



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Chemii



Wydział Chemii
Uniwersytet Warszawski

PAN - Instytut Immunologii

Wpł. dnia 14.08.2025.....

L.dz. 152.....

Warszawa, 9 sierpień 2025

Prof. dr hab. Wojciech Dzwolak

wdzwolak@chem.uw.edu.pl

Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. inż. Jakuba Cebuli *Koniugaty metalokarboranów z insuliną - nowa strategia potęgowania skuteczności biologicznej leków peptydowych* powstałej w Laboratorium Chemii Biomedycznej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem dr. hab. Tomasza Goszczyńskiego – promotora – i dr. inż. Krzysztofa Finka – promotora pomocniczego.

Jednym z kierunków poszukiwań nowych terapii wymuszonych m.in. zjawiskiem narastającej antybiotykoodporności patogennych bakterii czy też niedoskonałościami współcześnie stosowanych terapii cukrzycy jest sięganie po radykalne, „abiotyczne” (np. poprzez wprowadzanie wiązań C-F) modyfikacje chemiczne molekuł potencjalnych leków. W ten właśnie nurt badań wpisuje się rozprawa mgr. inż. Jakuba Cebuli „*Koniugaty metalokarboranów z insuliną - nowa strategia potęgowania skuteczności biologicznej leków peptydowych*”, w której Autor eksploruje możliwe terapeutyczne zastosowania molekuł, w których strukturę wprowadzone zostały dość nieoczywiste na gruncie konwencjonalnej farmakologii grupy chemiczne – ligandy karboranowe koordynujące jon metalu (z reguły kobaltu). Za tym śmiałym, choć mającym swoją wcześniejszą, poprzedzającą prace Doktoranta historię, posunięciem przemawiają jednak pewne argumenty: niska toksyczność tych związków, a przede wszystkim charakterystyka oddziaływań metalokarboranowych klasterów z niepolarnymi fragmentami biomakromolekularnych targetów („efekt superchaotropowy”) i wiążąca się z tym m.in. zdolność metalokarboranów do odwracalnego wiązania albumin surowiczych krwi.

Na przedstawioną do recenzji rozprawę składają się poprzedzone dość zwięzłym wstępem i zarysem celu pracy manuskrypty trzech prac: dwóch już opublikowanych w renomowanych czasopismach i jednej zdeponowanej na serwerze pre-print ChemRxiv - niezrecenzowanej do chwili składania rozprawy. Do rozprawy dołączone są deklaracje wkładu merytorycznego pozostałych współautorów tych publikacji oraz płyta DVD-R z jej cyfrową wersją oraz plikami Supplementary Information poszczególnych artykułów.

Pierwszy manuskrypt rozprawy pt. „*Supramolecular chemistry of anionic boron clusters and its applications in biology*” opublikowany w prestiżowym ***Coordination Chemistry Reviews*** (J. Cebula jako pierwszy autor) jest pracą przeglądową wprowadzającą w chemię metalokarboranów i ich potencjalnie użytecznych biomedycznie oddziaływań (również za sprawą modyfikacji kowalencyjnych) z białkami, membranami lipidowymi i kwasami nukleinowymi. Jakkolwiek o jej niezaprzeczalnych walorach świadczy już sama ranga czasopisma, muszę jednak w tym momencie wspomnieć, że w pracy tej, jak i w kolejnych dwóch manuskryptach (ale również w autonomicznym wstępie rozprawy) zabrakło mi bardziej szczegółowych, mechanistycznych rozważań na temat istoty efektu superchaotropowego czy też zaprezentowania obecnego stanu wiedzy i hipotez co do miejsca wiązania klasterów metalokarboranów na powierzchni albumin surowiczych (np. dyskusji możliwej roli miejsc Sudlowa I i II).

Oryginalne wyniki swoich badań mgr. inż. Cebula prezentuje w drugiej wchodzącej w skład rozprawy pracy „*Structural Patterns Enhancing the Antibacterial Activity of Metallacarborane-Based Antibiotics*” opublikowanej w renomowanym ***Journal of Medicinal Chemistry***, ACS (J. Cebula jako pierwszy autor z 14-stu; według zgodnych oświadczeń współautorów, Doktorant wniósł do niej kluczowy wkład już na etapie wstępnej koncepcji badań, opracowania i przeprowadzenia syntez związków, wreszcie analizy wyników i pisanie manuskryptu). Dzięki imponującym nakładom pracy mgr. inż. Cebuli (m.in. synteza dwóch serii modyfikowanych chemicznie COSAN-ów) oraz szerokiej gamy metod weryfikacji aktywności biologicznej tych związków (wobec różnych typów patogennych bakterii, jak i

wybranych linii komórek ludzkich hodowanych *in vitro*) autorom udało się uzyskać sfunkcjonalizowane molekuly COSAN o silnym i selektywnym (*vis a vis* komórek ludzkich) działaniu bakteriobójczym. Dodatkowym walorem pracy jest wzięcie pod uwagę II podzbioru molekuł, w których screening właściwości biologicznych prowadzony był dla metalokarboranów z inkrementalnie modyfikowaną grupą funkcyjną. Tego rodzaju podejście może stać się przyczynkiem do dalszych, pogłębionych prac nad molekularnymi mechanizmami działania tych leków.

Ostatnim włączonym do rozprawy manuskryptem jest „*An Alternative Strategy for Albumin Binding in Therapeutics. Proof-of-Concept Synthesis of Metallacarborane–Insulin Conjugates*” (i tu Doktorant jest pierwszym autorem wnoszącym kluczowy i wszechstronny wkład w jego powstanie). Ambitnym zamierzeniem tej najściślej odpowiadającej tytułowi i celom rozprawy doktorskiej pracy jest wykazanie, iż sprzęganie insuliny z metalokarboranami (COSAN) może być skuteczną strategią tworzenia analogów hormonu wykazujących powinowactwo do albumin surowiczych (podobnych do stosowanych już analogów insuliny o przedłużonym działaniu wyposażonych w kotwicę lipidową zamiast klasterów boru). Tego rodzaju mediowane przez COSAN oddziaływanie insulina – albumina powinno prowadzić do opóźnionego w czasie uwalniania aktywnych hormonalnie monomerów insuliny do osocza pozwalając na uzyskanie pożądanego profilu farmakokinetycznych. W pracy przetestowano różne strategie funkcjonalizacji insuliny ludzkiej za pomocą COSAN-ów – zarówno pod kątem skuteczności syntezy i oczyszczania koniugatów białko-metalokarboran, jak i wpływu liganda na konformację insuliny (przy użyciu spektroskopii CD), ich wiązania do białka HSA (m.in. z wykorzystaniem spektroskopii fluorescencyjnej i SPR) i wreszcie aktywności biologicznej tych analogów. Mimo znaczącej skali trudności tego przedsięwzięcia Doktorantowi (i jego współpracownikom) udało się dowieść, że oparte o metalokarborany „derywatyzowanie” insuliny prowadzi do powstania analogów hormonu o zmodyfikowanych zgodnie z pierwotną hipotezą badawczą właściwościach farmakologicznych. Jakkolwiek wysoko oceniam i tę pracę chciałbym wskazać na kilka drobnych aspektów budzących pewien niedosyt:

1. Zakotwiczenie COSAN na C-końcu łańcucha B insuliny wydaje się być intuicyjnym, bezpiecznym podejściem w minimalnym stopniu zaburzającym oddziaływanie hormonu z receptorem insuliny (np. w site 1). Jednak zaobserwowane w pracy obniżenie intensywności sygnału CD (eliptyczność przy 222 nm) sugeruje pewną dalekozasięgową destabilizację natywnych struktur α -helikalnych. Wydaje się, że przyjrzenie się temu procesowi z wykorzystaniem dynamiki molekularnej byłoby uzasadnione.
2. Jakkolwiek manipulacja temperaturą (albo lepkością) wydaje się konieczna by odróżnić czysto statyczne i czysto dynamiczne scenariusze wygaszania fluorescencji (w reżimie stacjonarnych pomiarów intensywności), w przypadku układu HSA - INS-MC podejście to jest problematyczne ze względu na możliwą nawet w zakresie umiarkowanych temperatur (298-310K, wg. Supporting Information do ms. 3) zmianę dynamiki fluktuacji bocznych łańcuchów aminokwasowych w na powierzchni HSA. Pewniejszym sposobem weryfikacji mechanizmu wygaszania byłyby pomiary czasowo-rozdzielcze fluorescencji. Oczywiście kwestia ta ma tak naprawdę marginalne znaczenie z punktu widzenia nadrzędnego celu pracy, a mechanizm statyczny od początku wydaje się być oczywisty.
3. W pracy zabrakło mi próby odpowiedzi na dość istotne w przypadku insuliny pytanie o to, jak ten nowy typ funkcjonalizacji wpłynie na tendencję białka do agregacji i tworzenia fibryli amyloidowych (spontaniczna agregacja insuliny jest dobrze znanym problemem w jej przechowywaniu i w opartej o insulinę terapii cukrzycy). Wyobrażam sobie, że - z jednej strony COSAN mógłby przeciwdziałać agregacji poprzez steryczne blokowanie tworzenia się protofilamentów insuliny (zwłaszcza w przypadku krótkich łączników, jak w INS-3) ze względu na postulowane ciasne upakowanie struktury równoległej, in-register β -kartki w insulinowym amyloidzie. Z drugiej jednak strony, sfunkcjonalizowany COSAN-em C-końcowy fragment B-łańcucha mógłby pozostawać częściowo nieustrukturyzowany i poza strukturą beta-kartki, co pozwoliłoby monomerom INS-MC na uniknięcie blokującej agregację zawady sterycznej. Na dodatek, efekt superchaotropowy pomiędzy ligandami COSAN a niepolarnymi

fragmentami insuliny mógłby lokalnie stymulować wczesne fazy amyloidogennej nukleacji prowadząc ostatecznie do wyraźniejszej tendencji do tworzenia agregatów. Wydaje się, że prosty test – np. oparty o fluorescencję tioflawiny T mógłby rozstrzygnąć tego rodzaju spekulacje recenzenta.

Jednak wszystkie poruszone tu kwestie nie zmieniają mojej wysokiej oceny pracy „*Koniugaty metalokarboranów z insuliną - nowa strategia potęgowania skuteczności biologicznej leków peptydowych*” wnoszącej oryginalny i rzetelny wkład w projektowanie nowych leków opartych.

W podsumowaniu:

Stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (t.j. Dz. U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.) oraz wnioskuję o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dyscyplinie nauki biologiczne.

Ponadto, biorąc pod uwagę wysoką jakość uzyskanych wyników naukowych, doskonałe portfolio publikacyjne mgr. inż. Jakuba Cebuli (w tym również publikacje nie związane bezpośrednio z rozprawą) oraz jego postawę akademicką wnoszę o wyróżnienie rozprawy.



/ Wojciech Dzwolak