Grupa etanotiolowa/oksyananotiolowa

Scheme 15. Ethanethiol/oxyethanethiol auxiliary group

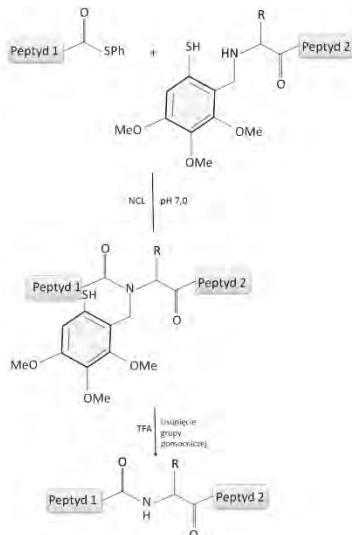
Do grup pomocniczych zaliczamy również grupy N^α-1-arylo-2-merkaptoetylowe, które pozwalają na łączenie fragmentów ze stosunkowo wysoką wydajnością, gdy w miejscu ligacji znajdują się nierozbudowane sterycznie aminokwasy takie jak alanina lub glicyna. Pozwalają na uzyskanie wysokiej wydajności syntezowanych peptydów, mogą to być zarówno glikopeptydy, jak i peptydy cykliczne. Grupę pomocniczą usuwa się w warunkach silnie kwasowych tj. pod działaniem TFA/TMSBr lub ciekłego fluorowodoru (Schemat 16) [6, 7].



Schemat 16. Reakcja ligacji z zastosowaniem grupy N^α-1-aryl-2-mercaptoprotylowej

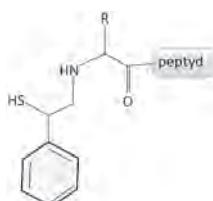
Scheme 16. Ligation reaction using N^α-1-aryl-2-mercaptopropyl group

Do grup pomocniczych należą również silnie nukleofilowe związki z grupy 4,5,6-trimetoksy-2-merkaptobenzyloaminowych (Tmb) (Schemat 17). Grupa 2-merkaptobenzylowa została tak zaprojektowana, by była labilna w środowisku kwasowym oraz by reakcja ligacji była bardziej efektywna, dzięki tworzącemu się trzeciorzędowemu amidowi [6].



Schemat 17. Ligacja z zastosowaniem grupy 4,5,6-trimetoksy-2-merkaptobenzyloaminowej (Tmb)
Scheme 17. Ligation using 4,5,6-trimethoxy-2-mercaptophenylamine (Tmb) group

Niedawno zaprojektowano również bardzo funkcjonalną grupę pomocniczą 2-merkapo-2-fenyloetylową (Schemat 18), która po dołączeniu drugiego fragmentu peptydowego jest selektywnie usuwana w łagodnie zasadowych warunkach i w obecności TCEP [29].



Schemat 18. Grupa 2-merkapo-2-fenyloetylowa
Scheme 18. 2-mercapto-2-phenethyl auxiliary group

Jako prekursory tioestru dla reakcji natywnej chemicznej ligacji zaprojektowano również pochodne amidu peptydowego Weinreb z grupą merkptoetylową podstawioną do atomu azotu. Udowodniono, że amidy te są doskonałymi elektrofilami, które ulegając wewnętrzcząsteczkowej acylowej substytucji nukleofilowej

tworzą tioestry dla NCL *in situ*. Reakcja ligacji takich tioestrów z peptydem zawierającym resztę cysteiny zachodzi szybko w normalnych warunkach NCL, prowadząc do utworzenia różnychwiązań peptydowych Xaa-Cys, w tym również trudnego do otrzymania innymi metodami wiązania Val-Cys [30].

PODSUMOWANIE

Synteza peptydów z wykorzystaniem natywnej chemicznej ligacji oraz kinetycznie kontrolowanej ligacji posiada wiele zalet, a wśród nich:

- reakcja chemicznej ligacji pozwala rozwiązać problemy związane z rozpuszczalnością i racemizacją, które występują w klasycznej syntezie w roztworze
- reakcja ta umożliwia efektywne sprzęganie nawet dużych łańcuchów peptydowych
- jest to reakcja wysoce chemoselektywna, gdyż w wyniku jej zajścia nie tworzą się zazwyczaj produkty uboczne
- jest to reakcja regioselektywna, gdyż pierwszy etap reakcji tj. wymiana tiol – tioester jest całkowicie odwracalny w obecności egzogennego tiolu jako katalizatora
- substratami do reakcji są nieosłonięte fragmenty peptydowe, które dość łatwo można otrzymać za pomocą syntezy na nośniku stałym
- zarówno substraty, jak i produkty można z łatwością oczyścić za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej na fazach odwróconych (RP-HPLC).

Wymienione zalety sprawiły, że reakcja ligacji cieszy się coraz większą popularnością. Naukowcy z całego świata coraz częściej wybierają metody NCL oraz KCL do syntezy białek oraz polipeptydów o trudnych sekwencjach, rozgałęzionych, często agregujących i problematycznych, na co wskazują liczne doniesienia literaturowe.

PIŚMIENIICTWO CYTOWANE

- [1] L. Raibaut, N. Ollivier, O. Melnyk, Chem. Soc. Rev., 2012, **41**, 7001.
- [2] J. Lee, Y. Kwon, B.N. Pentelute, D. Bang, Bioconjugate Chem., 2011, **22**, 1645.
- [3] R.B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 1963, **85**, 2149.
- [4] J.P. Tam, J. Xu, K.D. Eom, Biopolymers (Peptide Science), 2001, **60**, 194.
- [5] P.E. Dawson, T.W. Muir, I. Clark-Lewis, S.B.H. Kent, Science, 1994, **266**, 776.
- [6] H.P. Hemantha, N. Narendra, V.V. Sureshbabu, Tetrahedron, 2012, **68**, 9491.
- [7] C.P.R. Hackenberger, D. Schwarzer, Angew. Chem. Int. Ed., 2008, **47**, 10030.
- [8] S.B.H. Kent, Chem. Soc. Rev., 2009, **38**, 338.
- [9] F.I. Valiyaveetil, R. MacKinnon, T.W. Muir, J. Am. Chem. Soc., 2002, **124**, 9113.
- [10] E.C.B. Johnson, S.B.H. Kent, J. Am. Chem. Soc., 2006, **128**, 6640.
- [11] T.M. Hackeng, J.H. Griffin, P.E. Dawson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, **96**, 10068.
- [12] D. Bang, B.L. Pentelute, S.B.H. Kent, Angew. Chem. Int. Ed., 2006, **45**, 3985.

- [13] M. Villain, J. Vizzarone, K. Rose, *Chem. Biol.*, 2001, **8**, 673.
- [14] T. Durek, V.Y. Torbeev, S.B.H. Kent, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, **104**, 4846.
- [15] V.Y. Torbeev, S.B.H. Kent, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, **46**, 1667.
- [16] P.W.R. Harris, M.A. Brimble, *Biopolymers (Peptide Science)*, 2015, **104**, 116.
- [17] F.R. Naider, J.M. Becker, *Biopolymers*, 1997, **43**, 3.
- [18] L. Zhang, J.P. Tam, *Tetrahedron Lett.*, 1997, **38**, 3.
- [19] R. Yang, L. Qi, Y. Liu, Y. Ding, M.S.Y. Kwek, C.-F. Liu, *Tetrahedron Lett.*, 2013, **54**, 3777.
- [20] D. Macmillan, L. Arham, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 9530.
- [21] L.Z. Yan, P.E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 526.
- [22] Q. Wan, S.J. Danishefsky, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2007, **46**, 9248.
- [23] J. Chen, Q. Wan, Y. Yuan, J. Zhu, S.J. Danishefsky, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2008, **47**, 8521.
- [24] D. Crich, A. Banerjee, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 10064.
- [25] R.L. Heinrikson, *J. Biol. Chem.*, 1971, **246**, 4090.
- [26] D. Macmillan, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, **45**, 7668.
- [27] T. Kawakami, S. Aimoto, *Tetrahedron Lett.*, 2003, **44**, 6059.
- [28] L.E. Canne, S.J. Bark, S.B.H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 5891.
- [29] S.F. Loibl, Z. Harpaz, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2015, **54**, 15055.
- [30] C. Rao, C.-F. Liu, *Org. Biomol. Chem.*, 2017, **15**, 2491.

Praca wpłynęła do Redakcji 29 września 2017

METODY CHEMICZNEJ LIGACJI W SYNTESIE PEPTYDÓW I BIAŁEK – CZĘŚĆ II

CHEMICAL LIGATION METHODS IN THE SYNTHESIS OF PEPTIDES AND PROTEINS – PART II

Katarzyna Jędrzejewska*, Magdalena Kropidłowska,
Ewa Wieczerzak

*Katedra Chemii Biomedycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdańskiego
ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk
e-mail: katarzyna.jedrzejewska@phdstud.ug.edu.pl

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Synteza peptydów w roztworze
2. Synteza peptydów na nośniku stałym
3. Natywna chemiczna ligacja
3. Synteza peptydów metodą NCL z zastosowaniem strategii Fmoc
 - 4.1. Synteza z zastosowaniem żywicy 2-chlorotritylowej
 - 4.2. Synteza przy użyciu żywicy „safety-catch”
 - 4.3. Synteza z wykorzystaniem linkera BAL (ang. *backbone amide linker*)
 - 4.4. Synteza z zastosowaniem linkera SEA (SEA – grupa bis(2-sulfaniloetylo)aminowa)
 - 4.5. Synteza z wykorzystaniem arylowego linkera hydrazynowego
 - 4.6. Synteza z użyciem linkera Dbz (Dbz – kwas 3,4-diaminobenzoëowy)
 - 4.7. Synteza z użyciem linkera hydrazynowego
 - 4.8. Synteza łączona

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

Mgr Katarzyna Jędrzejewska, absolwentka Uniwersytetu Gdańskiego na Wydziale Chemii. W 2016 roku uzyskała tytuł magistra na kierunku Chemia, pracę dyplomową wykonywała w Katedrze Chemii Biomedycznej. Obecnie jest słuchaczką Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemii UG, gdzie wykonuje pracę doktorską pod kierunkiem dr hab. Elżbiety Jankowskiej. W swoich badaniach zajmuje się projektowaniem i syntezą peptydów i peptydomimetyków, których sekwencje oparte są na strukturach naturalnych białkowych aktywatorów proteasomu oraz ich badaniem pod kątem możliwości modulowania aktywności ludzkiego proteasomu h20S.

Mgr Magdalena Kropidłowska ukończyła studia magisterskie na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, broniąc w 2014 roku pracę pt. „Zastosowanie natywnej chemicznej ligacji do syntezy C-terminalnego fragmentu cystatyny C”. W tym samym roku rozpoczęła studia doktoranckie w Katedrze Chemii Biomedycznej Uniwersytetu Gdańskiego. Swoją pracę doktorską realizuje pod kierownictwem prof. dr hab. Franciszka Kasprzykowskiego. W ramach pracy doktorskiej zajmuje się poszukiwaniem modulatorów aktywności ludzkiego proteasomu h20S wśród związków pochodzenia naturalnego, takich jak polifenole i peptydy cykliczne izolowane z cyjanobakterii.

Dr Ewa Wieczerek, absolwentka Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Obecnie jest adiunktem w Katedrze Chemii Biomedycznej na Wydziale Chemii UG. W swojej pracy naukowej zajmuje się projektowaniem, syntezą i badaniami biologicznymi peptydów i peptydomimetyków o potencjalnym działaniu terapeutycznym (inhibitatory proteaz cysteinowych, inhibitatory/aktywatory proteasomu). Jej zainteresowania naukowe dotyczą również poszukiwania struktur wiodących umożliwiających projektowanie związków o potencjalnym działaniu terapeutycznym wśród substancji pochodzenia naturalnego.

ABSTRACT

Proteins are synthesized only by living organisms. Today, we are able to receive them by recombinant protein expression in bacterial cells. This technique is very useful and gives satisfactory amount of desirable material but it precludes the possibility of introduction of some chemical modifications that are often obligatory. For this reason, chemical synthesis of longer peptide chains is still important and is the object of scientists attention.

Over the last century, notion of peptide synthesis took a new meaning. Nowadays, we know a number of innovative methods and also automated devices which help us to make progress in this area. Nevertheless, the synthesis of longer, more complicated peptide chains and proteins still constitutes a problem. Native chemical ligation (NCL) has facilitated the synthesis of numerous complex peptide and protein targets. Expansion of ligation techniques has allowed the entry of peptides into the world of therapeutic drugs [1].

NCL reactions are carried out in aqueous solution and give good yields. Due to mild conditions, NCL overcomes racemic and solubility problems encountered in classical peptide synthesis using protected fragments. The challenge is to synthesize the C-terminal thioester-containing peptide necessary for the transesterification reaction, which is the first step of linking the peptide fragments [2].

In this review we discuss the evolution, advantages and potential applications of chemical ligation reactions. In the first part of this article we described the utility of native chemical ligation approach to non-cysteine containing peptides. This part details a number of important approaches to the synthesis of peptides bearing a C-terminal thioester. Contemporary applications of these techniques to the total chemical synthesis of proteins are also presented.

Keywords: native chemical ligation, peptide synthesis, thioester

Słowa kluczowe: natywna chemiczna ligacja, synteza peptydów, tioester

WYKAZ STOSOWANYCH SYMBOLI I OZNACZEŃ

Aa	– aminokwas
AAPH	– dichlorowodorek 2,2'-azobis(2-metylopropionoamidyny)
AcOH	– kwas octowy
BAL	– łącznik amidowy (ang. <i>Backbone Amide Linker</i>)
Boc	– <i>tert</i> -butoksykarbonyl
DBU	– 1,8-diazabicykloundek-7-en
Dbz	– kwas 3,4-diaminobenzoesowy
DCM	– dichlorometan
DIEA	– <i>N,N</i> -diizopropyloloammina
DMF	– <i>N,N</i> -dimetyloformamid
DNA	– kwas deoksyrybonukleinowy
Fmoc	– 9-fluorenylometoksykarbonyl
HATU	– heksafluorofosforan 2-(7-aza-1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametyluroniowy
HBTU	– heksafluorofosforan 2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametylouroniowy
GdnHCl	– chlorowodorek guanidyny
GSH	– glutation
GSSG	– disiarczan glutationu
MPA	– kwas 3-merkaptopropionowy
MPAA	– kwas 4-merkaptofenylooctowy
NBS	– <i>N</i> -bromosukcynamid
Nbz	– <i>N</i> -acylobenzimidazol
NCL	– natywna chemiczna ligacja (ang. <i>Native Chemical Ligation</i>)
PBS	– buforowana fosforanem sól fizjologiczna (ang. <i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PG	– grupa ochronna
SEA	– grupa bis(2-sulfanyloetylo)aminowa
SPPS	– synteza peptydów na nośniku stałym (ang. <i>Solid Phase Peptide Synthesis</i>)
TCEP	– tris(2-karboksyetylo)fosfina
TFA	– kwas trifluorooctowy
TFE	– trifluoroetanol
Thz	– tiazolidyna

WPROWADZENIE

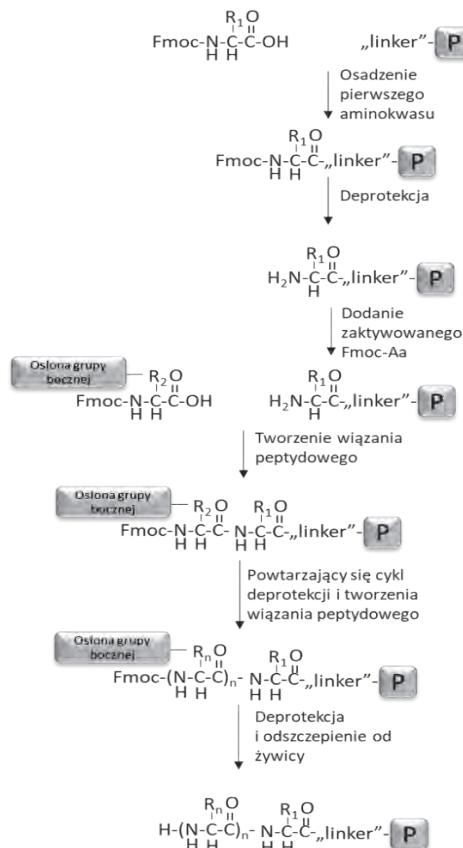
Białka syntetyzowane są jedynie przez organizmy żywe. Znaczne ilości białek można uzyskać wykorzystując techniki rekombinacji DNA, które prowadzą do ich zwiększonej ekspresji w komórkach bakteryjnych. W dzisiejszych czasach jesteśmy w stanie łatwo i skutecznie oczyścić wiele protein jednak istnieje szereg białek, których oczyszczenie w aktywnej i stabilnej formie może stanowić prawdziwe wyzwanie, np. białka integralne, niestabilne kompleksy białkowe lub też białka ulegające ekspresji w postaci nierożpuszczalnych agregatów, dlatego coraz częściej dąży się do pozyskania konkretnego białka przy zastosowaniu syntezy chemicznej.

W ciągu ostatniego stulecia pojęcie syntezy peptydów nabrało nowego znaczenia. W tej chwili dysponujemy szeregiem innowacyjnych metod, a także zautomatyzowanych sprzętów, które pomagają nam osiągać coraz większe postępy w tej dziedzinie. Niestety wciąż problemem są bardziej złożone łańcuchy peptydowe – białka, których produkcja, nawet dziś, często przekracza nasze możliwości. Technika jaką jest natywna chemiczna ligacja ułatwia jednak syntezę licznych kompleksowych peptydów i białek. Reakcje NCL prowadzone są w roztworze wodnym i często dają dobre wydajności otrzymanych produktów. Wyzwaniem jest synteza peptydu zawierającego na C-końcu tioester, niezbędnego do zajścia reakcji transtioesteryfikacji, która stanowi pierwszy etap łączenia fragmentów. W poniższym artykule przedstawione zostaną metody otrzymywania tioestrów peptydowych jako substratów do NCL przy użyciu strategii Fmoc oraz ich najnowsze zastosowania w pozyskiwaniu białek.

1. SYNTEZA PEPTYDÓW W ROZTWORZE

Początkowo synteza peptydów polegała na prowadzeniu wszystkich reakcji w roztworze. Ze względu na konieczność przeprowadzenia wielu reakcji tworzenia wiązania peptydowego, a także usuwania osłon grupy aminowej i/lub karboksylowej, metoda ta pochłania dużo czasu i pracy. Dodatkowym utrudnieniem jest konieczność wyodrębnienia i oczyszczenia peptydu po każdym etapie syntezy, a także scharakteryzowania produktów pośrednich. Ze względu na szereg etapów, synteza taka często wiąże się z małą wydajnością głównie poprzez straty podczas oczyszczania, a także powstawanie produktów ubocznych o właściwościach podobnych do produktu głównego. Z tego względu podejście takie najczęściej stosuje się do otrzymywania krótkich łańcuchów peptydowych [3].

2. SYNTEZA PEPTYDÓW NA NOŚNIKU STAŁYM

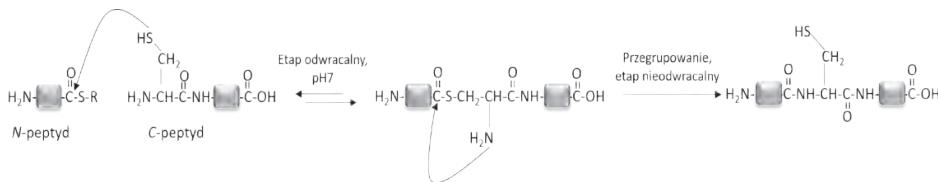


Rysunek 1. Schemat przedstawiający ideę syntezy peptydów na nośniku stałym
 Figure 1. Scheme representing the idea of peptide synthesis on solid phase

Pomimo, że synteza w roztworze przynosiła stosunkowo dobre rezultaty zaczęto szukać nowych, bardziej wydajnych metod, a także dążyć do udogodnienia i usprawnienia operacji na przykład poprzez automatyzację podstawowych procesów podczas syntezy. W II połowie XX wieku Bruce Merrifield zaproponowała innowacyjne podejście polegające na przyłączeniu C-końcowego aminokwasu do nierożpuszczalnego polimeru i stopniowym wydłużaniu łańcucha peptydowego. Sam nośnik natomiast przygotowuje się wcześniej poprzez reakcję z odpowiednim linkerem, który gwarantuje trwałe połączenie polimeru z aminokwasem oraz łatwe odszczepienie peptydu po zakończonej syntezie. Końcowym etapem jest odszczepienie peptydu od żywicy, najczęściej połączone ze zdjęciem osłon łańcuchów bocznych aminokwasów (Rys. 1) [4]. Nadmiar nieprzereagowanych substratów usuwa się poprzez przemywanie żywicy, co pozwala na stosowanie nadmiarów reagentów,

a syntezę można prowadzić na mniejszą skalę. Krokiem milowym w syntezie peptydów z wykorzystaniem stałego nośnika było stworzenie nowoczesnych syntezatorów mikrofalowych, które pozwalają znacznie skrócić czas syntezy, mniej angażują operatora, a także dają większe wydajności oraz czystsze produkty [2, 5].

3. NATYWNA CHEMICZNA LIGACJA



Rysunek 2. Dwuetapowy mechanizm natywnej chemicznej ligacji

Figure 2. Two-stage mechanism of native chemical ligation

Częste trudności w syntezie polegającej na kondensacji fragmentów peptydów, a także wysoki stopień racemizacji jej produktów, spowodowały iż zaczęto szukać nowych sposobów tworzenia długich łańcuchów peptydowych. Alternatywne podejście do tego problemu zaproponował Stephen Kent w 1994 roku. Wraz z współpracownikami opracował on metodę Natywnej Chemicznej Ligacji (ang. *Native Chemical Ligation*, NCL), polegającą na chemoselektywnym łączeniu dwóch niechronionych peptydów natywnym wiązaniem peptydowym. Aby reakcja NCL mogła zajść, konieczna jest obecność dwóch peptydów: *N*-peptydu z *C*-terminalnym tioestrem oraz *C*-peptydu z wolną resztą cysteiny na *N*-końcu [6].

Reakcja NCL zachodzi w dwóch etapach. W pierwszym etapie następuje atak nukleofilowej grupy tiolowej *N*-końcowej reszty cysteiny *C*-peptydu na *C*-końcową grupę tioestru *N*-peptydu, która pełni rolę elektrofilu. Tworzy się produkt pośredni zawierający wolną grupę aminową, a etap ten nazywa się odwracalną transtioestryfikacją. Następnie w wyniku wewnętrznzcząsteczkowego ataku wolnej pary elektronicznej atomu azotu grupy aminowej na karbonylowy atom węgla dochodzi do spontanicznego przegrupowania i przeniesienia acylu $S\rightarrow N$. W efekcie powstaje peptyd połączony natywnym wiązaniem peptydowym (Rys. 2) [7].

Reakcję NCL prowadzi się w środowisku wodnym, w neutralnym pH (pH 6,8–7) ze względu na niestabilność tioestrów w warunkach zasadowych. Jako dodatek do buforu stosuje się chlorowodorek guanidyny, który zapobiega agregacji fragmentów peptydowych.

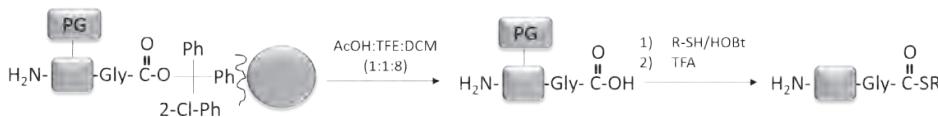
W związku z tym, że tioestry arylowe są bardziej reaktywne od tioestrów alkilowych, powszechnie jest stosowanie egzogennych katalizatorów (np. kwasu 4-merkaptofenylooctowego – MPAA) w celu zwiększenia szybkości ligacji [8, 9].

4. SYNTEZA PEPTYDÓW METODĄ NCL Z ZASTOSOWANIEM STRATEGII FMOC

Niezbędne do przeprowadzenia reakcji NCL peptydy zakończone C-terminalnym tioestrem można otrzymać stosując standardową syntezę na nośniku stałym z użyciem chemii Boc bądź dla większych polipeptydów – stosując bakteryjne systemy ekspresyjne. Niestety synteza tioestrów peptydowych z zastosowaniem strategii Boc wymaga użycia toksycznego fluorowodoru podczas zdejmowania peptydu z nośnika.

Alternatywą dla chemii Boc stanowi chemia Fmoc, której zastosowanie nie wymaga użycia szkodliwego HF. Niestety do usuwania osłony Fmoc podczas syntezy w większości przypadków stosuje się piperydynę, co jest dużym ograniczeniem ze względu na niestabilność tioestrów w obecności tak silnych nukleofili. Opisanych zostało jednak kilka strategii umożliwiających ominięcie tego problemu.

4.1. SYNTEZA Z WYKORZYSTANIEM ŻYWICY 2-CHLOROTRITYLOWEJ

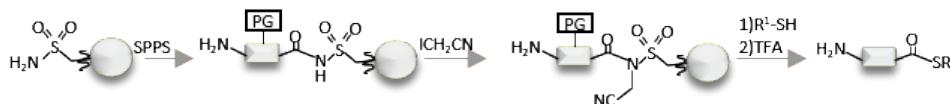


Rysunek 3. Schemat syntezy tioestru z zastosowaniem żywicy 2-chlorotrytylowej
Figure 3. Scheme of thioester synthesis using 2-chlorotriyl resin

Pierwsza próba utworzenia tioestru z zastosowaniem strategii Fmoc polegała na zsyntezowaniu odpowiednio chronionego peptydu na żywicy 2-chlorotrytylowej. Po zdjęciu gotowego peptydu z nośnika w łagodnych warunkach kwasowych, wolną, C-końcową grupę karboksylową częściowo chronionego peptydu poddawano tioestryfikacji odpowiednimi tiolami. Na koniec peptyd poddawano działaniu kwasu trifluorooctowego w celu zdjęcia wszystkich osłon. Słabą stroną opisanej metody była utrudniona rozpuszczalność chronionych peptydów, a także epimeryzacja C-końcowej reszty peptydu, innej niż glicyna (Rys. 3) [10].

Dzięki tej metodzie udało się między innymi otrzymać różne izoformy cholecy-stokininy (CCK) – hormonu odpowiedzialnego za uczucie głodu [11].

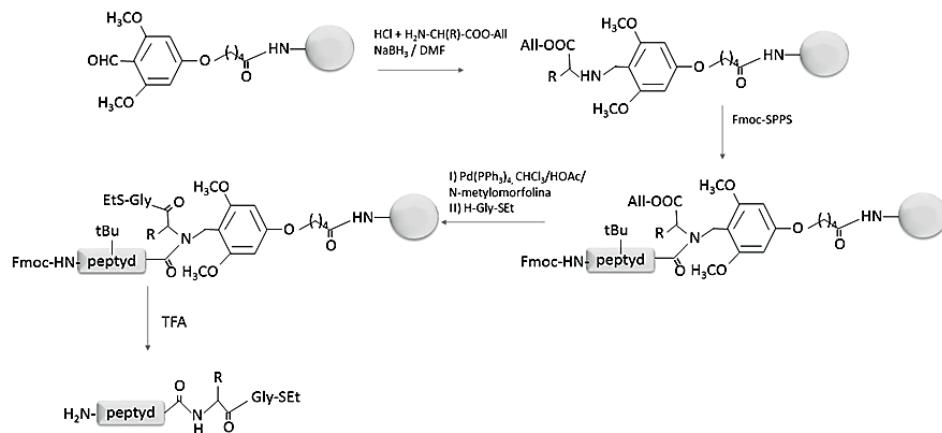
4.2. SYNTEZA PRZY UŻYCIU ŻYWICY „SAFETY-CATCH”



Rysunek 4. Synteza tioestru peptydu na żywicy typu „safety catch”
 Figure 4. Synthesis of peptide thioester on “safety catch” type resin

Peptyd syntezowany jest na żywicy z linkerem alkanosulfonamidowym, który jest stabilny w warunkach reakcji. Po zsyntezowaniu całego łańcucha do żywicy dodaje się tzw. czynnik aktywujący (jodoacetonitryl lub diazometan), w wyniku czego powstaje drugorzędowy sulfonamid. Sulfonamid poddaje się reakcji z nukleofilowym tiolem i przeprowadza całkowitą deprotekcję za pomocą TFA (Rys. 4) [12, 13].

4.3. SYNTEZA Z WYKORZYSTANIEM LINKERA BAL (ANG. BACKBONE AMIDE LINKER)



Rysunek 5. Synteza tioestru zawierającego C-końcową glicynę przy użyciu linkera BAL
 Figure 5. Synthesis of thioester containing C-terminal glycine using BAL linker

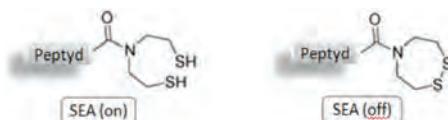
Użycie linkera BAL polega na zakotwiczeniu syntezowanego peptydu na nośniku stałym poprzez grupę α -aminową C-końcowego aminokwasu. C-końcowa grupa karboksylowa pozostaje wtedy chroniona, najczęściej poprzez ester allilowy. Po zsyntezowaniu całego peptydu usuwa się osłonę z grupy α -karboksylowej C-końcowego aminokwasu i przeprowadza tioestryfikację przy użyciu odpowiedniego tiolu [14].

Metoda ta stosowana jest w celu syntezy peptydów modyfikowanych na C-końcu (Rys. 5) [14] oraz peptydów cyklicznych [15].

Jednym z zastosowań linkera BAL była synteza cyklicznych 10-aminokwasowych peptydów opartych na sekwencji białka BPTI (ang. *Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor*) poprzez wewnętrzcząsteczkową NCL [15].

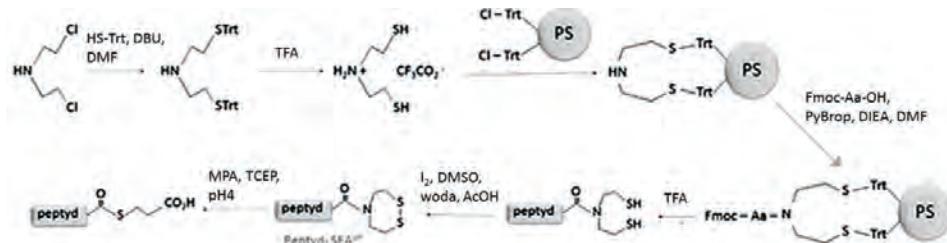
4.4. SYNTEZA Z ZASTOSOWANIEM LINKERA SEA (SEA – GRUPA BIS(2-SULFANYLOETYLO)AMINOWA)

Grupa bis(2-sulfanyloetylo)aminowa może występować w formie zredukowanej (SEAon) oraz utlenionej (SEAoff) (Rys. 6). Grupa SEAon posiada dwa ugrupowania tiolowe. W wodnym środowisku łatwo przekształca się w nietrwały tioester poprzez przeniesienie acylu. Taki tioester może być poddany reakcji z egzogennym tiolem, w wyniku czego jesteśmy w stanie otrzymać tioester na C-końcowej grupie karboksylowej peptydu.



Rysunek 6. Schemat grupy SEA w formie zredukowanej (SEAon) oraz utlenionej (SEAoff)
Figure 6. Scheme of reduced (SEAon) and oxidized (SEAoff) SEA group

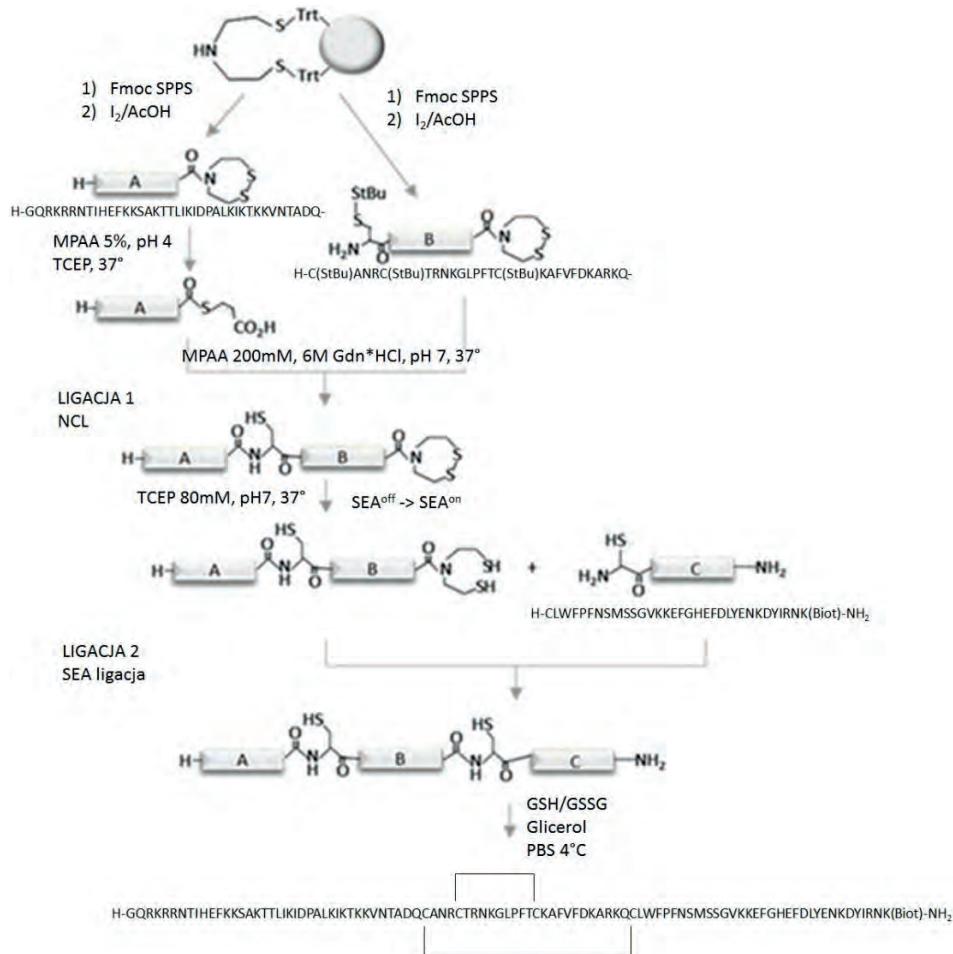
Synteza peptydu z grupą SEA na C-końcu rozpoczyna się od otrzymania stosownego linkera. Linker taki wytwarza się w reakcji chlorowodorku bis(2-chloroetyl)aminy z trifenylometanotioolem w obecności 1,8-diazabicykloundek-7-enu (DBU), a otrzymany produkt poddaje się deprotekcji pod wpływem TFA, po czym natychmiast nanosi na żywicę 2-chlorotritylową.



Rysunek 7. Schemat syntezy tioestru z zastosowaniem grupy SEA
Figure 7. Scheme of thioester synthesis using SEA group

Na tak przygotowanej żywicy z przyłączonym linkerem można osadzić pierwszy Fmoc-chroniony aminokwas. Kolejnym etapem jest elongacja łańcucha peptydowego. Po zakończonej syntezie peptyd jest odszczepiany od nośnika, w wyniku czego uzyskuje się SEA-peptyd, który po przekształceniu w tioester alkilowy może posłużyć za substrat do reakcji NCL (Rys. 7) [16].

Za pomocą SEA-ligacji otrzymano, między innymi, N-terminalną domenę ludzkiego czynnika wzrostu hepatocytów (ang. *Hepatocyte Growth Factor*, HGF) zbudowaną z 97 reszt aminokwasowych (Rys. 8) [17].



Rysunek 8. Schemat syntezy N-terminalnej domeny ludzkiego HGF
Figure 8. Scheme of N-terminal domain of human HGF synthesis

4.5. SYNTEZA Z WYKORZYSTANIEM ARYLOWEGO LINKERA HYDRAZYNOWEGO

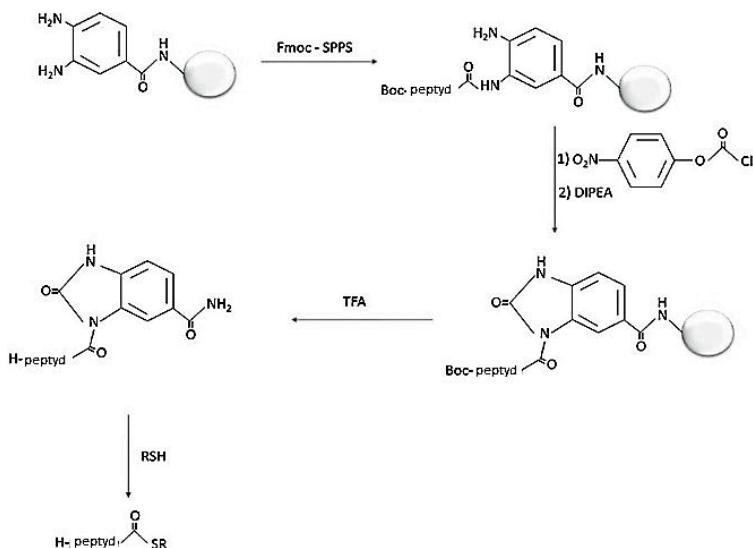
Synteza z zastosowaniem linkera arylowo-hydrazynowego przebiega na żywicy fenylohydrazynowej przy użyciu standardowej strategii Fmoc. Po zakończonej syntezie następuje utlenienie chronionej żywicy za pomocą *N*-bromosukcynimidu (NBS) w obecności pirydyny w dichlorometanie (DCM). Kolejno, reaktywny acylowy związek azowy zostaje odszczepiony od nośnika

za pomocą alkilowego thioestru aminokwasu. Na skutek tej operacji powstaje chroniony α -thioester peptydu, który poddawany jest reakcji z kwasem trifluoroocetowym w celu usunięcia grup ochronnych (Rys. 9) [18].

Linker arylowo-hydrazynowy jest również z powodzeniem używany w syntezie peptydów cyklicznych [19].

4.6. SYNTEZA Z UŻYCIEM LINKERA DBZ (LINKER DAWSONA)

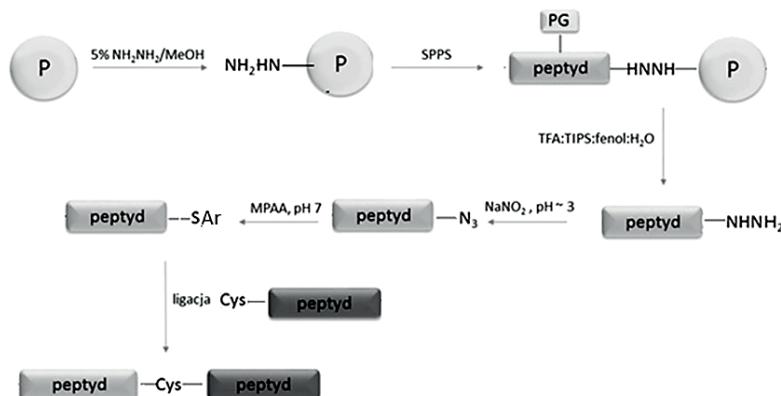
W pierwszym etapie kwas 3,4-diaminobenzoësowy przyłączany jest do żywicy. W tym celu przeprowadza się reakcję grupy karboksylowej Dbz z grupą aminową żywicy. Następnie na jednej z grup aminowych linkera prowadzona jest synteza łańcucha peptydowego przy zastosowaniu standardowej strategii Fmoc. Po przyłączeniu wszystkich aminokwasów następuje aktywacja linkera poprzez przekształcenie go do grupy zwanej Nbz (ang. *N*-acylobenzimidazol, Nbz) przy pomocy chloromrówczanu *p*-nitrofenylu. W końcowym etapie peptyd odlączany jest od żywicy wraz z Nbz i może być przekształcony w C-końcowy thioester gotowy do reakcji chemicznej ligacji (Rys. 10) [20, 21]. Przy użyciu linkera Dawsona udało się między innymi otrzymać fragment H3M histonu H3 składającego się z 135 reszt aminokwasowych. Jest to thioestrowa pochodna 44-aminokwasowego fragmentu, zawierająca reszty 47–90 histonu, z wprowadzoną grupą acetylową na reszcie lisyny w pozycji 56. Fragment ten wykorzystano następnie w reakcji natywnej chemicznej ligacji, w celu utworzeniu całej sekwencji wspomnianego białka [22].



Rysunek 10. Syntezę tioestru peptydu przy użyciu linkera Dawsona
Figure 10. Synthesis of peptide thioester using Dawson linker

4.7. SYNTEZA Z UŻYCIMI LINKERA HYDRAZYNOWEGO

Rolę związku, który można selektywnie przekształcić w tioester może pełnić również sama hydrazyna osadzona na nośniku stałym [23]. Procedura taka polega na początkowej hydrazynolizie żywicy 2-chlorotryptylowej, w wyniku czego powstaje stosowny linker. Na tak przygotowanym polimerze syntezuje się peptyd zaczynając od C-końca, przy zastosowaniu strategii Fmoc i odczynników sprzągających takich jak HATU czy HBTU. Po zakończonej syntezie i odszczepieniu peptydu od nośnika otrzymany peptydylohydrazyd utlenia się do azydku przy użyciu azotanu (III) sodu w pH 3. Kolejno azydek poddawany jest reakcji z egzogennym tiolem (najczęściej MPAA), co w rezultacie prowadzi do otrzymania tioestru, który może być wykorzystany w reakcji chemicznej ligacji (Rys. 11) [24].



Rysunek 11. Schemat syntezy tioestru peptydu przy użyciu hydrazyny w charakterze linkera
 Figure 11. Scheme of peptide thioester synthesis using hydrazine linker

Strategia opisana powyżej została między innymi wykorzystana podczas syntezy histonu H2A połączonej z metylowaniem glutaminy [24] oraz białka prionowego pochodzącego od myszy [25].

4.8. SYNTEZA ŁĄCZONA

Przy zastosowaniu linkerów hydrazynowego oraz Dbz udało się ułożyć strategię do otrzymania wielu interesujących białek, jak np. białka alergennego Pru p3 o pochodzeniu roślinnym. W celu uzyskania pełnej sekwencji białka, którego nie sposób otrzymać wykorzystując techniki rekombinacji DNA, podjęto się syntezy polegającej na połączeniu pięciu segmentów peptydowych przy użyciu ligacji chemicznej w połączeniu z desulfuryzacją i posłużeniu się dwoma wcześniejszymi wspomnianymi linkerami (Rys. 12) [26].

Naukowcy podjęli się również otrzymania obiecującego dla celów antynowotworowych białka Grb2 (ang. *Growth factor receptor bound protein 2*), które otrzy-

mali zarówno przy użyciu linkera Dawsona – w jednej reakcji NCL (łącząc dwa fragmenty peptydowe), a także stosując sekwencyjną reakcję natywnej chemicznej ligacji w kierunku od N- do C-końca łącząc 3 fragmenty przy wykorzystaniu linkera hydrazynowego. Obie techniki pozwoliły na otrzymanie wyżej wspomnianego białka jednakże ligacja sekwencyjna pozwoliła otrzymać je z lepszą wydajnością [27].

PODSUMOWANIE

W ciągu ostatnich lat, poprzez zaplanowaną syntezę zbieżną nieosłoniętych fragmentów peptydowych, reakcje chemicznej ligacji umożliwiły efektywną syntezę wielu natywnych białek, w tym białek modyfikowanych post-translacyjnie. W tym rozdziale podsumowane zostało znaczenie natywnej chemicznej ligacji w szeroko pojętej syntezie protein ze szczególnym naciskiem na metody tworzenia tioestrów peptydowych, które stanowią jeden z substratów niezbędnych do przeprowadzenia NCL. Omówione metody dotyczą przede wszystkim metodologii Fmoc, która w przeciwieństwie do chemii Boc umożliwia przeprowadzenie syntezy w łagodniejszych warunkach i wyeliminowana zostaje konieczność użycia niebezpiecznego ciekłego fluorowodoru. Ze względu na swoją wysoką chemoselektywność, NCL okazała się być wygodną metodą w otrzymywaniu peptydów zbudowanych z ponad stu reszt aminokwasowych. Zastosowanie nowoczesnych żywic bądź linkerów (takich jak linker hydrazynowy czy linker Dawsona) pozwoliło na syntezę szeregu białek i enzymów, co daje nadzieję na stosowanie tej techniki w przyszłości do tworzenia jeszcze bardziej złożonych struktur.

PIŚMIENIICTWO CYTOWANE

- [1] L.R. Malins, R.J. Payne, *Top. Curr. Chem.*, 2014, **362**, 27.
- [2] W. Kamysz, D. Grzywacz, *Laborant*, 2014, **9**, 12.
- [3] S. Doonan, *Białka i peptydy*, PWN, Warszawa 2008.
- [4] R.B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, **85**, 2149.
- [5] W. Kamysz, *Laborant*, 2011, **2**, 38.
- [6] S.B. Kent, P.E. Dawson, I. Clark-Lewis, T.W. Muir, *Science*, 1994, **266**, 776.
- [7] S. Chandrudu, P. Simerska, I. Toth, *Molecules*, 2013, **18**, 4373.
- [8] P.E. Dawson, M.J. Churchill, M. Reza Ghadiri, S.B. Kent, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 4325.
- [9] E.C. Johnson, S.B. Kent, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 6640.
- [10] S. Futaki, K. Sogawa, J. Maruyama, T. Asahara, M. Niwa, *Tetrahedron Lett.*, 1997, **38**, 6237.
- [11] K. Kitagawa, H. Adachi, Y. Sekigawa, T. Yagami, S. Futaki, Y.J. Gu, K. Inoue, *Tetrahedron*, 2004, **60**, 907.
- [12] C.P. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2008, **47**, 10030.
- [13] H.P. Hemantha, N. Narendra, V.V. Sureshbabu, *Tetrahedron*, 2012, **68**, 9491.
- [14] K.J. Jensen, J. Alsina, M.F. Songster, F. Vágner, F. Albericio, A. Barany, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 5441.

- [15] J. Tulla Puche, G. Barany, *J. Org. Chem.*, 2004, **69**, 4101.
- [16] N. Ollivier, J. Dheur, R. Mhidia, A. Blanpain, O. Melnyk, *Org. Lett.*, 2010, **12**, 5238.
- [17] L. Raibaut, J. Vicogne, B. Leclercq, H. Drobecq, R. Desmet, O. Melnyk, *Bioorg. Med. Chem.*, 2013, **21**, 3486.
- [18] Y.H. Woo, A.R. Mitchell, J.A. Camarero, *Int. J. Pept. Res. Therap.*, 2007, **13**, 181.
- [19] C. Rosenbaum, H. Waldmann, *Tetrahedron Lett.*, 2001, **42**, 5677.
- [20] J.B. Blanco-Canosa, P.E. Dawson, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, **47**, 1.
- [21] S.K. Mahto, C.J. Howard, J.C. Shimko, J.J. Ottesen, *ChemBioChem*, 2011, **12**, 2488.
- [22] J.C. Shimko, A.J. North, A.N. Bruns, M.G. Poirier, J.J. Ottesen, *J. Mol. Biol.*, 2011, **408**, 187.
- [23] J. Zheng, S. Tang, Y. Qi, Z. Wang, L. Liu, *Nat. Protoc.*, 2013, **8**, 2483.
- [24] Q. He, J. Li, Y. Qi, Z. Wang, Y. Huang, L. Liu, *Sci. China Chem.*, 2017, **60**, 621.
- [25] L. Shi, H. Chen, S. Zhang, T. Chu, Y. Zhao, Y. Chen, Y. Li, *J. Pept. Sci.*, 2017, **23**, 438.
- [26] S. Buhler, J.H. Akkerdaas, T.A. Pertinhez, R. Van Ree, A. Dossena, S. Sforza, T. Tedeschi, *J. Pept. Sci.*, 2017, **23**, 282.
- [27] T. Noguchi, H. Ishiba, K. Honda, Y. Kondoh, H. Osada , H. Ohno, N. Fujii, S. Oishi, *Bioconjugate Chem.*, 2017, **28**, 609.

Praca wpłynęła do Redakcji 29 września 2017

INFORMACJE



SPRAWOZDANIE Z 49. MIĘDZYNARODOWEJ OLIMPIADY CHEMICZNEJ W NAKHON PATHOM (TAJLANDIA) 6–15.07.2017 R.

49. Międzynarodowa Olimpiada Chemiczna (IChO) odbyła się w dniach 6–15 lipca 2017 r. w Nakhon Pathom, prowincji leżącej ok. 60 km od Bangkoku, na terenie Uniwersytetu Mahidol (*Mahidol University*).

W 49. IChO wzięło udział 296 zawodników z 76 krajów: Arabii Saudyjskiej, Argentyny, Armenii, Australii, Austrii, Azerbejdżanu, Białorusi, Belgii, Brazylii, Bułgarii, Chin, Chorwacji, Cypru, Czarnogóry, Czech, Danii, Estonii, Filipin, Finlandii, Francji, Gruzji, Grecji, Hiszpanii, Holandii, Indii, Indonezji, Iranu, Irlandii, Islandii, Izraela, Japonii, Kanady, Kazachstanu, Kirgistanu, Korei Płd., Kostaryki, Kuby, Litwy, Łotwy, Macedonii (FYROM), Malezji, Meksyku, Mołdawii, Mongolii, Niemiec, Norwegii, Nowej Zelandii, Pakistanu, Peru, Polski, Portugalii, Republiki Południowej Afryki, Rosji, Rumunii, Salwadoru, Serbii, Singapuru, Słowacji, Słowenii, Stanów Zjednoczonych Ameryki Północnej, Syrii, Szwajcarii, Szwecji, Tadżykistanu, Tajlandii, Tajwanu, Turcji, Turkmenistanu, Ukrainy, Urugwaju, Uzbekistanu, Wenezueli, Węgier, Wielkiej Brytanii, Wietnamu i Włoch. Obecni byli również obserwatorzy z 2 krajów: Luksemburga i Zjednoczonych Emiratów Arabskich, w związku z zamiarem uczestniczenia tych krajów w przyszłych olimpiadach międzynarodowych.

Gospodarzem tegorocznej IChO był *Mahidol University*, nazwany tak na cześć Jego Królewskiej Wysokości Księcia Mahidol Songkli. Współorganizatorami byli: Ministerstwo Edukacji, Instytut Promocji Nauczania Nauki i Technologii (*The Insti-*

tute for the Promotion of Teaching Science and Technology – IPST), Fundacja Promocji Olimpiad Akademickich, o pełnej nazwie: The Promotion of Academic Olympiad and Development of Science Education Foundation, działająca pod patronatem Jej Królewskiej Wysokości Księżeńczki Galyani Vadhana Krom Luang Naradhiwas Rajanagarindra (POSN) oraz Tajlandzkie Towarzystwo Chemiczne (CST), działające pod patronatem Prof. dr Jej Królewskiej Wysokości Księżeńczki Chulabhorn. Istotne znaczenie i szacunek dla instytucji monarchii w Tajlandii przejawili się także w udziale jednej z księżeńczek w uroczystej ceremonii rozpoczęcia 49. IChO.

Skład polskiej reprezentacji na IChO został wyłoniony przez Komitet Główny Olimpiady Chemicznej zgodnie z wieloletnią zasadą, iż zwycięzca krajowej Olimpiady ma zapewnione miejsce w reprezentacji, a pozostały trzej zawodnicy wyłaniani są na podstawie algorytmu obejmującego wyniki obecnej i poprzednich krajowych Olimpiad, z uwzględnieniem także ewentualnych osiągnięć na poprzednich IChO. Polską reprezentację na 49. IChO tworzyli następujący zawodnicy:

Jakub Narodowiec z III klasy XXI LO im. św. Stanisława Kostki w Lublinie (nauczyciele: mgr Katarzyna Cieplowska, mgr Anna Gęca), zwycięzca 63. i laureat 19. miejsca 62. Olimpiady Chemicznej,

Wojciech Jankowski z II klasy III LO im. Marynarki Wojennej RP w Gdyni (nauczyciel: mgr Justyna Raulin), laureat 5. miejsca 63. Olimpiady, 5. miejsca 62. Olimpiady i 15. miejsca 61. Olimpiady Chemicznej (jako uczeń III klasy gimnazjum),

Daniel Golec z II klasy V LO im. Augusta Witkowskiego w Krakowie (nauczyciele: dr Wojciech Przybylski, mgr Iwona Król), laureat 2. miejsca 63. Olimpiady i 28. miejsca 62. Olimpiady Chemicznej.

Michał Pychtin z III klasy XIII LO w Szczecinie (nauczyciele: dr inż. Małgorzata Kępińska-Żerko, dr n. techn. Robert Świerkowski), laureat 4. miejsca 63. Olimpiady, 9. miejsca 63. Olimpiady i 24. miejsca 61. Olimpiady Chemicznej.

Opiekunami naszej reprezentacji (i zarazem – członkami Międzynarodowego Jury) było dwoje pracowników naukowych Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego: **prof. dr. hab. Marek Orlik** (przewodniczący KG Olimpiady Chemicznej) i **prof. dr hab. Aleksandra Misicka-Kęsik** (wiceprzewodnicząca KG).

Jak co roku, dla wyjeżdżającej tym razem do Tajlandii grupy i jednego zawodnika rezerwowego – **Bartosza Kiszki** z III klasy LO im. Bohaterów Porytowego Wzgórza w Janowie Lubelskim, laureata 6. miejsca 63. Olimpiady i 25. miejsca 62. Olimpiady Chemicznej – Komitet Główny Olimpiady Chemicznej zorganizował w dniach: 5–9.06 oraz 19–23.06. br. obóz przygotowawczy, w trakcie którego przeprowadzone zostały wszystkie przysłane przez organizatorów IChO zadania teoretyczne i laboratoryjne oraz przedyskutowane wybrane zagadnienia dodatkowe. Zaangażowani w to byli pracownicy naukowi Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego i Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej, w większości – autorzy zadań na zawody Krajowej Olimpiady.

Zawody Międzynarodowej Olimpiady Chemicznej odbywały się w Nakhon Pathom, na terenie *Mahidol University* (część laboratoryjna – 9 lipca i część teoretyczna – 11 lipca). Jak zwykle, zawodnicy otrzymali teksty zadań przetłumaczone wcześniej przez opiekunów na swoje języki narodowe, po ustaleniu ostatecznych treści zadań przez Międzynarodowe Jury (opiekunów wszystkich ekip narodowych), obradujących w Bangkoku.

Organizatorzy tegorocznej IChO przewidzieli 3 zadania laboratoryjne i 11 zadań teoretycznych.

Tematyka zadań **laboratoryjnych** była następująca:

Zadanie lab. 1A (chemia analityczna/ogólna)	Wskaźniki pH i spektrofotometryczny pomiar pH
Zadanie lab. 1B (chemia analityczna/ogólna)	Wyznaczanie iloczynu rozpuszczalności jodanu(V) wapnia
Zadanie lab. 2 (chemia organiczna)	Synteza organiczna – tworzenie szkieletu węglowego

Tematyka zadań **teoretycznych** była następująca:

Zadanie 1 (chemia fizyczna i technologia)	Kataliza heterogeniczna – otrzymywanie propenu
Zadanie 2 (chemia fizyczna/kwantowa)	Kinetyczny efekt izotopowy i energia oscylacyjna
Zadanie 3 (chemia fizyczna)	Termodynamika reakcji chemicznych
Zadanie 4 (chemia fizyczna/ogólna)	Elektrochemia – ogniwka galwaniczne i dysocjacja elektrolityczna
Zadanie 5 (chemia nieorganiczna/analityczna)	Fosforany i krzemiany – oznaczanie zawartości w glebie
Zadanie 6 (chemia nieorganiczna)	Żelazo jako pierwiastek i jego związki chemiczne
Zadanie 7 (chemia organiczna)	Strukturalne układanki chemiczne – synteza organicznych kompleksów tytanu
Zadanie 8 (chemia nieorganiczna)	Struktura i właściwości adsorpcyjne powierzchni krzemionki
Zadanie 9 (chemia organiczna)	Łamigłówki chemiczne – identyfikacja związków organicznych
Zadanie 10 (chemia organiczna)	Totalna synteza alkaloidów
Zadanie 11 (chemia organiczna)	Synteza chiralnych związków organicznych

Uwagę zwraca nie tylko znaczna różnorodność tematyczna problemów, ale także wyjątkowo duża liczba zadań teoretycznych. W opinii zarówno wielu członków Międzynarodowego Jury, jak i naszych zawodników zadania te, choć czasochłonne, nie były jednak bardzo trudne. Paradoksalnie, nie jest to sytuacja korzystna dla najlepszych zawodników, ze względu na to, że zadania relatywnie łatwe są w dużym stopniu rozwiązywane także przez zawodników przeciętnych i w rezultacie kolejność na liście rankingowej, a więc i medalowe miejsca, mogą wynikać z popełnienia prostych błędów, o które nietrudno w warunkach wytężonej pracy, w stresujących okolicznościach.

Zgodnie z Regulaminem IChO, złote medale Międzynarodowe Jury przyznaje 8–12% zawodników, srebrne: 18–22% i brązowe: 28–32% zawodników. W tym roku przyznano stosunkowo dużo, bo 36 medali złotych, 65 srebrnych i 95 brązowych oraz 10 wyróżnień (dla osób pozostających tuż za pulą medalową).

Zwycięzcą tegorocznej IChO został reprezentant Rosji, Aleksander Zhigalin, a na następnych 4 pozycjach ulokowali się, kolejno, zawodnicy z Tajwanu, Iranu, Chin i USA.

Oto zestawienie wyników naszych zawodników (Fot. 1):

Michał Pychtin – srebrny medal (42. miejsce w klasyfikacji indywidualnej)

Daniel Golec – srebrny medal (65. miejsce w klasyfikacji indywidualnej)

Jakub Narodowiec – srebrny medal (100. miejsce w klasyfikacji indywidualnej)

Wojciech Jankowski – brązowy medal (119. miejsce w klasyfikacji indywidualnej).

Porównanie z wynikami z ostatnich kilku lat wskazuje, że nasze reprezentacje utrzymują stabilny, przyzwoity poziom wiedzy i umiejętności, choć oczywiście bardziej satysfakcjonujące byłyby jeszcze lepsze wyniki. Oznacza to, że mimo iż przyjęta przez Komitet Główny strategia przygotowywania zawodników na IChO, poprzez zapewnienie odpowiedniego poziomu zadań na Krajowej Olimpiadzie, wydaje się zasadniczo słuszna, wskazane jest wzmożenie starań dla podwyższania kwalifikacji przyszłych zawodników. Nie jest to łatwe ze względu na rosnącą z roku na rok konkurencję, spowodowaną stałym wzrostem liczby krajów uczestniczących w IChO, przy tradycyjnie wysokim poziomie zawodników z krajów azjatyckich, takich jak Chiny, Korea Płd., Tajwan, czy Singapur. Ponadto zawodnicy z innych krajów, ale także pochodzenia azjatyckiego, cechujący się zwykle wybitną pracowitością, tłumaczącą ich sukcesy, pojawiają się również w ekipach z innych kontynentów. Na przykład, od kilku lat drużyny z USA złożone są głównie z zawodników chińskiego, czasem także indyjskiego pochodzenia. Niezależność tego zjawiska od kraju pochodzenia tych zawodników jednoznacznie wskazuje na rolę rodzin, dbających o motywowanie dzieci do wytężonej pracy, co potwierdzają rozmowy z ich opiekunami. Oczywiście w przypadku wymienionych wyżej wysoko uprzemysłowionych krajów azjatyckich ogólną rolę odgrywa postawione na wysokim poziomie szkolnictwo. Należy jednak zauważyć, że system edukacyjny w krajach azjatyckich jest tyleż efektywny, co stresujący, szczególnie zapewne dla mniej uzdolnionej młodzieży i ich

rodziców. Sukcesy mają zatem pewną cenę i trzeba wyważyć pozytywne i negatywne skutki wysokich wymagań stawianych uczniom, w tym – olimpijczykom.

W nieoficjalnej klasyfikacji medalowej, która dobrze ilustruje powyżej zarysowane zjawiska, niewątpliwymi zwycięzcami zostali *ex aequo* Tajwan i USA, których zawodnicy zdobyli po cztery złote medale (przypomnijmy, że drużyna USA składała się całkowicie z zawodników chińskiego pochodzenia). Trzy złote medale i jeden srebrny przypadły zawodnikom z Iranu, Chin i Wietnamu. Dwa złote medale i dwa srebrne zdobyły reprezentacje Rosji, Korei Płd., Singapuru, Tajlandii i... Rumunii. Jeden złoty medal i trzy srebrne zdobyły drużynę Japonii, Indonezji, Indii. Jeden złoty, jeden srebrny i dwa brązowe zdobyła reprezentacja Litwy, Azerbejdżan mógł pochwalić się jednym złotym, jednym srebrnym i jednym brązowym medalem, a Bułgaria – jednym złotym i trzema brązowymi.

Oprócz zawodów organizatorzy IChO zapewnili zawodnikom liczne atrakcje i wycieczki. W ich trakcie nasi zawodnicy pozostawali pod troskliwą opieką studentki Chality Panyawuthichai, której należą się w tym miejscu specjalne podziękowania. Również członkowie Międzynarodowego Jury, w przerwach między zebraniami i pracą nad tłumaczeniem zadań, mieli możliwość poznać różne ciekawe miejsca, jak np. ruiny buddyjskich świątyń w miejscowości Ayutthaya, czy wspańskie kompleksy świątyń w samym Bangkoku (Fot. 2 i 3).

Więcej informacji o 49. IChO zawartych jest na stronie internetowej:

<https://icho2017.sc.mahidol.ac.th/>

Następna, jubileuszowa, 50. Międzynarodowa Olimpiada Chemiczna odbędzie się w 2018 roku w Bratysławie i Pradze. Słowacy i Czesi pragną w ten sposób nawiązać do pierwszej IChO, zorganizowanej w 1968 roku w Czechosłowacji, z udziałem tylko trzech państw: gospodarza, Węgier i Polski.



Fot. 1. Polscy medaliści 49. IChO. Od lewej: Wojciech Jankowski (brązowy medal), Jakub Narodowiec (srebrny medal), Chalita Panyawuthichai, Daniel Golec (srebrny medal), Michał Pychtin (srebrny medal)



Fot. 2. Ruiny świątyń buddyjskich w XIV-wiecznym mieście Ayutthaya



Fot. 3. Bangkok, Wat Thepthidaram – Świątynia Niebiańskiej Córki, z posagiem Buddy i wizerunkami jego uczennic



SPRAWOZDANIE KOMITETU GŁÓWNEGO OLIMPIADY CHEMICZNEJ Z 63. OLIMPIADY CHEMICZNEJ W ROKU SZKOLNYM 2016/2017

W roku szkolnym 2016/2017 odbyła się 63. Olimpiada Chemiczna. Przygotowania do niej, tak jak w latach poprzednich, rozpoczęły się po uroczystości zakończenia 62. Olimpiady w dniu 18 czerwca 2016 r. – rozdaniem folderów z zadaniami wstępnyimi 63. Olimpiady. Jednocześnie teksty zadań zostały zamieszczone na stronie internetowej Olimpiady Chemicznej, a następnie rozesłane do nauczycieli i szkół. Zainteresowani uczniowie mogli zatem rozpocząć indywidualne rozwiązywanie zadań etapu wstępnego jeszcze przed wakacjami i uzupełniać przy tym swoje wiadomości na podstawie zalecanej literatury, a także korzystając z konsultacji nauczycieli i starszych kolegów.

Zgodnie z terminarzem 63. Olimpiady, do 21 października 2016 r. wszyscy chętni do udziału w zawodach musieli zarejestrować się na stronie internetowej Olimpiady w Internecie i zarazem przekazać swojemu nauczycielowi rozwiązania zadań z części A (zadania obowiązkowe). Wstępnie zarejestrowało się 1219 uczniów z 339 szkół. Nauczyciele po zweryfikowaniu rozwiązań wysłali je do Komitetów Okręgowych. Na podstawie otrzymanych udokumentowanych rozwiązań zadań etapu wstępnego ostatecznie zostało zakwalifikowanych do etapu pierwszego 1040 uczniów z 256 szkół (Tab. 1).

Etap I odbył się 26 listopada 2016 r. w szesnastu większych miastach Polski, pod nadzorem komisji powołanych przez Komitety Okręgowe. Zawodnicy rozwiązywali 5 zadań teoretycznych. Na podstawie uzyskanych wyników Komitet Główny zakwalifikował do II etapu 256 zawodników ze 103 szkół (tabela 1).

Etap II odbył się w dniach 27 i 28 stycznia 2017 r. w 13 miejscowościach, będących siedzibami Komitetów Okręgowych. Uczniowie mieli do rozwiązania 5 zadań teoretycznych oraz jedno zadanie laboratoryjne. Na podstawie wyników tego etapu do III etapu (finału) Komitet Główny zakwalifikował 94 uczniów z 51 szkół.

Etap III odbył się w dniach 31 marca i 1 kwietnia 2017 r. w Warszawie. Zawody laboratoryjne, na które składało się rozwiązywanie 2 zadań (z jakościowej i ilościowej analizy chemicznej), przeprowadzone zostały w pracowniach Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej, a zawody teoretyczne, wymagające rozwiązywania 5 zadań – w Auli Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego.

Tabela 2. Lista 34 Laureatów i 3 Wyróżnionych w 63. Olimpiadzie Chemicznej rok szkolny 2016/2017

Lp	Nazwisko	Imię (imiona)	Klasa	Nazwa szkoły	Miejscowość	Opiekunowie naukowi
1	Narodowiec	Jakub	3	XXI LO im. św. Stanisława Kostki	Lublin	mgr Katarzyna Cieplowska, mgr Anna Gęca
2	Golec	Daniel Maksymilian	2	V LO im. Augusta Witkowskiego	Kraków	dr Wojciech Przybylski, mgr Iwona Król
3	Szlasa	Wojciech Kacper	3	III LO im. Adama Mickiewicza	Wrocław	mgr Teresa Piikuta-Byrka, mgr Tomasz Słoka
4	Pychtin	Michał	3	XIII LO	Szczecin	dr inż. Małgorzata Kępińska-Żenko, dr n. techn. Robert Świeirkowski
5	Jankowski	Wojciech Jan	2	III LO im. Marynarzy Wojennej RP	Gdynia	mgr Justyna Raulin
6	Kiszka	Bartosz	3	LO im. Bohaterów Porytowego Wzgórza	Janów Lubelski	mgr Piotr Jakubiec
7	Kępczyński	Maciej	3	V LO im. Ks. Józefa Poniatowskiego	Warszawa	mgr Krzysztof Kuśmierczyk, dr hab. Michał Fedoryński prof. PW
8	Łukasik	Maciej Bartłomiej	2	V LO im. Ks. Józefa Poniatowskiego	Warszawa	mgr Krzysztof Kuśmierczyk
9	Waszyński	Filip	2	II LO im. Generalowej Zamoyskiej i Heleny Modrzejewskiej	Poznań	dr Damian Mikulski
10	Dzieciol	Bartosz Marcin	3	XIII LO	Szczecin	dr Małgorzata Żerko dr Robert Świeirkowski
11	Łuszczynski	Krystof	2	I LO im. Adama Mickiewicza	Białystok	dr Izabela Dobrzyńska
12	Michalski	Jarosław Piotr	3	Publiczne Liceum Sióstr Urszulanek UR	Rybnik	ngr Dominika Zdziąłek, dr Marietta Białoń
13	Dąbrowski	Piotr Mateusz	2	II LO im. Mieszka I	Szczecin	mgr Teresa Kologrecka-Bajek
14	Ragus	Julia	2	V LO im. Ks. Józefa Poniatowskiego	Warszawa	mgr Krzysztof Kuśmierczyk, Wojciech Łyczek
15	Mozdżen	Piotr	3	I LO im. Mikołaja Kopernika	Łódź	mgr Maciej Sienkiewicz, dr Justyna Staluszka

Tabela 2. Ciąg dalszy

Ip	Nazwisko	Imię (imiona)	Klasa	Nazwa szkoły	Miejscowość	Opiekunowie naukowi
16	Wąsowicz	Marcin Krzysztof	2	V LO im. Augusta Witkowskiego	Kraków	Dr. Wojciech Przybylski
17	Głowacki	Maksymilian Henryk	3	XIV LO im. Stanisława Staszica	Warszawa	mgr inż. Agnieszka Kuś, dr hab. inż. Michał Fedoryński prof. PW
18	Goliński	Marcin Dominik	2	V LO im. Andrzeja Struga	Gliwice	mgr Elżbieta Szotko
19	Gulgowski	Dominik	2	III LO im. Marynarzy Wojennej RP	Gdynia	mgr Justyna Raulin
20	Prus	Antoni Artur	2	V LO im. Augusta Witkowskiego	Kraków	dr. Wojciech Przybylski
21	Flis	Paweł	3	I LO im. Jana Zamoyskiego	Zamość	prof. oświaty mgr Włodzimierz Kuśmierczuk
22	Królicka	Anna Lena	3	III LO im. Marii Skłodowskiej-Curie	Opole	mgr Krystyna Chudzia
23	Gozdziecki	Aleksander Stefan	2	ZS UMK Gimnazjum i Liceum Akademickie	Toruń	mgr Małgorzata Augustynowicz-Kłyszecka, dr Andrzej Wolan
24	Caban	Stanisław Paweł	2	I LO im. Mikołaja Kopernika	Łódź	dr Justyna Staluszka, mgr Maciej Sienkiewicz
25	Popławski	Mikołaj Wawrzyniec	1	II LO im. prof. K. Morawskiego	Przemysł	mgr inż. Marian Sztaba
26	Tyrna	Paweł Franciszek	2	LO Towarzystwa Szkolnego im. Mikołaja Reja	Bielsko-Biała	mgr Alicja Klus, mgr Franciszek Rothkegel
27	Pawlak	Jakub Paweł	3	I LO im. Mikołaja Kopernika	Łódź	dr Justyna Staluszka, mgr Maciej Sienkiewicz
28	Sterlński	Ignacy Michał	2	II LO im. Stefana Batorego	Warszawa	mgr Krystyna Zapętłowska, dr Przemysław Zająca
29	Juszczyszyn	Albert Krzysztof	3	ZS UMK Gimnazjum i Liceum Akademickie	Toruń	Mgr Małgorzata Augustynowicz-Kłyszecka, dr Andrzej Wolan
30	Zambrzyci	Bartosz	3	I LO im. Adama Mickiewicza	Białystok	dr Izabela Dobryńska
31	Mucha	Maksymilian Maria	1	II LO im. Stefana Batorego	Warszawa	mgr Krystyna Zapętłowska
32	Tymura	Katarzyna	2	I LO im. Jana Zamoyskiego	Zamość	mgr Włodzimierz Kuśmierczuk

Tabela 2. Ciąg dalszy

lp	Nazwisko	Imię (imiona)	Klasa	Nazwa szkoły	Miejscowość	Opiekunowie naukowi
33	Kotańska	Anna Aleksandra	2	XIV LO im. Stanisława Staszica	Warszawa	mgr Agnieszka Kuś
34	Pyllos	Jakub Jan	3	XIV LO im. Stanisława Staszica	Warszawa	mgr inż. Agnieszka Kuś
35	Tokarz	Mateusz	2	ILO im. Leona Kruczkowskiego	Tychy	Anna Oprychal
36	Plachta	Iga	3	I Spodeczne LO im. Unii Europejskiej	Zamość	prof. oświaty mgr Włodzimierz Kuśmierczuk
37	Wyka	Michał Piotr	3	V LO im. Augusta Witkowskiego	Kraków	dr Wojciech Przybylski, mgr Iwona Król

Po sprawdzeniu prac Komitet Główny wyłonił 34 laureatów i 3 wyróżnionych (Tab. 2) oraz 4 reprezentantów Polski na Olimpiadę Międzynarodową (IChO), która w tym roku odbędzie się w Bangkoku (Tajlandia), w dniach od 6 do 15 lipca. Do udziału w niej zostali zakwalifikowani: **Jakub Narodowiec**, uczeń III klasy XXI LO w Lublinie, **Wojciech Jankowski**, uczeń II klasy III LO im. Marynarki Wojennej RP w Gdyni, **Michał Pychtin**, uczeń III klasy XIII LO w Szczecinie i **Daniel Golec**, uczeń II klasy V LO im. Augusta Witkowskiego w Krakowie. Zawodnikiem rezerwowym jest Bartosz Kiszka uczeń III klasy LO im. Porytowego Wzgórza w Janowie Lubelskim. Wszystkie zadania (wraz z przykładowymi rozwiązaniami) z poszczególnych etapów oraz wyniki finału są zamieszczone na stronie internetowej Olimpiady: www.chem.uw.edu.pl

Tradycyjnie laureaci i wyróżnieni oraz ich nauczyciele i dyrektorzy szkół zostali zaproszeni na uroczyste zakończenie Olimpiady, które tym razem miało miejsce 10 czerwca 2017 r. w Auli Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Uroczystość tę zaszczycili swoją obecnością znakomici goście, którzy wspierali szkoły i Komitet Główny zarówno w pracy, jak i finansowo w nagradzaniu laureatów. Byli nimi przedstawiciele:

- Ministerstwa Edukacji Narodowej, reprezentowanego przez Pana Macieja Kopcia, podsekretarza stanu w MEN;
- Instytutów Polskiej Akademii Nauk, reprezentowanych przez: prof. dr hab. Witolda Danikiewicza, zastępcę Dyrektora Instytutu Chemicznej PAN, srebrnego medalistę V IChO oraz dr. hab. Jacka Gregorowicza, prof. Instytutu Chemicznej PAN i jego wicedyrektora;
- Polskiego Towarzystwa Chemicznego – w osobie wiceprzewodniczącej PTChem, dr hab. inż. Izabeli Madury z Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej oraz prof. dr hab. inż. Adam Pronia, przewodniczącego Oddziału Warszawskiego Towarzystwa;
- Wydziału Chemicznego Uniwersytetu Warszawskiego, reprezentowanego przez Dziekana, dr hab. Andrzeja Kudelskiego, prof. UW, prof. dr hab. Pawła Kuleszę, wieloletniego Dziekana, członka korespondenta PAN i wiceprzewodniczącego Komitetu Chemicznego PAN, Prodziekana ds. studenckich, dr. hab. Beatę Krasnodębską-Ostręgę, prof. dr hab. Zbigniewa Stojka, wieloletniego Prodziekana ds. finansowych Wydziału Chemicznego UW oraz prof. dr hab. Marka T. Krygowskiego, laureata pierwszych dwóch krajowych olimpiad chemicznych, byłego wieloletniego Prezesa PTChem;
- Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej, w osobach: Dziekana, prof. dr hab. inż. Władysława Wieczorka, członka Komitetu Chemicznego PAN oraz prof. dr hab. inż. Macieja Jarosza, który także reprezentował prof. dr hab. Bogusława Buszewskiego Przewodniczącego Komitetu Chemicznej Politechniki Warszawskiej PAN;

- Wydziału Chemiczno-Chemicznego Uniwersytetu Wrocławskiego, w osobie reprezentującego Dziekana prof. dr. hab. Kazimierza Orzechowskiego, przewodniczącego Komitetu Okręgowego Olimpiady Chemicznej we Wrocławiu;
- Wydziału Chemiczno-Chemicznego Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu – w osobie mgr Beaty Hildebrandt, Sekretarza Komitetu Okręgowego Olimpiady Chemicznej w Poznaniu, reprezentującej Dziekana Wydziału Chemiczno-Chemicznego UAM, prof. dr hab. Henryka Koroniaka;
- Wydziału Biologiczno-Chemicznego Uniwersytetu w Białymostku – w osobie prof. dr hab. Ryszarda Łażnego;
- Wydziału Chemiczno-Chemicznego Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, w osobie prof. dr hab. Doroty Kołodyńskiej – prodziekana ds. dydaktycznych UMCS, dr hab. Ryszarda M. Janiuka dotychczasowego sekretarza Komitetu Okręgowego w Lublinie i nowej na tym stnie osoby – dr Marioli Iwan.
- Wydziału Chemiczno-Chemicznego Uniwersytetu Łódzkiego, w osobie prof. dr hab. Roberta Zakrzewskiego, Prodziekana ds. studenckich i jakości kształcenia.

Zaproszenie przyjęli także: prof. dr hab. Piotr Kossacki, Przewodniczący Komitetu Głównego Olimpiady Fizycznej, mgr Joanna Toczko, Kierownik Pracowni Matur z Okręgowej Komisji Egzaminacyjnej w Warszawie, dr Paweł Stępniaak, Przewodniczący Fundacji Docemus-Discimus im. Profesora Janusza Jurczaka, dr Krzysztof Papużynski laureat pierwszej Olimpiady Chemicznej a także przedstawicielka sponsora PKN ORLEN, pani Natalia Strzemieczna.

Członkowie Prezydium Komitetu Głównego Olimpiady Chemicznej – Przewodniczący, prof. dr hab. Marek Orlik, Wiceprzewodnicząca – prof. dr hab. Aleksandra Misicka-Kęsik, Sekretarz Naukowy – dr hab. Ewa Poboży oraz Kierownik Organizacyjny – mgr Wanda Szelągowska wręczyły laureatom oraz ich nauczycielom (Tab. 2) dyplomy i nagrody od Komitetu Głównego. Zwycięzca otrzymał laptop MacBook, a pozostali zawodnicy, odpowiednio – smartfony iPhone GS, tablety iPad Air, tablety iPad Mini, aparaty typu Polaroid, czytniki Kindle Paperwhite, odtwarzacze iPod touch oraz zewnętrzne dyski twardy. Laureaci klas drugich, którzy będą mogli uczestniczyć jeszcze w 64. Olimpiadzie Chemicznej otrzymali także książki Wydawnictwa Naukowego PWN.

Tradycyjnie przyznane zostały też nagrody specjalne (kamery Sony), które otrzymali: zwycięzca Jakub Narodowiec – od Dziekana Wydziału Chemiczno-Chemicznego UW, Daniel Golec – od Dziekana Wydziału Chemiczno-Chemicznego PW oraz Wojciech Szląsa – od Przewodniczącego Komitetu Głównego Olimpiady Chemicznej.

Nagrody za najlepiej rozwiązane zadania z chemii organicznej, od Dyrektora Instytutu Chemii Organicznej PAN, prof. dr hab. Sławomira Jarosza, a wręczone przez prof. dr hab. Witolda Danikiewicza, otrzymali: Jakub Narodowiec, Daniel Golec i Marcin Goławski.

Nagrody za najlepiej rozwiązane zadania z chemii fizycznej, ufundowane przez Dyrektora Instytutu Chemii Fizycznej PAN, prof. dr. hab. Marcina Opałę, a wrę-

czone przez prof. dr hab. Jacka Gregorowicza otrzymali: Jakub Narodowiec i Antoni Prus.

Nagrody za najlepiej rozwiążane zadania laboratoryjne, ufundowane przez Przewodniczącego Komitetu Chemii Analitycznej PAN, prof. dr hab. Bogusława Buszewskiego, a wręczone przez prof. dr hab. Macieja Jarosza otrzymali: Piotr Dąbrowski, Daniel Golec i Michał Wyka.

Prezes Fundacji Docemus-Discimus im. Prof. Janusza Jurczaka, dr Paweł Stępiński wręczył nagrodę specjalną najlepszej zawodniczce – Julii Ragus.

Najmłodsi laureaci – uczniowie klas pierwszych liceum: Mikołaj Wawrzyniec Popławski i Maksymilian Maria Mucha, otrzymali aparaty Polaroid ufundowane przez Dziekana Wydziału Chemii UAM.

Dzięki hojności sponsorów także opiekunowie laureatów otrzymali pamiątkowe prezenty: przenośne ładowarki (*powerbanki*), korkowe podstawki pod kubki i zestawy próbnych arkuszy maturalnych, wydanych przez Oficynę Edukacyjną Krzysztof Pazdro.

Zgodnie z miłą tradycją, członkom polskiej reprezentacji na Olimpiadę Miedzynarodową w Tajlandii, polską flagę wraz z życzeniami powodzenia na zawodach przekazali Dominika Zajkowska i Mikołaj Świerczyński – srebrni medaliści z ubiegłorocznego 48. IChO w Tbilisi.

Wszyscy finaliści (uczestnicy III etapu) i laureaci otrzymali wystawione przez Komitet Główny zaświadczenia, zwalniające ich z notą najwyższą z egzaminu maturalnego z chemii oraz będące podstawą do skorzystania z odpowiednich uprawnień przy przyjmowaniu na I rok studiów wyższych.

Po zakończeniu części oficjalnej wszyscy obecni zostali zaproszeni do Starej Biblioteki Wydziału Chemii UW na poczęstunek.

Kalendarium następnej, 63. Olimpiady Chemicznej przedstawia się następująco:

- 22 października 2017 r. – zakończenie etapu wstępnego i rejestracji internetowej zawodników
- 28 października 2017 r. – ostateczny termin przesłania prac etapu wstępnego do Komitetów Okręgowych.
- 25 listopada 2017 r. (sobota): godz. 11⁰⁰–16⁰⁰: zawody I etapu w miejscach wyznaczonych przez Komitety Okręgowe.
- 26 stycznia 2018 r. (piątek) godz. 12⁰⁰–17⁰⁰: zawody części teoretycznej II etapu
- 27 stycznia 2018 r. (sobota) godz. 9⁰⁰–14⁰⁰: zawody części laboratoryjnej II etapu
- 23 marca 2018 r. (piątek) godz. 14⁰⁰–19⁰⁰: zawody części laboratoryjnej III etapu
- 24 marca 2018 r. (sobota) godz. 8³⁰–13³⁰: zawody części teoretycznej III etapu.

SPONSORZY 63. OLIMPIADY CHEMICZNEJ**SPONSOR GŁÓWNY****POZOSTALI SPONSORZY**

**ZAWODY ODBYŁY SIĘ DZIĘKI ŻYCZLIWOŚCI WŁADZ
I PRACOWNIKÓW 16 UCZELNI:**



Wydział Chemii
Uniwersytetu Jagiellońskiego



Instytut Chemiczny
Uniwersytetu Śląskiego



Wydział
Technologii i Inżynierii
Chemicznej



Uniwersytet
Wrocławski



UMCS

WYDZIAŁ CHEMII





Politechnika Wrocławska



**SPONSORZY, KTÓRZY PRZYCZYNILI SIĘ DO WZBOGACENIA NAGRÓD
63. OLIMPIADY CHEMICZNEJ:**

1. Dyrektor Instytutu Chemii Fizycznej PAN
2. Dyrektor Instytutu Chemii Organicznej PAN
3. Przewodniczący Komitetu Chemii Analitycznej PAN
4. Dziekan Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego
5. Dziekan Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej
6. Dziekan Wydziału Chemii Uniwersytetu Adama Mickiewicza
7. Prezes Fundacji Docemus-Discimus im. prof. Janusza Jurczaka

INFORMACJE REDAKCJI „WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH”

CENY PRENUMERATY NA ROK 2018

Redakcja miesięcznika PTChem „Wiadomości Chemiczne” zawiadamia, że wysokość prenumeraty rocznej „Wiadomości Chemicznych” za 2018 r. będzie wynosiła **231 zł** dla instytucji i niezrzeszonych prenumeratorów indywidualnych. Dla członków PTChem **20 zł**. Należność za prenumeratę prosimy przekazywać na konto:

Bank PEKAO SA
Oddział we Wrocławiu
pl. Powstańców Śl. 9, 50-950 Wrocław
Redakcja „Wiadomości Chemiczne”
48 1240 6670 1111 0000 5649 8781

Prenumerata „Wiadomości Chemicznych” dla członków PTChem, połączona z opłatą składek członkowskich, jest znacznie niższa i przedstawia się następująco:

- prenumerata „Wiadomości Chemicznych” na rok 2018 wraz ze składką członkowską, w ramach której dostarczany jest „Orbital”, wynosi **70 zł** (składka – 50 zł, prenumerata – 20 zł);
- emeryci, doktoranci oraz studenci płacą **35 zł** (składka – 15 zł, prenumerata – 20 zł); a nauczyciele szkół średnich i podstawowych płacą **40 zł** (składka – 20 zł, prenumerata – 20 zł).

Członkowie PTChem, którzy zechcą zaprenumerować „Wiadomości Chemiczne” na podanych tu warunkach, proszeni są o wnoszenie opłat na konto:

PTChem Warszawa, ul. Freta 16
Bank BGŻ
54 2030 0045 1110 0000 0261 6290

LISTA RECENZENTÓW WSPÓŁPRACUJACYCH Z REDAKCJĄ WIADOMOŚCI CHEMICZNE W LATACH 2015–17

prof. dr hab. Grażyna Bator
Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski

prof. dr hab. inż. Barbara Becker
Politechnika Gdańsk, Wydział Chemiczny

dr n. farm. Barbara Bednarczyk-Cwynar
Zakład Chemii Organicznej UM w Poznaniu

prof. zw. dr hab. inż. Stanisław Błażewicz
Akademia Górnictwo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie; Wydział
Inżynierii Materiałowej i Ceramiki; Katedra Biomateriałów

prof. dr hab. Stanisław Boryczka
Śląski Uniwersytet Medyczny, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medy-
cyngi Laboratoryjnej w Sosnowcu, Katedra i Zakład Chemii Organicznej

prof. dr hab. Andrzej Bojarski
Instytut Farmakologii Polskiej Akademii Nauk

prof. dr hab. Ewa Joanna Bulska
Uniwersytet Warszawski; Wydział Chemii

prof. zw. dr hab. inż. Bogdan Burczyk
Politechnika Wrocławskiego; Wydział Chemiczny; Instytut Technologii Organicz-
nej i Tworzyw Sztucznych

prof. zw. dr hab. Bogusław Buszewski
Wydział Chemii UMK, Katedra Chemii Środowiska i Bioanalizy

dr hab. Michał Bystrzejewski
Uniwersytet Warszawski, Wydział Chemii

dr Marek Cebrat
Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii

dr hab. Lech Celewicz
Uniwersytet A. Mickiewicza Wydział Chemii Pracownia Chemii Nukleozydów
i Nukleotydów

prof. dr hab. Adam Choma
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Zakład Genetyki i Mikrobiologii

prof. dr hab. inż. Jerzy Choma
Wojskowej Akademii Technicznej w Warszawie, Instytucie Chemii

prof. dr hab. Mirosław Czarnecki
Wydział Chemii Uniwersytet Wrocławski

prof. dr hab. Leszek Ciunik
Wydział Chemii Uniwersytet Wrocławski

prof. dr hab. Marek Cegła
Uniwersytet Jagielloński; Collegium Medicum; Wydział Farmaceutyczny;
Katedra Chemii Organicznej

prof. dr hab. Cieślak-Golonka
Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska

prof. dr hab. Witold Danikiewicz
Instytut Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk

dr hab. inż. Barbara Dębska
Politechnika Łódzka; Wydział Chemiczny

Prof. dr hab. Jacek Dramiński
Wyższa Szkoła Nauk o Zdrowiu w Bydgoszczy

prof. dr hab. Andrzej Dżugaj
Uniwersytet Wrocławski; Wydział Nauk Biologicznych; Instytut Genetyki i Mikrobiologii

prof. dr hab. Michał Fedoryński
Politechnika Warszawska; Wydział Chemiczny; Instytut Biotechnologii

dr hab. Rafał Frański
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza; Wydział Chemii

prof. dr hab. Andrzej Gamian
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu; Wydział Lekarski;
Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej

prof. dr hab. inż. Elżbieta Grabińska-Sota
Politechnika Śląska, Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki, Katedra Biotechnologii Środowiskowej

prof. dr hab. Jolanta Gromadzińska
Instytut Medycyny Pracy im. Prof. J. Nofera, Zakład Toksykologii i Kancero-genezy

prof. Karol Lesław Grela
Instytut Polskiej Akademii Nauk

Katarzyna Gobis
Gdański Uniwersytet Medyczny; Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej; Katedra i Zakład Chemii Organicznej

prof. dr hab. Roman Gancarz
Politechnika Wrocławskie; Wydział Chemiczny; Wydziałowy Zakład Technologii Organicznej i Farmaceutycznej

prof. zw. dr hab. Jacek Gliński
Uniwersytet Wrocławski; Wydział Chemii

dr hab. Ryszard Gryglewski
Uniwersytet Jagielloński; Collegium Medicum; Wydział Lekarski; Katedra Historii Medycyny

prof. dr hab. Teresa Grzybek
Akademia Górnictwo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie, Wydział Energetyki i Paliw

prof. dr hab. Maria Grzeszczuk
Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii

prof. dr hab. Jerzy Hawranek
Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii

Dr inż. Jolanta Iłowska
Instytut Ciężkiej Syntezy Organicznej
„Blachownia” Zakład Środków Specjalistycznych

prof. dr hab. Stanisław Leśniak
Uniwersytet Łódzki; Wydział Chemii, Katedra Chemii Organicznej i Stosowanej

prof. dr hab. Beata Liberek
Uniwersytet Gdańskie; Wydział Chemii; Katedra Chemii Organicznej

prof.dr.hab. Marian Jaskuła
Uniwersytet Jagielloński; Wydział Chemii; Zakład Chemii Fizycznej i Elektrochemii

dr hab. inż. Andrzej Kaim
Wydział Chemii Uniwersytet Warszawski

prof. dr hab. Roman Kaliszan
Gdański Uniwersytet Medyczny

prof. dr hab. Zygmunt Kowalski
Instytut Chemii i Technologii Nieorganicznej, Politechnika Krakowska

prof. dr hab. n. med. Adam Klimowicz
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, Katedra i Zakład Chemii Kosmetycznej i Farmaceutycznej

prof. dr n. przyr. Marian Kruzel
University of Texas Health Science Center at Houston Department of Integrative Biology and Pharmacology

prof. dr hab. Leszek Kępiński
Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych Polskiej Akademii Nauk

dr hab. Karol Kacprzak
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu; Wydział Chemii; Pracownia Stereochemii Organicznej

dr hab. Inż. Janina Kabatc
Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy; Wydział Technologii i Inżynierii

prof. zw. dr hab. inż. Paweł Kazimierz Kafarski
Politechnika Wrocławskie, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. Bogusław Kryczka
Uniwersytet Łódzki; Wydział Chemii; Katedra Chemii Organicznej i Stosowanej

prof. dr hab. Paweł Grzegorz Krysiński
Uniwersytet Warszawski, Wydział Chemii

prof. dr hab. Aleksandra Kubicz
Uniwersytet Wrocławski; Wydział Nauk Przyrodniczych; Instytut Biochemii
i Biologii Molekularnej

prof. dr hab. Leszek Kępiński
Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN

prof. dr hab. Aleksander Koll
Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski

dr hab. inż. Aleksandra Kołodziejczyk
Uniwersytet Gdańskie, Wydział Chemii, Katedra Chemii Medycznej

prof. dr hab. inż. Aleksander Kołodziejczyk
Politechnika Gdańskie; Wydział Chemiczny; Katedra Chemii Organicznej

prof. dr hab. Teresa Kowalik-Jankowska
Uniwersytet Wrocławski; Wydział Chemii

prof. dr hab. Adam Kraszewski
Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk

dr hab. Marek Krzeminiński
Uniwersytet Mikołaja Kopernika; Wydział Chemii

dr hab. Anna Łukaszewicz-Hussain
Akademia Medyczna w Białymostku; Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym

prof. dr hab. Wojciech T. Markiewicz
Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk

prof. dr hab. Wojciech Macyk
Uniwersytet Jagielloński; Wydział Chemii; Zakład Chemii Nieorganicznej

dr inż. Sylwia Magiera
Politechnika Śląska, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. Wojciech T. Markiewicz
Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk

dr hab. Agnieszka Markowska
Zakład Chemii Organicznej, Uniwersytet Medyczny w Białymostku

dr hab. inż. Katarzyna Materna
Politechnika Poznańska, Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej

dr hab. Jan Milecki
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza; Wydział Chemii

prof. dr hab. inż. Jacek Młochowski
Politechnika Wrocławskiego; Wydział Chemiczny

prof. dr hab. Jacek Młynarski
Uniwersytet Jagielloński, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. n. farm. Hanna Mojska
Instytut Żywności i Żywienia im. prof. dra med. Aleksandra Szczygły

prof. dr hab. Jacek Namiesnik
Politechnika Gdańskia; Wydział Chemiczny; Katedra Chemii Analitycznej

dr hab. Agnieszka Nosal-Wiercińska
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie; Wydział Chemiczny

dr inż. Joanna Ortyl
Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki; Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej; Katedra Biotechnologii i Chemii Fizycznej

prof. dr hab. Kazimierz Orzechowski
Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. inż. Ryszard Józef Ostaszewski
Instytut Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk

dr hab. Stanisław Porwański
Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii

dr. hab. Piotr Przybylski
Uniwersytet Adama Mickiewicza, Wydział Chemii

prof. dr hab. Sylwia Rodziewicz – Motowidło
Wydział Chemii, Uniwersytet Gdańskiego

dr hab. Sławomir Szafert
Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski

prof. dr hab. Sławomira Skrzypek
Uniwersytet Łódzki; Wydział Chemii; Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej

prof. dr hab. Jarosław Ślawiński
Gdański Uniwersytet Medyczny; Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej; Katedra i Zakład Chemii Organicznej

prof. dr hab. Elżbieta Sochacka
Instytut Chemii Organicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Łódzka

prof. dr hab. Grzegorz Schroeder
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza; Wydział Chemii; Zakład Chemii Supramolekularnej

dr hab. inż. Renata Siedlecka
Politechnika Wrocławskiego; Wydział Chemiczny

prof. dr hab. Wiesława Sikora
Katedra Fizyki Materii Skondensowanej, Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej AGH

prof. dr hab. Jerzy Silberring
Akademia Górnictwo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie; Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki; Katedra Biochemii i Neurobiologii

prof. dr hab. Katarzyna Stadnicka
Uniwersytet Jagielloński; Wydział Chemii; Zakład Krystalochimii i Krystalofizyki

prof. dr hab. Janusz Stafiej
Instytut Chemii Fizycznej PAN

prof. dr hab. Jacek Stawiński
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

dr hab. Piotr Tadeusz Stefanowicz
Uniwersytet Wrocławski; Wydział Chemiczny

prof. dr hab. Maciej Stobiecki
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

prof. dr hab. inż. Jacek Mikołaj Skarzewski
Politechnika Wrocławskiego; Wydział Chemiczny; Wydziałowy Zakład Chemiczny
Organicznej

prof. dr hab. inż. Wincenty Antoni Skupiński
Politechnika Warszawska; Wydział Chemiczny; Zakład Materiałów Wysoko-energetycznych

dr hab. Krzysztof Sobczak
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu; Wydział Biologii; Instytut
Biologii Molekularnej i Biotechnologii

prof. dr hab. Jadwiga Sołoduchko
Politechnika Wrocławskiego; Wydział Chemiczny; Wydziałowy Zakład Chemiczny
Medycznej i Mikrobiologii

prof. dr hab. Stanisław Kazimierz Sobiak
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu; Wydział Farmaceutyczny; Katedra i Zakład Technologii Chemicznej Środków Leczniczych

prof. dr hab. inż. Elżbieta Sochacka
Politechnika Łódzka; Wydział Chemiczny; Instytut Chemiczny Organicznej

prof. dr hab. Mirosław Soszyński
Uniwersytet Łódzki; Wydział Biologii i Ochrony Środowiska; Katedra Biofizyki
Molekularnej

dr hab. inż. Anna Sokół-Łętowska
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Katedra Technologii Owoców,
Warzyw i Zbóż

prof. dr hab. Marek Tkacz
Instytut Chemii Fizycznej PAN, Zakład Fizykochemii Ciała Stałego

prof. dr hab. Vinh Hung Tran
Polska Akademia Nauk, Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych

prof. zw. dr hab. inż. Janusz Tadeusz Trawczyński
Politechnika Wrocławskiego; Wydział Chemiczny; Zakład Chemii i Technologii
Paliw

prof. zw. dr hab. inż. Andrzej Witold Trochimczuk
Politechnika Wrocławskiego, Wydział Chemiczny, Wydziałowy Zakład Materia-
łów Polimerowych i Węglowych

dr hab. Lilianna Trynda-Lemiesz
Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich; Wydział Farmaceutyczny z Oddzia-
łem Analityki Medycznej; Katedra i Zakład Chemii Analitycznej

prof. zw. dr hab. Anna Maria Trzeciak
Uniwersytet Wrocławski; Wydział Chemii

dr hab. Przemysław Starynowicz
Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii

prof. zw. dr hab. Zbigniew Szewczuk
Uniwersytet Wrocławski; Wydział Chemii

prof. dr hab. Maciej Szmitkowski
Zakład Diagnostyki Biochemicznej, Uniwersytet Medyczny w Białymostku

prof. dr hab. Anna Szymyrka-Grzebyk
Polska Akademia Nauk, Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych

prof. dr hab. Artur Terzyk
Uniwersytet Mikołaja Kopernika; Wydział Chemii

dr inż. Bożena Tyliaszczak
Politechnika Krakowska, Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej

dr inż. Bożena Twardochleb
Instytut Ciężkiej Syntezy Organicznej, Zakład Produktów Ekologicznych

dr Agnieszka Tafelska-Kaczmarek
Uniwersytet Mikołaja Kopernika; Wydział Chemii

prof. dr hab. Ewa Witek
Uniwersytet Jagielloński; Wydział Chemii; Zakład Technologii Chemicznej

dr inż. Beata Wileńska
Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii

prof. dr hab. Krystyna Wieczorek-Ciurowa
Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej, Politechnika Krakowska

prof. dr hab. Monika Wujec
Uniwersytet Medyczny w Lublinie; Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem
Analityki Medycznej; Katedra i Zakład Chemii

prof. dr hab. inż. Ilona Wandzik
Katedra Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii; Politechnika
Śląska

prof. dr hab. Anna Zawisza
Uniwersytet Łódzki; Wydział Chemii

prof. dr hab. Lucjusz Zaprutko
Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

Redakcja „Wiadomości Chemicznych” informuje, że są u nas do nabycia następujące pozycje „Biblioteki Wiadomości Chemicznych”:

- Nomenklatura chemii nieorganicznej. Zalecenia 1990*, red. Z. Stasicka, cena 25 zł
Podstawowa terminologia stereochemii oraz Słownik podstawowych terminów w nauce o polimerach. Zalecenia 1996, red. O. Achmatowicz, B. Szechner i P. Kubisa, cena 12 zł
Nomenklatura węglowodanów. Zalecenia 1996, tłum. i red. T. Sokołowska i A. Wiśniewski, cena 18 zł
I.Z. Siemion, *Bronisław Radziszewski i lwowska szkoła chemii organicznej*, cena 18 zł
K. Maruszewski, *Fizykochemia molekuł zamkniętych w zeolitach i zol-żelach*, cena 18 zł
Praca zbiorowa, *Uporządkowane materiały mezoporowe*, red. B. Burczyk, cena 18 zł
Skorygowana nomenklatura rodników, jonów, jonorodników i podobnych indywidualów chemicznych. Zalecenia 1993, red. T. Sokołowska i A. Wiśniewski, cena 15 zł
I.Z. Siemion, *Lutum sapientiae, czyli Notatek chaotycznych część pierwsza*, cena 18 zł
M. Zabłocka-Malicka, *Ruchliwość jonów w podwójnych układach stopionych soli*, cena 8 zł.
Praca zbiorowa, *Nanomateriały*, red. D. Hreniak, W. Łojkowski, W. Stręk, M. Suszyńska, cena 25 zł.
Praca zbiorowa, *Ogniwa paliwowe – nowe kierunki rozwoju*, red. H. Drulis, J. Hanuza, D. Hreniak, M. Miller, G. Paściak, W. Stręk, cena 20 zł
Glosariusz nazw klas związków organicznych i reaktywnych produktów pośrednich oparty na strukturze (Zalecenia IUPAC 1994), red. i tłum. F. Kaźmierczak i J. Gawroński, cena 16 zł.
Od substacji prostych do życia. Świat RNA – początki życia na Ziemi, Zdzisław Chilmonczyk – NAKŁAD WYCZERPANY.
Profesor Bogusława Jeżowska-Trzebiatowska. 1908–1991 w setną rocznicę urodzin, cena 12,00 zł.
Chemia koordynacyjna w Polsce. Część I. Nakład wyczerpany, dostępna wersja elektroniczna.
Chemia koordynacyjna w Polsce. Część II. Nakład wyczerpany, dostępna wersja elektroniczna
Chemosensory optyczne oraz materiały rozpoznawcze dla jonów metali w roztworach, Krzysztof Kledzik, cena 22,00 zł.
Obliczenia teoretyczne stałej ekranowania magnetycznego i stałych strzżeń spinowo-spinowych. Teobald Kupka cena 20,00 zł.

Książki wysyłamy na koszt zamawiającego. Zamówienia prosimy kierować pod adresem: Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław. Opłaty należy wnosić na konto: Bank PEKAO SA O/Wrocław, Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, NRB 48 1240 6670 1111 0000 5649 8781.

REGULAMIN I INFORMACJE DLA AUTORÓW PUBLIKUJĄCYCH W CZASOPISMIE „WIADOMOŚCI CHEMICZNE”

1. Informacje ogólne

„Wiadomości Chemiczne” są recenzowanym czasopismem naukowym Polskiego Towarzystwa Chemicznego, które publikuje przede wszystkim artykuły przeglądowe. Ponadto publikowane są tutaj inne **wartościowe** materiały o charakterze edukacyjno-informacyjnym takie jak: artykuły oparte na pracach doktorskich lub habilitacyjnych, które zostały wyróżnione przez Rady Wydziałów, przed którymi toczyły się odpowiednie procesy; materiały informacyjne na temat uczonych oraz jednostek naukowych/firm chemicznych lub pokrewnych chemii; materiały o aktualnych osiągnięciach w szeroko pojętych naukach chemicznych.

Dodatkową ofertę Wydawnictwa stanowi seria „Biblioteka Wiadomości Chemicznych”, gdzie publikowane są dłuższe artykuły przeglądowe lub monografie poświęcone ważnym i aktualnym problemom współczesnej chemii. Autorzy, którzy chcieliby takie prace napisać, powinni wcześniej skontaktować się z Redakcją, a następnie przesyłać wstępnie przygotowaną publikację (redagowaną na wzór artykułów w czasopiśmie „Wiadomości Chemicznych”) lub informację na temat przygotowywanej pracy – tytuł przygotowywanej publikacji, przybliżoną liczbę stron, tabel, rysunków. W chwili obecnej Redakcja nie posiada środków na finansowanie prac w serii „Biblioteka Wiadomości Chemicznych”. W zależności od sytuacji finansowej Wydawnictwa, Redakcja zastrzega sobie prawo negocjacji kosztów druku z autorami lub Instytucjami zlecającymi druk.

„Wiadomości Chemiczne” wydawane są zarówno w wersji drukowanej jak i elektronicznej. Wersja elektroniczna udostępniana jest bezpłatnie w Internecie.

Czasopismo jest indeksowane/abstraktowane w kilku bazach danych: Chemical Abstracts, Polska Bibliografia Naukowa, BazTech, Polska Bibliografia Lekarska, Index Copernicus, Baza ARIANTA.

2. Informacje dla autorów na temat wymagań i zasad publikowania prac

- Prace nie były wcześniej publikowane, ani nie są złożone w redakcji innego czasopisma.
- Autorzy prac stosują się do wymagań praw autorskich tzn. w przypadku zamieszczania rysunków, tabel itp., pochodzących z opracowań opublikowanych w innych czasopismach lub publikacjach zwartych, posiadają pisemną zgodę na ich przedruk.
- Opublikowana raz praca bez zgody Redakcji, nie może być wydawana gdzie indziej.
- Autorzy przesyłający prace po raz pierwszy powinni podać swój numer telefonu oraz adresy poczty tradycyjnej i elektronicznej. Jest to niezbędny warunek sprawnego przebiegu opracowania redakcyjnego tekstu.
- Autorzy zobowiązani są do wykonania korekty tekstu. W pracach przyjętych do druku Redakcja ma prawo dokonywania niezbędnej korekty.
- Jeżeli autorzy nie zastrzegą inaczej w momencie zgłoszenia pracy, wydawca nabywa ogólnych praw autorskich do wydrukowanych prac (w tym prawo wydawania na nośnikach elektronicznych oraz w Internecie). Tytułem powyższego wykorzystania utworów autorom nie są wynierane honoraria.
- Wszystkie nadsyłane prace są poddawane wstępnej ocenie, która określa czy odpowiadają randze i profilowi „Wiadomości Chemicznych” oraz czy zostały przygotowane zgodnie z formalnymi wymogami MNiSW oraz Redakcji.
- Po uzyskaniu pozytywnej wstępnej oceny wszystkie prace są recenzowane przez co najmniej dwóch niezależnych recenzentów, zgodnie ze wskazówkami zawartymi w broszurze informacyjnej Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, http://www.nauka.gov.pl/fileadmin/user_upload/ministerstwo/Publikacje/20110216_MNiSW_broszura_210x210.pdf.
- O przyjęciu pracy do druku decyduje Komitet Redakcyjny.
- Prace, które Komitet Redakcyjny na podstawie uzyskanych recenzji stwierdził, że nie należy przyjąć do druku w czasopiśmie, po uwzględnieniu sugestii recenzentów mogą być powtórnie przesłane do czasopisma. W takim przypadku praca traktowana jest jako nowy tekst i ponownie przechodzi pełną procedurę recenzowania.
- Ponadto Komitet Redakcyjny informuje, że tzw. „ghostwriting” (któro wniósł znaczący wkład w powstanie publikacji, a nie został przedstawiony jako współautor lub też nie został wymieniony w podziękowaniu zamieszczonym w publikacji) lub „guest authorship” (udział autora jest znikomy lub też w ogóle nie miał miejsca, a mimo to jest współautorem publikacji) są przejawem nierzetelności naukowej. Wszelkie przejawy nierzetelności naukowej, łamania i naruszania zasad etyki obowiązującej w nauce będą ujawniane, włącznie z powiadomieniem jednostek zatrudniających autorów.
- Autorzy mają prawo do zaproponowania co najmniej trzech niezależnych recenzentów, jednak ostatecznego wyboru anonimowych recenzentów dokonuje Redakcja.

3. Koszty

Autorzy czasami mogą ponosić częściowe koszty wydania swoich artykułów. Tak jest w przypadku tzw. **stron nadliczbowych** tj. powyżej 25 stron. Za każdą rozpoczętą nadliczbową stronę jest naliczana opłata w wysokości około 50 zł. Najczęściej kwota ta pokrywana jest z funduszy pozyskiwanych przez Autorów lub przez Wydziały które wspomagają wydawanie „Wiadomości Chemicznych”. Niezależnie od rodzaju pracy opłata pobierana jest również **za strony drukowane w kolorze** (zgodnie z faktycznym kosztem druku).

Redakcja zastrzega sobie możliwość zmiany wysokości opłat, w zależności od wielkości dofinansowania z MNiSW oraz wypracowanych środków własnych. Faktura wystawiana jest po ukazaniu się pracy.

W przypadku prac w serii „Biblioteka Wiadomości Chemicznych”, Redakcja nie posiada środków na finansowanie i zastrzega sobie prawo negocjacji kosztów druku z autorami lub Instytucjami zlecającymi druk.

4. Informacje szczegółowe dotyczące przygotowania maszynopisu do druku

4.1. Wymagania merytoryczne

Tekst należy napisać zwięźle, prostym stylem, według zasad pisowni polskiej, z zachowaniem poprawnego i obowiązującego nazewnictwa fachowego. Nie należy zamieszować nadmiaru szczegółów odsyłając Czytelnika do piśmiennictwa oryginalnego, które to powinno uwzględniać najnowsze informacje, dotyczące napisanej pracy. Literaturę należy cytować ze źródeł oryginalnych.

4.2. Wymagania techniczne składu tekstu

- W przypadku prac współfinansowanych przez autorów, liczba stron oraz forma kolorystyczna manuskryptu nie jest ograniczona (wymagane jest wcześniejsze uzgodnienie z Redakcją).
- Maszynopisy prac autorów którzy nie chcą ponosić dodatkowych kosztów, nie powinny przekraczać 25 stron całej pracy (po wydruku w czasopiśmie) oraz drukowane będą w wersji czarno białej.
- Główny tekst nadsyłanych prac powinien być napisany w edytorze Word, czcionką Times New Roman, 12p z zachowaniem interlinii 1,5 oraz z 5 cm marginami z prawej strony. Przy podziale tekstu należy stosować numerację cyfrową wielorzędową. Numerujemy tylko tytuły rozdziałów, **nie numerujemy działów: Abstract, Wykaz stosowanych skrótów, Wprowadzenie, Uwagi końcowe, Podziękowanie, Piśmiennictwo cytowane. Jednolity sposób numeracji konsekwentnie stosuje się wewnątrz tekstu (w całym tekście tj. zarówno przy numerowaniu rozdziałów, przy przytaczaniu piśmiennictwa cytowanego oraz odwoływaniu się do tabel rysunków itp., nie należy stosować odsyłaczy hipertekstowych).**
- Tekst powinien być napisany poprawnym językiem, wszystkie skróty muszą być wyjaśnione, oznaczenia i jednostki miar należy podawać według układu SI, pozycje cytowanej literatury należy oznaczać numerami umieszczoneymi w nawiasach kwadratowych, w kolejności cytowania wg wzorów [1, 5, 7] (dla prac 1, 5 i 7) lub [1-5, 7] (dla prac od 1 do 5 oraz pracy 7).
- Jeśli w artykułach znajdują się przedruki rysunków, czy innych elementów prac cudzych, w opisach (polskich i angielskich) należy zamieścić stosowną informację.
- Zaleca się umieszczać w tekście pracy rysunki, tabele oraz podpisy (jeśli są przygotowane w edytorze Word), jednak w przypadku plików o bardzo dużych rozmiarach należy zaznaczyć miejsca na ich umieszczenie (zob. Pliki jakie należy przekazać do Redakcji).
- **Pierwsza strona pracy powinna zawierać kolejno:**
 - tytuł pracy w języku polskim (Times New Roman, 14 p, pogrubiony, WERSALIKI), i angielskim (Times New Roman, 14 p, WERSALIKI),
 - pełne imię i nazwisko autora (autorów) pracy (Times New Roman, 15p, pogrubione),
 - pełne nazwy ośrodków przypisane do autorów pracy (wraz z adresem ośrodka i adresem e-mail autora korespondującego (Times New Roman, 10,5, kursywa),
 - spis treści pracy z zastosowaniem następującego podziału:
Abstract
Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń
Wprowadzenie
1. Tytuł rozdziału
1.1. Tytuł podrozdziału itp.
Uwagi końcowe
Podziękowanie
Piśmiennictwo cytowane
- **Kolejne strony pracy powinny zawierać:**
 - **notki o autorach** pracy wraz z tytułem naukowym (można dołączyć osobno pliki z fotografiami autorów (zob. Pliki jakie należy przekazać do Redakcji)),

- **obszerne streszczenie pracy w języku angielskim** (od 1800 do 2700 znaków ze spacjami) z uwzględnieniem cytowanego piśmiennictwa oraz odsyłaczami do tabel, rysunków zamieszczonych w tekście (Rys. 1, Tab. 1-2, Schemat 1) oraz **słowa kluczowe** – nie więcej niż 6, uzyskane najlepiej z bazy hasel przedmiotowych podawane w języku angielskim i polskim,
- **wykaz stosowanych skrótów** – w przypadku niewielkiej liczby skrótów lub akronimów nie jest konieczne zamieszczanie tej pozycji, wówczas, skróty wyjaśniamy w tekście przy pierwszym użyciu. Angielskie skróty należy podać i wyjaśnić wg poniżej podanego wzoru lub w oparciu o inne prace zamieszczone w „Wiadomościach Chemicznych”. Przykład: dla skrótu SSRI – selektywne inhibitory zwrotnego wychwytu serotoniny (ang. *Selective Serotonin Reuptake Inhibitor*),
– dalszy tekst pracy zgodny z podawanym wcześniej spisem treści.
- **Tabele, rysunki, fotografie**
Tabele i rysunki powinny być zamieszczone w przesyłanym tekście oraz dodatkowo (po zatwierdzeniu pracy do druku, na etapie przygotowywania szczotki) dołączone w postaci osobnych plików zapisanych w formacie pdf, doc, jpg, tiff.
Tabele i rysunki powinny być przejrzyste, zawierać informacje niezbędne do zrozumienia treści, bez konieczności poszukiwania objaśnień w tekście pracy, należy je numerować cyframi arabskimi oraz podać tytuł (polski/angielski, nad tabelą, pod rysunkiem, Times New Roman, 10 p).
Wszystkie fotografie – należy przesyłać w postaci plików zapisanych w formacie tif, jpg lub podobnym, każdą zapisać w oddzielnym pliku o rozdzielcości co najmniej 300 dpi.
- **Piśmiennictwo cytowane**
Piśmiennictwo należy zestawić numerycznie według kolejności cytowania w tekście, należy cytować wyłącznie pozycje istotne dla treści pracy w sposób precyzyjny.
W przypadku **artykułów z czasopism tradycyjnych**, opis powinien zawierać kolejno następujące elementy: iniciały imion i nazwisko autora (autorów), skrót tytułu czasopisma zgodny z przyjętymi normami, rok wydania, **numer wolumenu zaznaczony pogrubioną czcionką**, numer pierwszej strony cytowanej pracy, np.
[1] J. Kowalski, Wiad.Chem., 2007, **61**, 473.
[2] W. Kowalski, A. Nowak, Przem. Spoż. 2010, **51**, 3.
W przypadku **książek** najprostszy opis powinien zawierać: iniciały imion i nazwisko autora (autorów), tytuł książki, nazwę wydawcy, miejsce wydania, rok wydania, np.
[1] J. Malinowski, Tytuł książki, PWN, Warszawa, 2004.
[2] W. Kowalski, Tytuł książki, Volumed, Wrocław, 1999
W przypadku zasobów Internetowych najprostszy opis powinien zawierać: iniciały imion i nazwisko autora (autorów), tytuł (artykułu) dokumentu online, [dostęp], wydawca, [data dostępu]. Warunki dostępu, np.
[7] J. Kowalski, Tytuł artykułu. [online], wydawca, [dostęp: 2010-05-20]. Dostępny w Internecie:
<http://www.....>

4.3. Materiały jakie należy przygotować w celu przesłania pracy do Redakcji

Przed podjęciem decyzji o zakwalifikowaniu pracy do druku w celu oceny merytorycznej należy przesyłać jeden plik kompletnej pracy zredagowany zgodnie z wymaganiami Redakcji.

Po uzyskaniu pozytywnej recenzji i po ustosunkowaniu się do uwag Recenzenta oraz Redakcji należy przesyłać ostateczną wersję pracy w następującej postaci:

- 1 plik tekstu zredagowanego zgodnie z wymaganiami Redakcji;
- 1 plik zawierający krótkie notki biograficzne o autorach nadesłanej pracy (każda notka do 150 wyrazów powinna zawierać: tytuł naukowy, miejsce pracy oraz inne ważne informacje o autorze);
- pliki zawierające zdjęcia portretowe autorów, w nazwie powinny wskazywać autora, którego zdjęcie dotyczy (dobrowolne, przesyłanie plików jest jednoznaczne ze zgodą na jego opublikowanie);
- 1 plik zawierający: stronę tytułową, streszczenie (abstrakt), słowa kluczowe, podpisy pod rysunki, tabele, schematy (wszystko w obu wersjach językowych); jeśli zachodzi potrzeba to również oddzielne pliki z rysunkami, schematami, tabelami (zob. Tabele, rysunki, fotografie).

Prace nie odpowiadające wyżej wymienionym wymaganiom nie będą przyjmowane do druku. Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania poprawek stylistycznych i skrótów. Autorzy są zobowiązani do wykonania korekty artykułu i jego zwrotu do Redakcji w ciągu kilku dni od otrzymania.

Na etapie przygotowania szczotki, w przypadku przesyłania prac z kolorowymi stronami prosimy o zaznaczenie stron, które w formie druku mają być kolorowe. Brak tej czynności będzie skutkował **czarno-białym wydrukiem wersji papierowej**. W przypadku zmian w wersji drukowanej kolorowych rysunków na czarno-białe, prosimy o przesyłanie dostosowanych do tego celu rysunków.

Prace prosimy przesyłać pocztą elektroniczną na adres: *beata.swiatek-tran@chem.uni.wroc.pl* lub *wchem@chem.uni.wroc.pl*, zaś dokumenty wymagające podpisów autorów (np. list intencyjny, oświadczenia autorów, kopie zgody na przedruk potwierdzone za zgodność z oryginałem) pocztą tradycyjną na adres Redakcji.

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”

SPIS TREŚCI

Barbara SZCZĘŚNIAK, Jerzy CHOMA, Mietek JARONIEC: Materiały kompozytowe MOF-grafen	671
Wojciech LIPIŃSKI, Beata KOLESIŃSKA: Modulowanie właściwości peptydów penetrujących do komórek	695
Magdalena KROPIDŁOWSKA, Katarzyna JĘDRZEJEWSKA, Ewa WIECZERZAK: Metody chemicznej ligacji w syntezie peptydów i białek – Część I	727
Magdalena KROPIDŁOWSKA, Katarzyna JĘDRZEJEWSKA, Ewa WIECZERZAK: Metody chemicznej ligacji w syntezie peptydów i białek – Część II	747
Informacje	763

W NASTĘPNYM ZESZYCIE UKAŻĄ SIĘ:

- Adrian Krzysztof ANTOSIK, Zbigniew CZECH: Przewodzące samoprzylepne kleje akrylanowe z napełnianczami węglowymi
- Agata SKORUPA, Sławomir MICHAŁKIEWICZ: Kwas α -liponowy – antyutleniacz antyutleniaczy – właściwości i metody oznaczania
- Janusz MADAJ, Justyna SAMASZKO-FIERTEK, Rafał ŚLUSARZ, Barbara DMOCHOWSKA: D-rybono-1,4-lakton. Część I. Otrzymywanie i wybrane pochodne
- Janusz MADAJ, Justyna SAMASZKO-FIERTEK, Rafał ŚLUSARZ, Barbara DMOCHOWSKA: D-rybono-1,4-lakton. Część II. Wykorzystanie w syntezie organicznej – wybrane reakcje