

dr hab. Marta Ziegler-Borowska, prof. UMK

Toruń, 12.05. 2025 r.

Zespół Chemii Medycznej

Katedra Chemii Biomedycznej i Polimerów

Wydział Chemii UMK

ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń

email: martaz@umk.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Olgi Ciupak

pt. „Analogi strukturalne i koniugaty kwasu foliowego jako nowe inhibitory sulfatazy steroidowej (STS)”

Recenzja została sporządzona w odpowiedzi na pismo Przewodniczącego rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Gdańskiej dr. hab. inż. Marka Tobiszewskiego, prof. uczelni z dnia 13 marca 2025 r. w związku z prowadzeniem przewodu doktorskiego Pani mgr inż. Olgi Ciupak i powierzeniem mi funkcji recenzenta przez Radę Naukową Dyscypliny Nauki Chemiczne PG.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Olgi Ciupak została wykonana na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej pod kierunkiem dr. hab. inż. Sebastiana Demkowicza, prof.PG oraz dr. inż. Mateusza Daśko i dotyczy bardzo ważnej oraz aktualnej tematyki poszukiwania nowych i skutecznych rozwiązań w farmakoterapii onkologicznej.

Pomimo intensywnego rozwoju nauk biomedycznych i farmaceutycznych, leczenie chorób nowotworowych pozostaje wyzwaniem i obszarem wymagającym poszukiwania nowych rozwiązań. Cechą charakterystyczną nowotworów złośliwych jest fakt nadmiernej i bardzo szybkiej proliferacji nieprawidłowych komórek oraz rozprzestrzenianie się zmian w formie przerzutów, które są jedną z głównych przyczyn zgonów pacjentów onkologicznych. W 2022 r. na świecie zdiagnozowano około 20 milionów nowych przypadków raka, a szacuje się, że liczba nowych przypadków wzrośnie do ponad 35 milionów w ciągu najbliższych 25 lat. Różnorodność dostępnych terapii nie wpływa obecnie znacząco na ogólny

wskaźnik śmiertelności, który w dalszym ciągu pozostaje alarmująco wysoki. Trudność terapii wynika z faktu, że klasyfikuje się ponad 200 różnych chorób nowotworowych, a każda z nich charakteryzuje się zmiennością wynikającą z heterogeniczności komórek danego nowotworu.

Sulfataza steroidowa (STS) jest enzymem, transformującym nieaktywne siarczany steroidowe hormonów płciowych do wolnych aktywnych steroidów. Efektem jest kluczowe znaczenie STS w regulacji stężenia estrogenów i androgenów, które są głównie zaangażowane w rozwój wielu hormonozależnych nowotworów: piersi, prostaty i endometrium. W związku z tym enzym ten jest min. targetem w leczeniu raka piersi z dodatnim receptorem estrogenowym. Nadekspresja STS skutkuje zwiększonym poziomem estrogenów w związku z tym zahamowanie jej aktywności jest obiecującym podejściem do obniżenia poziomu tego hormonu pozwalając na kontrolę nad progresją nowotworu. Od 30 lat rozwój inhibitorów STS jest przedmiotem znacznego zainteresowania jednak w dalszym ciągu nie znaleziono związku, który byłby pod względem całej ekonomiki farmakoterapii „idealną” substancją czynną.

Pani mgr inż. Olga Ciupak w ramach swoich badań postanowiła zaprojektować i otrzymać szereg związków stanowiących potencjalne inhibitory STS zawierające w swojej strukturze fragmenty analogiczne dla struktury kwasu foliowego oraz połączenie inhibitora z tym kwasem. Takie podejście jest uzasadnione z powodu zwiększonego zapotrzebowania na foliany przez szybko rozwijające się komórki nowotworowe. Doktorantka jasno określiła proponowane przez siebie rozwiązania w „Celu i zakresie pracy”. Tutaj jednak pojawia się moja uwaga jako recenzenta swojego rodzaju projektu badawczego jakim jest przedstawiona do oceny dysertacja, która dotyczy braku wyraźnie postawionej hipotezy badawczej i uzasadnienia zaplanowanych badań w jej kontekście.

Praca zatytułowana „*Analogi strukturalne i koniugaty kwasu foliowego jako nowe inhibitory sulfatazy steroidowej (STS)*” została napisana w formie monografii a jej struktura jest wielopoziomowa i dopasowana do opracowanego przez Doktorantkę planu badawczego. Część literaturowa monografii obejmuje 5 rozdziałów poprzedzonych Wstępem. Omówione na sześćdziesięciu stronach zagadnienia są bezpośrednio związane z pracą i stanowią logiczne i umiejętne wprowadzenie w budowę i funkcje sulfatazy steroidowej oraz kwasu foliowego i ich powiązanie z aktywnością. Z punktu widzenia zaproponowanych w pracy rozwiązań badawczych najcenniejsze są rozdziały, w których Autorka skupia się na opisie transportu folianów, budowie receptorów kwasu foliowego i obecnym stanie wiedzy w zakresie

teranostycznego wykorzystania pochodnych kwasu foliowego oraz jego koniugatów z klinicznie stosowanymi w leczeniu nowotworów substancjami czynnymi. **Doktorantka w tej części pracy wykazała się dokładnością, skrupulatnością, obszerną wiedzą interdyscyplinarną i zrozumieniem tematyki.** Trudno z poziomu recenzenta poza nielicznymi błędami stylistycznymi i edytorskimi doszukać się w tej części jakichkolwiek uchybień. Biorąc jednak pod uwagę dalszą część pracy oraz techniki jakie wykorzystwała Doktorantka nasuwa się pytanie: dlaczego Doktorantka nie zamieściła w tej części pracy rozdziału poświęconego metodom obliczeniowym stosowanym w projektowaniu substancji czynnych? Moim zdaniem pozwoliłoby to na wyraźne wskazanie korelacji pomiędzy prawidłowo wykonanym modelowaniem a uzyskanymi wynikami eksperymentalnymi. Ponadto, dogłębne zapoznanie się Doktorantki z możliwościami jakie daje chemia obliczeniowa na początku planowanych badań, według mnie, spowodowałoby najprawdopodobniej wybór innych metod niż zastosowane przez Doktorantkę lub nawiązanie w tym obszarze współpracy. Z obowiązku recenzenta chciałbym również zwrócić uwagę na kilka szczegółów, które są bardziej wskazówkami dla Doktorantki na przyszłość:

- na str.57 Doktorantka używa nazwy DOTA-Clik-folate. Warto tam, gdzie jest to możliwe używać języka polskiego, jeżeli jest to język pracy i np. zastąpić *folate* - folianem. W dalszej części pracy pojawia się również „*linker*”, który jest zwyczajnym łącznikiem.
- Na str. 63 pojawia się termin „*kirens*”. Najprawdopodobniej jest to błąd edytorski – poprawne klirens, jednak ze względu na terminologię farmakologii jest ważne, żeby zwrócić na to uwagę.
- Na str. 63 Doktorantka wprowadza pojęcie proleku – bez jego wyjaśnienia, a następnie stwierdza, że (...) „*związanie proleku z wybranym receptorem transportującym go do wnętrza komórki*” (...). Wprowadza to pewnego rodzaju nieścisłość. Z definicji prolekiem nazywamy związek nieaktywny biologicznie lub słabo aktywny biologicznie, który po przemianach metabolicznych *in vivo* ulega biotransformacji do produktu o działaniu farmakologicznym. **Użycie pojęcia receptora w cytowanym zdaniu wymaga wyjaśnienia przez Doktorantkę o co poproszę w trakcie obrony.**

- W Rozdziale 1.6.2.1. Doktorantka opisuje rodzaje wiązań wrażliwych na bodźce, wykorzystywanych w tworzeniu połączeń w prolekach. Według mnie użycie pojęcia „rozszczipienie wiązania” jest niepoprawne. **Poproszę Doktorantkę o wyjaśnienie.**
- Zamiast „*właściwości medyczne*” związku (str. 69) poprawniej jest użyć: właściwości farmakologiczne, a „*farmaceutyki*” (str. 77) warto zastąpić substancjami czynnymi lub aktywnymi.

Najobszerniejszą częścią rozprawy jest opis badań własnych, uzyskanych wyników oraz ich dyskusja poparta częścią eksperymentalną. **Świadczy to** nie tylko o ilości przeprowadzonych badań i syntez, ale przede wszystkim **o umiejętności interpretacji wyników i wyciąganiu wniosków także z napotkanych niepowodzeń.** Oczywiście, nie można pominąć faktu, że **Doktorantka otrzymała ponad 30 pochodnych stosując kilkunastopięć podejścia syntetyczne, co zasługuje na uznanie.** W ten sposób stworzona została biblioteka związków o zoptymalizowanej ścieżce syntezy i wyznaczonych wstępnych parametrach klasyfikujących związki jako potencjalnie aktywne w hamowaniu STS *in vivo*. Chciałabym w tym miejscu zwrócić uwagę na **ogromną dbałość Doktorantki o szczegóły a także na, nie tak oczywistą, poprawność rysowania struktur organicznych z zachowaniem odpowiednich kątów pomiędzy wiązaniami.**

Pani mgr inż. Olga Ciupak postanowiła podejść do rozwiązania problemu badawczego w sposób interdyscyplinarny. Syntezę nowych, zaplanowanych przez siebie (w oparciu o ogólną znajomość tematu) inhibitorów STS postanowiła poprzedzić badaniami *in silico*. W tym celu wykonała dokowanie zaprojektowanych struktur w powszechnie używanym do projektowania dopasowania ligandu do centrum aktywnego oprogramowaniu AutoDock, a następnie zwizualizowała wyniki za pomocą programu BIOVIA. Jest to jak najbardziej poprawne podejście będące praktyką wielu centrów B+R w przemyśle farmaceutycznym. Warunkiem jednak uzyskania w miarę prawdopodobnych wyników jest odpowiednia optymalizacja geometrii liganda, a nie przygotowanie struktury chemicznej 3D jak pisze Doktorantka w części eksperymentalnej (str. 160). Żeby dopasowanie związku w centrum aktywnym uzyskane po dokowaniu było w jakimkolwiek stopniu odpowiadające stanowi faktycznemu należy mieć pewność, że w dokowaniu użyto geometrii odpowiadającej globalnemu minimum energetycznemu. I tutaj zaczynają się przysłowiowe „schody”.

Doktorantka spośród szeregu metod obliczeniowych wybrała metodę mechaniki klasycznej (pole siłowe MM+) dającą możliwość zastosowania niewielu zmiennych oraz

pomijając istotne elementy budowy elektronowej związków. W mechanice klasycznej elektrony są „na stałe związane” z każdym atomem, a zatem nie istotny jest ruch elektronów tylko jąder. Zaletą tej metody jest jej dostępność i niski koszt obliczeniowy, co najprawdopodobniej skłoniło Doktorantkę do optymalizacji geometrii zaprojektowanych ligandów właśnie tą metodą. Doktorantka wykorzystwała licencjonowane oprogramowanie HyperChem, a następnie zoptymalizowane struktury dokowała do centrum aktywnego struktury STS pobranej z bazy PDB. Wyniki dokowania zaprojektowanych przez siebie struktur Doktorantka porównywała z otrzymanym wynikiem dla klinicznie stosowanego Irosustatu jako struktury referencyjnej. Otrzymane, obliczone wartości swobodnej energii wiązania ligand-centrum aktywne były zbliżone dla wszystkich substancji. Należy jednak zwrócić tutaj uwagę, że poprawkę w tej metodzie Autorka przyjmuje jako 2,85 kcal/mol podczas gdy różnice w uzyskanych energiach dla ligandów i Irosustatu mieściły się w przedziale od 1,0 do 3 kcal/mol, a więc w granicach poprawki. W efekcie można przyjąć, że dopasowanie dla wszystkich dokowanych struktur jest jednakowe. Gdyby doktorantka postanowiła jednak zastosować dokładniejsze metody mechaniki kwantowej jak np. DFT (teoria funkcjonału gęstości) można by przede wszystkim założyć, że otrzymane struktury stanowiłyby globalne minima energetyczne. Oczywiście te metody są bardziej kosztowne obliczeniowo, ale dają wyniki bazujące na gęstości elektronowej stanu podstawowego badanego układu. Ponadto wykonując tego typu obliczenia w oparciu o odpowiedni funkcjonal Doktorantka miałaby możliwość dodania odpowiedniego rozpuszczalnika, środowiska czy temperatury jako parametru w optymalizacji. Co więcej – byłaby w stanie otrzymać dla minimum energetycznego wartości pKa oraz logP tak istotne w projektowaniu substancji czynnych.

Powyższe uwagi nie są w żadnym wypadku stwierdzeniem, że wykonane i zinterpretowane przez Doktorantkę symulacje są błędne. Wręcz przeciwnie – **w oparciu o dostępne narzędzia Pani mgr inż. Olga Ciupak wykonała swoją pracę bardzo dobrze!** Moim celem jest skłonienie Doktorantki do lektury i być może do nawiązania współpracy z zespołem, który zajmuje się metodami obliczeniowymi, a w szczególności metodami dynamiki molekularnej.

Następnym i najważniejszym etapem pracy Pani mgr inż. Olgi Ciupak było zaplanowanie i zoptymalizowanie metod syntezy oraz otrzymanie inhibitorów. Doktorantka, jak już wspomniałam, otrzymała ponad 30 struktur. Każdy doświadczony syntetyk doceni

ogrom pracy, który został na tym etapie włożony. Synteza tego typu układów to przede wszystkim „walka” z wydajnością i opłacalnością metody. Doktorantka w sposób wzorowy poradziła sobie z napotykanymi trudnościami otrzymując ostateczne związki o potwierdzonej czystości. Jedyna uwaga jaka nasuwa się do tej części pracy to sposób podawania przez Autorkę wydajności. W syntezach wieloetapowych o wiele lepiej jest podawać wydajność całkowitą (po wszystkich etapach) niż dwóch kluczowych etapów jak to zrobiła Doktorantka w tabelach.

Podane w części eksperymentalnej pracy procedury są jasne i pozwalają na odtworzenie syntezy. Być może dobrym rozwiązaniem byłoby zamieszczenie choćby miniatur opisanych widm NMR – pozwoliłoby to na weryfikację poprawności ich interpretacji. Rozumiem jednak, że Doktorantka zrezygnowała z pokazania zarejestrowanych widm ze względu na i tak znaczną obszerność rozprawy.

Elementem weryfikującym postawione przez Doktorantkę hipotezy był wynik badań zdolności otrzymanych związków do hamowania aktywności enzymu *in vitro*. Ta część badań została wykonana przy współpracy z dr hab. Maciejem Masłykiem z Instytutu Biotechnologii KUL. Pierwszym etapem było określenie pozostałości aktywności STS przy dość wysokim stężeniu inhibitora. Pozwoliło to Doktorantce na wstępne wytypowanie związków najbardziej aktywnych. W kolejnych testach zastosowano już metodę malejących stężeń, a dla najbardziej obiecujących związków wyznaczono IC_{50} przy odniesieniu do Irosustatu. W przypadku wszystkich otrzymanych przez Doktorantkę inhibitorów żaden nie osiągnął wartości IC_{50} zbliżonej lub lepszej niż referencyjny Irosustat. Nie dyskwalifikuje to jednak otrzymanych związków. To co można zauważyć to fakt, że aktywność otrzymanych związków I A-L spada znacząco przy małych stężeniach [1nM] oraz w teście komórkowym. Podobna tendencja w teście komórkowym jest dla związków typu II i III a także VI, VII i związku 158. Może to sugerować trudności w dystrybucji otrzymanych inhibitorów do centrum aktywnego enzymu oraz problemy z transportem przez błonę komórkową. Żeby lepiej zrozumieć mechanizmy działające na obniżenie aktywności otrzymanych związków pomocne mogłoby być wyznaczenie teoretyczne wartości pK_a i $\log P$ (o czym już wspomniałam w recenzji). Ponadto dla związków, dla których można dobrać warunki rozdzielu chromatograficznego można by wyznaczyć $\log P$ eksperymentalnie. O ile nie przyniosłoby to pewnie jednoznacznej odpowiedzi o tyle być może ułatwiłoby Doktorantce interpretację uzyskanych wyników w aspekcie zależności struktura-aktywność.

W projektowaniu substancji aktywnych oraz wyjaśnianiu zależności ich aktywności od struktury warto sięgnąć do podstaw farmakologii. Prawo piątek Lipińskiego, znane również jako reguła pięciu Pfizera lub po prostu reguła pięciu (RO5) to zbiór cech, którymi charakteryzować się powinna substancja czynna, żeby wykazywać korzystne parametry farmakokinetyczne *in vivo*. Oczywiście, reguła ta nie przewiduje, czy dany związek wykazuje aktywność farmakologiczną, ale jest bardzo przydatna w procesie odkrywania leków, szczególnie gdy aktywna struktura wiodąca jest optymalizowana etapami w celu zwiększenia aktywności i selektywności związku, przy jednoczesnym zachowaniu korzystnych właściwości fizykochemicznych. Poza wskazówkami dotyczącymi ilości donorów i akceptorów wiązań wodorowych w strukturze i masy molowej związku reguła pięciu wyraźnie wskazuje na powiązanie aktywności z logP - obliczony współczynnik podziału oktanol/woda (log P) nie powinien przekraczać wartości 5.

Otrzymane wyniki wskazują wyraźnie, że pomimo braku otrzymania inhibitora charakteryzującego się aktywnością lepszą niż klinicznie stosowany Irosustat, koncepcja badań i zaproponowane modyfikacje wniosły bardzo dużą wiedzę w aspekcie strukturalnym oraz metod syntezy potencjalnych inhibitorów STS. **Doktorantka podsumowała umiejętnie otrzymane rezultaty jednak z czysto naukowego i poznawczego punktu widzenia zabrakło moim zdaniem wniosków. Poproszę Panią mgr inż. Olgę Ciupak o ich przedstawienie w trakcie obrony.**

Pani mgr inż. Olgi Ciupak, na dzień złożenia pracy, była współautorką 12 artykułów opublikowanych w czasopiśmie z listy JCR (6 prac opublikowanych w ostatnim roku) i 3 patentów krajowych. Ponadto Doktorantka uczestniczyła w 8 konferencjach naukowych. Pani mgr inż. Olga Ciupak kierowała również grantem Preludium (NCN) oraz była wykonawcą w 4 projektach finansowanych z funduszy zewnętrznych. Uważam, że na tym etapie kariery jest to wyróżniający dorobek.

Podsumowując, bardzo wysoko oceniam wybór ambitnego i aktualnego tematu badawczego. Uważam, że postawiony przez Doktorantkę cel pracy został zrealizowany. Równie wysoko jak wybór tematu oceniam dokładność, pracowitość oraz biegłość Doktorantki nie tylko w metodach syntezy i charakterystyki związków, ale przede wszystkim w łączeniu

faktów naukowych. Świadczy to o ugruntowanej wiedzy Doktorantki, umiejętności jej przełożenia na praktykę oraz dojrzałości naukowej. Na uwagę zasługuje również fakt, że Pani mgr inż. nie boi się sięgać po nowe narzędzia jak np. metody obliczeniowe łamiąc jednocześnie stereotyp podziału pomiędzy eksperymentem a teorią.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Olgi Ciupak spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim w myśl obowiązującej Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz.U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.) i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Gdańskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Olgi Ciupak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie w oparciu o kryteria ustalone przez Radę Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Gdańskiej wnioskuję do w/w Rady o wyróżnienie recenzowanej rozprawy. Podstawą do wyróżnienia jest:

- **Opracowanie nowego rozwiązania o charakterze innowacyjnym i badawczo-rozwojowym.**

Doktorantka zaprojektowała, zoptymalizowała oraz zrealizowała strategię syntezy nowych inhibitorów sulfatazy steroidowej (STS), wprowadzając koniugaty kwasu foliowego jako elementy strukturalne. Opracowane przez nią związki nie były dotąd opisywane w literaturze naukowej. Wybór struktury inhibitorów został oparty na dogłębnej znajomości mechanizmów działania STS oraz selektywnego transportu folianów przez błony komórkowe co świadczy o interdyscyplinarnym podejściu z pogranicza chemii medycznej, chemii supramolekularnej i farmakologii.

- **Precyzyjnie opisany potencjał aplikacyjny.**

Badania zostały uzupełnione o testy *in vitro* oraz wyniki modelowania molekularnego (dokowanie), co pozwoliło na identyfikację struktur wiodących dla spodziewanej aktywności biologicznej. Utworzona biblioteka ponad 30-stu w pełni scharakteryzowanych związków może stanowić punkt wyjścia do dalszych prac nad efektywnymi inhibitorami STS — także w ujęciu komercyjnym lub w przyszłości klinicznym. Proponowane rozwiązanie może zostać rozwinięte z wykorzystaniem



narzędzi Machine Learning w celu przewidywania aktywności kolejnych generacji inhibitorów.

- **Wysoki poziom naukowy pracy.**

Rozprawa została przygotowana z dużą precyzją w doborze metod, analizy wyników oraz krytycznej interpretacji danych. Szczególnie należy podkreślić efektywną optymalizację warunków syntezy, co jest nieodzownym elementem przy wdrażaniu nowych substancji czynnych.

Marta Ziegler-Borowska

Dr hab. Marta Ziegler-Borowska, prof. UMK