



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

**Recenzja**

**rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Marzeny Mazur  
pt. „Inhibitory chitynaz jako potencjalne leki w chorobach o podłożu  
zapalnym i włóknieniowym” przedłożonej Radzie Nauk Medycznych  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi celem uzyskania stopnia naukowego  
doktora nauk farmaceutycznych**

W obliczu pandemii COVID-19 przemysł farmaceutyczny stanął przed kolejną szansą opracowania przełomowych technologii lekowych. Rozmowy na temat ratujących życie szczepionek, przeciwciał monoklonalnych i leków małocząsteczkowych stały się częścią codziennego życia, nieustannie przypominając o konieczności prowadzenia badań w sposób zrównoważony, w oparciu o przesłanki epidemiologów i specjalistów zajmujących się chorobami spoza „światowego trendu”, często dotyczącymi mieszkańców krajów mniej rozwiniętych. Pandemia ukazała, jak szybko i skutecznie przemysł, środowisko akademickie i organy regulacyjne mogą mobilizować się, aby zaradzić kryzysom zdrowia publicznego. Wirusowa choroba układu oddechowego nadal niszczy życie wielu osobom i wpływa na gospodarkę światową, dlatego niezależnie od rozwoju leków przeciwwirusowych ważne jest opracowywanie terapii ukierunkowanych na nowe cele molekularne zaangażowane w kontrolę procesów zapalnych.

W powyższe trendy doskonale wpisuje się przedstawiona do recenzji rozprawa mgr inż. Marzeny Mazur. Praca ta stanowi owoc pozytywnej synergii między naukowcami z Uniwersytetu Medycznego w Łodzi oraz firmy farmaceutycznej OncoArendi Therapeutics S.A. (aktualnie Molecure S.A.), którzy połączyli siły celem rozwiązania niezwykle interesującego i aktualnego problemu naukowego. Zaprezentowane wyniki nawiązują do tematyki badań prof. Jakuba Fichny, związanej z badaniem zapalnych podstaw chorób przewlekłych oraz zainteresowań naukowych dr. Jacka Olczaka, promotora pomocniczego, dotyczących projektowania i syntezy nowych związków o aktywności biologicznej.

Licząca 194 strony rozprawa składa się z i) 31 stronicowego komentarza do spójnego tematycznie cyklu pięciu publikacji, zawierającego streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, wstęp, cel pracy, opis badań, podsumowanie oraz 38 pozycji aktualnego piśmiennictwa, ii) zgód wydanych przez lokalne komisje etyczne ds. doświadczeń na zwierzętach oraz iii) oświadczeń współautorów, określających wkład w powstanie artykułów, stanowiących podstawę rozprawy. Całość dopełniają kopie publikacji P1-P5, stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej, które ukazały się drukiem w latach 2018–2022 w uznanych czasopismach z listy JCR. Cztery z tych publikacji to oryginalne prace eksperymentalne w wiodących wydawnictwach z obszaru chemii medycznej i biologii molekularnej, tj. *Journal of Medicinal Chemistry* (2 publikacje, IF = 6,054), *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (1 publikacja, IF = 2,44) i *International Journal of Molecular Sciences* (2 publikacje, IF = 6,205). Łączny współczynnik oddziaływania prac, będących podstawą rozprawy wynosi 26,985, co odpowiada liczbie 750 punktów MNiE.

Katedra i Zakład Chemii Organicznej

PL 30-688 Kraków, ul. Medyczna 9, tel. +48 12 620 55 00

[www.farmacja.cm.uj.edu.pl](http://www.farmacja.cm.uj.edu.pl)

W pracy przeglądowej P1, otwierającej cykl oraz we wszystkich pracach doświadczalnych P2-P5, Doktorantka jest pierwszym autorem. Ponadto w oparciu o analizę oświadczeń Doktorantki oraz oświadczeń współautorów stwierdzam, że udział mgr inż. M. Mazur w powstanie przedłożonej rozprawy jest wiodący. Zasluguje to na szczególne podkreślenie w świetle wieloautorskiego i wieloosrodkowego charakteru prac. Doktorantka jest pomysłodawczynią kilku serii związków, opracowała ścieżki syntezy i zrealizowała badania nad syntezą zaprojektowanych związków, opracowała koncepcję eksperymentów oceniających efekt przeciwwzpalny związków w modelu zapalenia jelita, była koordynatorem i redaktorem prac.

Jednym z warunków sukcesu w odkrywaniu nowych leków jest racjonalne typowanie wysokiej jakości kandydatów do rozwoju klinicznego. Wymagana na tym etapie jest rozległa wiedza, dotycząca projektowania nowych związków w oparciu o wymogi farmakoforowe, optymalizacji parametrów lekopodobieństwa, wydajnych metod syntezy, losów leku w organizmie oraz zrozumienie procesów leżących u podstaw rozwoju procesu chorobowego. Z tak szeroką problematyką mierzyła się Doktorantka realizując prace badawcze nad swoją dysertacją.

We wprowadzeniu Doktorantka podsumowała aktualny stan wiedzy na temat dwóch enzymów hydrolizujących chitynę, tj. kwaśnej chitynazy ssaczej (AMCase) i chitotriozydazy (CHIT1), wskazując je jako potencjalne cele dla rozwoju skutecznych terapii chorób o podłożu zapalnym (astmy, chorób zapalnych jelit) oraz włóknieniowym (idiopatycznego włóknienia płuc, stłuszczeniowego zapalenia wątroby). Zwróciła ponadto uwagę na rolę chitynaz jako potencjalnych markerów rozwoju procesu chorobowego. Równie ważnym elementem wprowadzenia w obszar prac eksperymentalnych była prezentacja opisanych w literaturze inhibitorów chitynaz. W zgrabnie napisanym studium (publikacja P1), Autorka przekazała zasób informacji niezbędnych dla wprowadzenia czytelnika w obszar swojej aktywności badawczej.

Cel swoich badań Doktorantka zdefiniowała jako zaprojektowanie i synteza nowych selektywnych dualnych inhibitorów chitynaz typu AMCase i typu CHIT1, o korzystnych właściwościach farmakokinetycznych oraz określenie wpływu wytypowanych związków na przebieg indukowanego stanu chorobowego w zwierzęcych modelach chorób o podłożu zapalnym i zwłóknieniowym.

Jako punkt wyjścia w badaniach posłużyły Doktorantce wyniki badań krystalograficznych związku zidentyfikowanego w badaniach skrinigowych realizowanych przez firmę Wyeth. Analiza sposobu oddziaływania związku Wyeth1 w kieszeni katalitycznej AMCase, stała się inspiracją dla mgr M. Mazur do zaprojektowania pochodnych 2,5-diamino-1,2,4-triazolu, modyfikowanych w położeniu 5 różnie podstawionymi fragmentami o charakterze amin alicyklicznych z atomem azotu zlokalizowanym endo- lub egzocyklicznie (piperazyna vs. 4-aminopiperydyna) lub fragmentami o budowie amidowej, sulfonamidowej i mocznikowej. Kolejno niezwykle racjonalnie zaplanowane modyfikacje strukturalne, miały na celu wypełnienie kieszeni hydrofobowej poprzez steryczne rozbudowanie podstawników na atomie azotu 4-aminopiperydyny. Analiza zależności między strukturą a aktywnością biologiczną oraz ocena właściwości farmakokinetycznych, pozwoliły wytypować związek 7f (OAT-177), o cechach inhibitora wobec mysiej chitynazy AMCase ( $IC_{50} = 18,8$  nM) i zadowalającej selektywności wobec mysiej chitynazy CHIT1 ( $IC_{50} = 2955$  nM). Związek 7f, podany dożołądkowo w dawce 30 mg/kg, redukował liczbę napływowych komórek zapalnych w płucach, redukował poziom przeciwciał IgE w osoczu, w mysim modelu ostrego zapalenia dróg oddechowych, wywołanym podaniem ekstraktu z roztoczy kurzu domowego. Związek 7f (OAT-177) wykazał równocześnie cechy inhibitora transportera dopaminy (DAT) oraz znaczące powinowactwo do kanału potasowego *hERG*.

Związek 7f (OAT-177) posłużył Doktorantce, jako związek narzędziowy w ustaleniu zaangażowania chitynazy AMCCase w zmniejszeniu stanu zapalnego, w modelu nieswoistych chorób zapalnych jelit, wywołanych podaniem dekstranu siarczanu sodu (publikacja P-3). Ocenę skuteczności inhibitora prowadzono na podstawie analizy markerów stanu zapalnego jelita oraz analizę ekspresji cytokin prozapalnych TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ . Te pionierskie badania wniosły istotny element nowości naukowej w obszarze poszukiwania nowych celów biologicznych dla rozwoju terapii chorób jelit o podłożu zapalnym.

Drugi obszar tematyczny dotyczył zaprojektowania i syntezy selektywnego inhibitora mysiej chitynazy CHIT1 jako substancji mogącej znaleźć zastosowanie w terapii idiopatycznego zapalenia płuc (publikacja P-4). Przesłanką do podjęcia tych badań były wyniki wskazujące na dominującą rolę chitynazy CHIT1 w rozwoju stanu zapalnego i procesów włóknieniowych u ludzi. Doktorantka ponownie, wykorzystując doskonałą intuicję chemika medycznego i syntetyka zaprojektowała i zsyntezowała serie analogów 2,5-diamino-1,2,4-triazolu, modyfikując cząsteczki w obszarze aminy alicyklicznej. Zoptymalizowany w toku badań związek 11 (OAT-2068), pierwszy selektywny inhibitor mysiej chitynazy CHIT1 ( $IC_{50} = 29$  nM) charakteryzuje się 143-krotną selektywnością wobec chitynazy AMCCase. Związek ten wykazał aktywność przeciwwłóknieniową w mysim modelu włóknienia płuc wywołanym podaniem bleomycyny. Korzystne właściwości farmakokinetyczne preparatu OAT-2068 czynią go dobrym związkiem narzędziowym do badań nad funkcją mysiej chitynazy CHIT1.

Opracowanie inhibitora o równie zadowalającej aktywności i profilu selektywności wobec ludzkiego enzymu CHIT1 okazało się większym wyzwaniem. Jednak na szczególne podkreślenie zasługuje fakt znajomości złożonych przez Doktorantkę zagadnień zmienności gatunkowej i ewentualnych problemów w translacji wyników, uzyskanych w modelach zwierzęcych, na ludzi.

Trzeci wątek tematyczny podjęty przez Doktorantkę dotyczył opracowania podwójnych inhibitorów chitynaz AMCCase/CHIT1. Projektowanie tej serii związków wspomagano dostępnymi wynikami badań krystalograficznych selektywnych inhibitorów chitynaz oraz metodami modelowania molekularnego. Prace te koncentrowały się m.in. na optymalizacji parametrów lekopodobieństwa, celem mitygacji oddziaływania z kanałem potasowym hERG oraz usztywnieniu struktury w obszarze alkiloarylowym cząsteczki przez domknięcie fragmentu alkiloaminowego w pierścień morfoliny. Opracowany przez autorkę związek 30 (OAT-870), wykazał cechy podwójnego inhibitora mysich i ludzkich chitynaz AMCCase/CHIT1 ( $IC_{50}$  wobec mysiej AMCCase i mysiej CHIT1 wynoszą odpowiednio 24 i 47 nM). Związek 30 podany myszom doustnie w dawce 50 mg/kg ograniczał objawy astmy (obniżając całkowitą liczbę leukocytów CD45-dodatnich o 37%) w modelu wywołanym podaniem roztocza kurzu domowego. W mojej ocenie było to najważniejszym wynikiem zaprezentowanym w pracy. Pomimo niskiej dystrybucji do ośrodkowego układu nerwowego, ryzyko związane z możliwością hamowania DAT wykluczyło ten związek z rozwoju klinicznego.

Na szczególną uwagę i podkreślenie zasługuje ogromna liczba eksperymentów wykonanych przez Doktorantkę. W toku prac zaprojektowała i zsyntezowała ponad 250 oryginalnych związków. Uznanie budzi festiwal podejść syntetycznych zastosowanych przez autorkę w celu otrzymania zaprojektowanych połączeń. Uzyskane związki zostały oczyszczone przy zastosowaniu technik chromatograficznych oraz scharakteryzowane strukturalnie z wykorzystaniem metod analizy spektralnej, tj. analiz  $^1H$  NMR, MS, HRMS oraz w części przypadków w oparciu o wyniki analizy elementarnej. Opis metodyki badań biologicznych jest rzetelny i dokładny. Wskazuje to na świadomy wybór wiarygodnych i dostępnych technik badawczych.

Zrealizowane badania biologiczne, farmakokinetyczne i farmakologiczne potwierdziły poprawność założeń, wskazujących na możliwość opracowania w grupie 2,5-diaminowych pochodnych 1,2,4-triazolu związków o właściwościach selektywnych inhibitorów mysich chitynaz AMC<sub>ase</sub> i CHIT1 oraz podwójnych inhibitorów mysich i ludzkich chitynaz AMC<sub>ase</sub> i CHIT1. Optymalizacja parametrów fizykochemicznych cząsteczek, pozwoliła na opracowanie związków narzędziowych, które posłużyły do określenia roli chitynaz w chorobach o podłożu zapalnym i włóknieniowym.

Realizacja tak ambitnego zadania była możliwa dzięki wsparciu merytorycznemu doświadczonych badaczy z ośrodków krajowych i zagranicznych oraz finansowaniu z działalności statutowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi i projektów o charakterze wdrożeniowym z Narodowego Centrum Badań i Rozwoju.

Pracę doktorską mgr inż. Marzeny Mazur przeczytałem z bardzo dużym zainteresowaniem. Na podkreślenie zasługuje fakt, że wszystkie rozdziały, dotyczące wątków badawczych zaopatrzone zostały krótkim wprowadzeniem, zawierającym uzasadnienie dla realizowanych badań, z uwzględnieniem niezaspokojonych potrzeb medycznych. Jest to dowód na niezwykle racjonalne planowanie badań i ukierunkowanie wyników na możliwość ich wykorzystania w praktyce. Pomimo dużej staranności z jaką opracowano rozprawę, Doktorantka nie ustrzegła się błędów edytorskich. Podczas opracowania Tabeli 3, błędnie przypisano stałe inhibicji dla związków wobec enzymów mAMC<sub>ase</sub> i mCHIT1. Cennym byłoby uzupełnić wyniki zaprezentowane w Tabelach 1-3 przez wskazanie liczby powtórzeń „n” oraz wyjaśnienie, czy przedstawione dane uwzględniają wartości SEM czy SD? W wykazie skrótów znajduje się nazwa czynnika aktywującego HATU, jednak w tekście rozprawy nie dostrzegam odwołania do reakcji amidowania z zastosowaniem tego odczynnika. Numeracja związków nie jest do końca jednoznaczna. W opisie Rysunku 6, punkt b, zastosowano skrót, gdyż zaprezentowany proces prowadzono dwuetapowo. Szkoda, że na schemacie zaprezentowanym na Rysunku 3 nie podano wydajności poszczególnych procesów a-e. Dostrzeżono nieliczne błędy literowe (np. „skringu”, a nie „screeningu”) oraz kilka określeń stanowiących żargon laboratoryjny, np. „przy użyciu trietyloaminy przeprowadzono cyklizację do ketopiperazyny”, „grupę aminową zabezpieczono Boc”, „Tabela 3. SAR piperazyny”. Na stronie 14, wiersz 14 zamiast „4-Br-fenetylu”, powinno być „4-Br-fenoksyetylu”.

Poniżej przedstawiam kilka uwag lub problemów wymagających wyjaśnienia:

- 1) czy w pracach nad projektowaniem planowano zastąpić ugrupowanie 2,5-diamino-1,2,4-triazolu jego bioizosterami? Jakie ugrupowania można rozważać jako bioizostery układu 2,5-diamino-1,2,4-triazolu?
- 2) związek 7g, zawierający atom bromu (Tabela 2), wykazuje wyższą aktywność niż jego bezpośredni analog z atomem chloru (związek 7f); czy podjęto próbę wyjaśniania tej obserwacji?
- 3) czy wytypowane związki 7f i 30 wykazują cechy inhibitorów kompetycyjnych?
- 4) częstym problemem w procesie odkrywania nowych leków jest translacja wyników badań biologicznych *in vitro* na eksperymenty *in vivo*; jakie parametry, poza IC<sub>50</sub>, znajdują zastosowanie w ocenie oddziaływania związków chemicznych z celem biologicznym w celu poprawy korelacji aktywności *in vitro/in vivo*?
- 5) jakie metody analityczne zastosowano do ustalenia postaci związków otrzymanych po oczyszczaniu z zastosowaniem preparatywnego RP-HPLC? Jakie postaci związków poddano ocenie w badaniach farmakokinetycznych i farmakologicznych?
- 6) celem realizacji badań farmakokinetycznych u myszy i u szczurów związek 30 (OAT-870) przygotowano w innej formulacji (publikacja P-5); jaka była tego przyczyna?

Podsumowując, uważam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska dowodzi sukcesu badawczego i publikacyjnego. Praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim przez ustawę o stopniach i tytułach naukowych, w związku z czym zwracam się do Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr inż. Marzeny Mazur do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Biorąc pod uwagę interdyscyplinarny charakter realizowanych badań, łączący projektowanie związków, preparatykę organiczną, badania biologiczne i farmakologiczne oraz merytoryczną wartość pracy, uważam, że warto wyróżnić przygotowaną przez Doktorantkę rozprawę. Wniosek o wyróżnienie uzasadnia wkład Doktorantki w chemię pochodnych 3,5-diamino-1,2,4-triazolu oraz badania nad poszukiwaniem nowych inhibitorów chitynaz o spodziewanej aktywności w chorobach o podłożu zapalnym i włóknieniowym. Dorobek mgr inż. Marzeny Mazur, w szczególności aplikacyjny charakter badań, potwierdzony współautorstwem międzynarodowego patentu, 5 publikacji w wiodących wydawnictwach w obszarze chemii medycznej i biologii molekularnej, o łącznym współczynniku oddziaływania 26,985, a ponadto opracowanie kandydata na lek (związek OATD-01) do terapii idiopatycznego włóknienia płuc, wykracza poza poziom wymagany na etapie doktoratu. Zrealizowane badania wpisują się w aktualne trendy realizacji prac o charakterze wdrożeniowym, w ścisłej współpracy uniwersytetów i firm farmaceutycznych, celem opracowania skutecznych terapii wobec chorób cywilizacyjnych.

Kraków, 07.06.2022 r.

  
Katedra i Zakład  
Chemii Organicznej UJ CM  
prof. dr hab. n. farm. Paweł Zajdel  
Kierownik

Prof. dr hab. n. farm. Paweł Zajdel  
Kierownik Katedry i Zakładu Chemii Organicznej  
Wydział Farmaceutyczny  
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum  
ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków  
✉ : [pawel.zajdel@uj.edu.pl](mailto:pawel.zajdel@uj.edu.pl)