

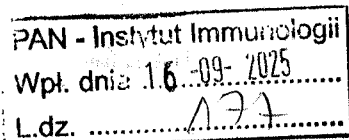


WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII

ZAKŁAD CHEMII BIOLOGICZNEJ
ul. Joliot-Curie 14a, pok. 3.12
50-383 Wrocław

tel. +48 71 375 27 65

www.chembiolab.uni.wroc.pl



Prof. dr hab. Artur Krężel
Zakład Chemii Biologicznej
Wydział Biotechnologii
Uniwersytet Wrocławski
Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław

Wrocław, 12.09.2025

**Recenzja pracy doktorskiej autorstwa mgr inż. Jakuba Cebuli pt. "Koniugaty
metalokarboranów z insuliną – nowa strategia potęgowania skuteczności biologicznej leków
peptydowych "**

Badania będące podstawą przedstawionej pracy doktorskiej zostały wykonane przez Doktoranta podczas jego pracy w Laboratorium Chemii Biomedycznej w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk pod opieką naukową dr hab. Tomasza Goszczyńskiego jako promotora i dr inż. Krzysztofa Finka jako promotora pomocniczego. Tematyka pracy koncentruje się na opracowaniu nowych analogów insuliny modyfikowanych z wykorzystaniem metalokarboranów, w szczególności kompleksu kobaltu COSAN.

Insulina jest kluczowym hormonem regulującym metabolizm, który umożliwia komórkom pobieranie i wykorzystywanie glukozy. Jej prawidłowe działanie zapewnia utrzymanie równowagi energetycznej organizmu i stabilnego poziomu glukozy we krwi. Odgrywa także niezwykle ważną rolę w terapii cukrzycy typu 1 i 2 gdy podawana jest egzogennie. Pomimo ponad stuletniego stosowania insuliny, nadal istnieją ograniczenia związane z jej farmakokinetyką, ryzykiem hipo- i hiperglikemii, koniecznością iniekcji i kontrolowania poziomu glukozy. Współczesne strategie modyfikacji insuliny, na przykład poprzez zmiany sekwencji aminokwasowej czy dołączanie kwasów tłuszczowych, poprawiły jej właściwości, lecz nadal nie rozwiązują wszystkich problemów klinicznych. Na tym tle zaproponowano zastosowanie klastrów boranowych, a w szczególności

metalakarbonów, które charakteryzują się unikalnymi właściwościami fizykochemicznymi istotnymi w chemii medycznej, t. j. zdolnością do przenikania przez błony biologiczne, samoorganizacji, wiązania albuminy czy zwiększania stabilności białek. Koniugacja insuliny z COSAN ma na celu nadanie jej nowych cech, takich jak wydłużone działanie, poprawiona stabilność czy zmodyfikowana aktywność biologiczna, co mogłoby stanowić innowacyjną strategię terapeutyczną w leczeniu cukrzycy.

Treść pracy doktorskiej, mającej 161 stron, przedstawiona jest w formie tzw. przewodnika, gdzie w pierwszej części zostało zamieszczone wprowadzenie. Wstęp do zagadnień związanych z badaniami został napisany sposób przejrzysty i łatwy do zrozumienia dla osób, które na co dzień nie zajmują się chemią biomedyczną. Rozdział ten, liczący cztery i pół strony jest dość skromny w swojej treści i dość pobieżnie wprowadza czytelnika w zagadnienia istotne dla zrozumienia poszczególnych manuskryptów wchodzących w skład pracy doktorskiej. Zdaję sobie sprawę, że idea tzw. przewodników polega na przedstawieniu opublikowanych (w tym wypadku nie wszystkich) prac, co skraca znacząco objętość rozprawy. Niemniej jednak, wstęp powinien być na tyle wyczerpujący, aby lektura dalszej części pracy nie stanowiła większego problemu dla czytelnika. Mimo skromnej objętości, wstęp należycie odwołuje się do literatury fachowej o czym świadczą 62 pozycje literaturowe. Praca Pana Jakuba Cebuli pozbawiona jest rozdziału rozwijającego używane w pracy skróty. Na przykład na stronie 11 pojawiają się skróty, które wyjaśnione są dopiero później, choć ich rozwinięcie powinno pojawić się w miejscu pierwszego użycia. Osobny rozdział poświęcony skrótom używanym również w publikacjach pomógłby istotnie w lekturze pracy doktorskiej.

Cele pracy zostały zawarte we wstępie i nie stanowią osobnego rozdziału, co jest dość nietypową formą ich prezentacji, jednakże nie wpływającą na ich zrozumienie. Dość sporym zaskoczeniem jest umieszczenie Celu 1 pracy jako studium literatury. Studium literaturowe jest oczywistą częścią pracy badawczej, nawet jeśli skutkuje ona niezależnym artykułem przeglądowym jak to ma miejsce w przypadku Manuskryptu 1. Niemniej jednak, jasne jest, że nadrzędnym celem pracy Doktoranta było opracowanie i synteza pierwszych koniugatów insuliny z metalakarbonami

(INS-MC) oraz kompleksowa ocena ich potencjału terapeutycznego. Realizacja obejmowała zarówno etapy syntetyczne, badania fizykochemiczne oraz biologiczne, pozwalające określić właściwości i aktywność otrzymanych związków i koniugatów. To, czego zabrakło mi w celach, to jasne wskazanie czytelnikowi, że synteza związków bazujących na klatkach boranowych, otrzymanych w trakcie realizacji pracy, miała na celu uzyskanie dwóch typów substancji: o charakterze anytproliferacyjnym jako alternatywa dla antybiotyków a także niskocytotoksycznych do koniugacji z insuliną. O tym czytelnik dowiaduje się w zasadzie tylko ze streszczenia. W związku z powyższym, a także mając na uwadze treść wszystkich manuskryptów warto byłoby zmienić tytuł pracy, trafniej wskazujący oba cele.

Zasadniczą część ocenianej pracy to wyniki pracy teoretycznej i eksperymentalnej zawarte w trzech manuskryptach naukowych:

- Manuskrypt 1: *Coordination Chemistry Review* (2023), 477, 214940, w której Doktorant jest pierwszy na liście spośród czterech autorów.
- Manuskrypt 2: *Journal of Medicinal Chemistry* (2023), 66, 14948-14962, w której Doktorant jest pierwszy na liście spośród 14 autorów.
- Manuskrypt 3: Nieopublikowany pre-print zdeponowany w bazie *CheRxiv* (2025) DOI: 10.26434/chemrxiv-2025-sp2rt, w którym Doktorant jest pierwszym spośród ośmiu autorów.

Każdy z manuskryptów poprzedzony jest krótkim wprowadzeniem, ułatwiającym zrozumienie treści manuskryptu. Do pracy, aczkolwiek tylko w wersji elektronicznej, zostały dołączone również suplementy, w których znajdują się wyniki i opisy, które nie weszły w treść manuskryptów. Istotną część pracy to oświadczenia współautorów, które według mnie z powodzeniem mogły zostać zebrane jedynie w wersji elektronicznej.

Wiodąca rola Doktoranta w badaniach jest jasna i niepodważalna, o czym świadczy pozycja na liście współautorów manuskryptów. Zauważalna jest jednak spora ilość pozostałych autorów, zwłaszcza w Manuskrypcie 2. Do pracy dołączone są, co prawda, skrupulatnie przygotowane oświadczenia współautorów, nie mniej jednak proszę, aby Doktorant podczas obrony mógł odnieść

się do swojego oraz innych wkładu w powstanie manuskryptów. Tekst pracy, w tym załączonych manuskryptów jest napisany zrozumiałym i poprawnym językiem angielskim. Całość przewodnika jak i publikacji stanowi dobry opis działań Doktoranta pod okiem promotorów. Jednocześnie lektura pozostawia kilka miejsc, które warto skomentować oraz pytań, na które będę rad usłyszeć odpowiedzi. Dla ułatwienia moje główne komentarze i pytania zostały pogrupowane jak w rozprawie, tj. z podziałem na kolejne manuskrypty.

Manuskrypt 1: *Coordination Chemistry Review* (2023)

Manuskrypt 1 został opublikowany w prestiżowym czasopiśmie naukowym, stojącym na czele czasopism poświęconych chemii koordynacyjnej i sama publikacja w nim zasługuje na pochwałę. Niewątpliwie, studium literatury poświęconej klastrom boranowym przydało się Doktorantowi na dalszych, praktycznych etapach pracy doktorskiej. Pracę rozpoczyna krótki rys historyczny dotyczący zarówno klastrow boranowych jak i rozwojowi chemii supramolekularnej. Widać z tego, że oba rodzaje chemii rozwijały się w podobnym czasie, mimo wcześniejszego odkrycia pierwszych borowodorów. Autor systematycznie opisuje strukturę najpopularniejszych klastrow borowodorowych podkreślając rolę ich pochodnych z podstawionymi atomami węgla (karborany). Następnie, na łamach manuskryptu szczegółowo opisuje właściwości klastrow boranowych typu gość-gospodarz skupiając się na kompleksach z makrocyklami ale w szczególności na biemelkułach, t.j. białkach, DNA, cukrach czy błonach komórkowych. Następnie przechodzi do tematyki nanocząstek, których struktury bazują na klastrach boranowych. Ostatni rozdział pracy poświęcony jest ciekawemu zagadnieniu, jakim są klosomery (*ang. closomers*), czyli organiczne pochodne dodekahydroksy-dodekaboranu $[B_{12}(OH)_{12}]^{2-}$, gdzie reszty organiczne połączone są z klastrami poprzez wiązania B–O–C. Dzięki temu powstaje układ złożony z klatki boranowej, linkera oraz liganda. Ligandy stanowią funkcjonalny element klosomeru, pozwalający na wprowadzenie licznych właściwości do tychże obiektów, które następnie zostały zobrazowane w postaci przykładów, takich jak sondy MRI czy cząsteczki teranostyczne. Poniżej kilka pytań wynikających z lektury artykułu:

1. Na czym polega superchaotropowy/nieklasyczny efekt hydroforbowy?
2. Z treści pracy wnioskuję, że metaliczne karborany nie są toksyczne dla zwierząt i ludzi. Nie mniej jednak ciekawi mnie to, czy nie dochodzi choćby do częściowego uwalniania jonów metali i jakie są ich losy?
3. Jakie konkretnie właściwości klastrów boranowych decydują o ich transporcie przez błony komórkowe?
4. Na stronie 15-tej pisze Pan o możliwości zastosowań kłosomerów do inhibicji oddziaływań białko-białko. Bardzo proszę o rozwinięcie tego zastosowania.
5. Jakie sondy bazujące na kłosomerach, a które jeszcze nie zostały opracowane, mogą według Pana mieć szanse na szczególne powodzenie?

Manuskrypt 2: *Journal of Medicinal Chemistry* (2023)

W drugiej pracy, Doktorant dokonał oceny przydatności wszechstronnych soli oksoniowych do tworzenia funkcjonalizowanych pochodnych metalakarboranów. Lista pochodnych opublikowanych w tej pracy obejmuje różne motywy strukturalne, mogące różnić się aktywnością antyproliferacyjną. W sumie jest to 14 pochodnych COSAN i I-COSAN różnicujących się podstawnikami organicznymi tak, aby zbadać zależność między strukturą a aktywnością biologiczną: antybakteryjną i cytotoksycznością. Związki zostały oczyszczone i scharakteryzowane o czym można się przekonać z lektury suplementu, a następnie użyte w badaniach aktywności. W teście wobec *Staphylococcus aureus* Autor zauważył, że:

- związek **3** (pochodna pirydyny) wykazywał wysoką aktywność ($MIC = 3,91 \mu M$) ale również dużą toksyczność wobec komórek ssaczych,
- związki **7** i **8** (pochodne adamantylowa i oktanowa) wykazywały umiarkowaną aktywność ($MIC = 7,81-15,63 \mu M$), lecz brak selektywności ($SI < 1$),
- związek **9** (*n*-heksyl zakończony grupą aminową) wykazywał poprawioną aktywność ($MIC = 3,91 \mu M$) i selektywność ($SI = 4,58$),

-związek **10** (amid lizyny) wykazywał umiarkowaną aktywność ($MIC = 7,81 \mu M$) ale niską toksyczność i najlepszy SI w pierwszej serii ($SI = 6,9$),

-związek **11** (jodowany amid lizyny) wykazywał najwyższą aktywność ($MIC = 0,98 \mu M$), porównywalna z wankomycyną oraz bardzo wysoka selektywność ($SI = 56,5$),

-związek **12** (amid norleucyny) wykazywał wysoką aktywność ($MIC = 1,95 \mu M$) ale większą toksyczność niż **11**,

-związek **13** (amid glicyny) wykazywał bardzo wysoką aktywność ($MIC = 0,98 \mu M$) ale mniejszą selektywność niż **11**, jednakże wciąż dobrą ($SI = 49,4$),

-związki **14** i **15** (jodowane pochodne aminy drugorzędowej i trzeciorzędowej) pozostawały aktywne wobec *S. aureus* ($MIC = 1,9 \mu M$ i $7,8 \mu M$).

Żaden z testowanych związków nie był aktywny wobec *Pseudomonas aeruginosa*. Spośród przetestowanych związków, pochodne amidów aminokwasowych charakteryzowały się najlepszą równowagą między aktywnością przeciwdrobnoustrojową a cytotoksycznością. Jodowanie klatki metalakarboranowej znacząco zwiększyło aktywność przeciwbakteryjną i selektywność. Najbardziej aktywny związek (nr **11**) wykazał bardzo niskie MIC wobec *S. aureus* ($0,98 \mu M$), szybkie działanie bakteriobójcze i niską toksyczność wobec komórek ssaczych oraz erytrocytów, osiągając selektywność porównywalną z wankomycyną. Równowaga hydrofilowo-lipofilowa ($\log P$ i $\log k_w$) okazała się kluczowa dla uzyskania aktywności przeciwbakteryjnej i selektywności. Nadmiernie lipofilowe pochodne miały słabą selektywność i wysoką toksyczność wobec komórek ssaczych. Przeprowadzona analiza mikroskopowa sugeruje mechanizm membranolityczny, polegający na destabilizacji błon komórkowych bakterii. Podsumowując, Doktorant opracował wzorce strukturalne sprzyjające aktywności i selektywności pochodnych metalakarboranowych. Mogą one stanowić podstawę do dalszego rozwoju nowej klasy antybiotyków opartych na klastrach boranowych. Warte pochwały jest interdyscyplinarne podejście do badań od strony chemicznej aż po testy przeżyciowe. Czy Doktorant dokonał syntezy i oczyszczania wszystkich związków opublikowanych w Manuskrypcie 2?

Pytania i komentarze:

1. Dlaczego żaden ze związków nie wykazał aktywności wobec *P. aeruginosa*? Czy planowane są modyfikacje strukturalne ukierunkowane na przenikanie przez podwójną błonę bakterii Gram-ujemnych?
2. Autorzy sugerują mechanizm membranolityczny, ale nie przeprowadzono szczegółowych badań molekularnych. Jakie dodatkowe eksperymenty można by wykonać, aby jednoznacznie potwierdzić ten mechanizm?
3. Jak zachowują się te pochodne w warunkach symulujących środowisko biologiczne (np. w surowicy)?
4. Czy badano ich potencjalną podatność na metabolizm i możliwe produkty degradacji?
5. Na Schemacie 1 w ścieżce syntezy brak jest indeksu 2 przy R – powinno być R₂.

Manuskrypt 3: Pre-print zdeponowany w bazie CheRxiv (2025)

Celem pracy było opracowanie i synteza pierwszych koniugatów insuliny z metalakarboranami (INS-MC) oraz zbadanie ich właściwości fizykochemicznych i biologicznych. Autorzy chcieli sprawdzić, czy koniugacja insuliny z COSAN może prowadzić do cząsteczek o nowych cechach terapeutycznych, m.in. zdolności do wiązania albuminy, samoorganizacji oraz zmienionej aktywności biologicznej. Doktorantowi udało się otrzymać INS-MC zmodyfikowane w pozycji B29 insuliny. To istotny wynik, ponieważ wcześniejsze próby modyfikacji insuliny często kończyły się ograniczoną stabilnością lub niską wydajnością. Uzyskane INS-MC wykazały zdolność do wiązania albuminy oraz samoorganizacji w roztworze, co jest cechą pożądaną w kontekście przedłużenia działania leku i poprawy jego stabilności. Testy antyproliferacyjne i wychwyty glukozy pokazały, że INS-MC zachowują aktywność biologiczną insuliny, choć stopień tej aktywności był zróżnicowany w zależności od zastosowanego analogu. Przeprowadzone badania dostarczają pierwszych dowodów, że połączenie insuliny z metalakarboranami jest możliwe i że takie koniugaty mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych prac nad nową klasą analogów insuliny. Udało się stworzyć nowy typ analogów

insuliny z wykorzystaniem abiotycznego, w pełni syntetycznego szkieletu metalakarbonów. INS-MC zachowały część funkcji biologicznych insuliny, a jednocześnie uzyskały nowe właściwości fizykochemiczne (wiązaną albuminy, samoorganizacja). Badania wskazują, że koniugacja insuliny z metalakarbonami może być nowatorską strategią terapeutyczną, chociaż wymaga dalszych testów *in vivo* i optymalizacji konstrukcji.

Pytania :

1. Testy ograniczono do antyproliferacyjnych i wychwyty glukozy. Czy planowane są również testy aktywności metabolicznej w modelach komórkowych bardziej zbliżonych do naturalnego działania insuliny (np. hepatocyty, adipocyty)?
2. Nie przedstawiono szczegółowych danych o stabilności INS-MC w warunkach fizjologicznych (np. w surowicy). Jak długo koniugaty zachowują integralność i czy nie ulegają hydrolizie/metabolizmowi? Wiązanie albuminy sugeruje potencjalnie wydłużony czas działania, ale brak jest danych farmakokinetycznych. Czy planowane są badania *in vivo* potwierdzające te założenia?
3. Czy autorzy badali toksyczność INS-MC wobec innych linii komórkowych (poza standardowymi testami)? Jakie są przewidywane ryzyka immunogenności związane z wprowadzeniem metalakarbonów?
4. Jakie były wydajności reakcji syntezy INS-MC i czy metoda jest skalowalna na potrzeby dalszych badań (np. w modelach zwierzęcych)?

Podsumowanie

Praca nad klatkami metalokarbonowymi jaką wykonał Pan mgr inż. Jakub Cebula jest godna pochwały, a w połączeniu z jasnym przedstawieniem wyników powoduje, że z przekonaniem rekomenduję dopuszczenie do publicznej obrony pracy doktorskiej. Z całą pewnością rozprawa spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym

i Nauce (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zmianami) prezentując ogólną wiedzę teoretyczną Kandydata oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. W związku z tym, z pełnym przekonaniem stawiam wniosek do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr inż. Jakuba Cebuli do dalszych etapów postępowania doktorskiego. Biorąc pod uwagę zarówno ilość przeprowadzonych badań, jak i ich rangę oraz to, że badania zostały już opublikowane lub są w trakcie publikacji wnoszę o wyróżnienie ocenianej pracy doktorskiej.

Z poważaniem

Artur Krężel

