



Kraków 24.05.2022

**Prof. dr hab. n. med. Joanna Mika
Zakład Farmakologii Bólu
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk**

**OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ
mgr inż. Marzena Mazur
zatytułowanej
„Inhibitory chitynaz jako potencjalne leki
w chorobach o podłożu zapalnym i włóknieniowym”**

Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr inż. Marzeny Mazur została wykonana pod kierunkiem Promotora prof. dr hab. n. med. Jakuba Fichny z Zakładu Biochemii, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi oraz Promotora pomocniczego dr inż. Jacka Olczaka z OncoArendi Therapeutics S.A. Tematyka jest bardzo interesująca, rola chitynaz u ssaków wymaga wnikliwych badań, bowiem ich podwyższony poziom obserwuje się u pacjentów z chorobami, których podłożem jest stan zapalny (astma, choroby zapalne jelit), a także włóknienie tkanek (idiopatyczne włóknienie płuc, sarkoidoza, stłuszczeniowe zapalenie wątroby). Obecnie wiadomo już, że organizm ludzki wytwarza dwa enzymy hydrolizujące chitynę: kwaśną chitynazę ssaczą (AMCase) oraz chitotriozydazę (CHIT1). Nadal pozostaje do wyjaśnienia czy te chitynazy mogą stanowić cel terapeutyczny w leczeniu powyższych chorób, które wciąż są wyzwaniem dla współczesnej medycyny. W świetle powyższych danych, tematyka przedstawionej do oceny pracy doktorskiej mgr inż. Marzeny Mazur wydaje się bardzo aktualna.

Celem rozprawy było zarówno zaprojektowanie jak i synteza małowcząsteczkowych inhibitorów kwaśnej chitynazy ssaczej oraz chitotriozydazy o wysokiej aktywności oraz odpowiednim profilu farmakokinetycznym, a następnie zbadanie ich wpływu na przebieg indukowanego stanu chorobowego w modelach chorób zapalnych i włóknieniowych.

Pragnę podkreślić że, cykl prac stanowiący podstawę postępowania doktorskiego, składa się z 5 publikacji (1 przeglądowej oraz 4 oryginalnych), we wszystkich Doktorantka jest pierwszym autorem, a struktury tych nowych inhibitorów chitynaz są już chronione przez 3 patenty. Mgr inż. Marzena Mazur przedstawiła oświadczenia współautorów świadczące o Jej znaczącym udziale w przygotowaniu załączonych publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej. Ponadto, wszystkie eksperymenty zostały wykonane po uzyskaniu licznych zgód Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach (65/2014; 73/2014; 11/2015; 213/2016; 003/2016; 452/2017; 2/ŁB123/2019; 17/ŁB132/2019), co wymagało niewątpliwie bardzo dużego nakładu pracy.

Przedstawiona do oceny rozprawa zawiera 265 stron, praca składa się z typowych rozdziałów takich jak: Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wykaz skrótów, Wprowadzenie, Cel i zakres pracy, Spis publikacji stanowiących podstawę pracy doktorskiej, Opis badań, Podsumowanie, Finansowanie, Bibliografia. Warto podkreślić, że uzyskane wyniki powstały przy wsparciu finansowym w ramach realizacji 4 projektów badawczych (POIR.01.01.01-00-0551/15; POIR.01.01.01-00-0168/15; POIG.0104.00-14-374/13; POIR.01.01.01-00-0552/16) oraz działalności statutowej Zakładu Biochemii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. W pracy umieszczono również skany zgód Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach oraz oświadczeń współautorów, a ponadto pdfy publikacji stanowiących podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej. Poprawny styl, logiczny układ pracy, prawidłowe cytowanie literatury, a także prezentacja i dyskusja wyników wskazuje na dobrze opanowaną przez Doktorantkę umiejętność pracy naukowej.

We Wprowadzeniu Doktorantka pokrótce zapoznaje czytelnika z tematyką pracy, natomiast szczegółowy i bardzo rzetelny opis roli chitynaz w chorobach zapalnych i włóknieniowych znajduje się w Jej pracy przeglądowej „*Chitinases and Chitinase-Like Proteins as Therapeutic Targets in Inflammatory Diseases, with a Special Focus on Inflammatory Bowel Diseases*” opublikowanej w 2021 roku w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* (IF=5,924), wchodzącej w skład cyklu publikacji stanowiącego podstawę pracy doktorskiej. W kolejnym rozdziale Doktorantka przedstawiła wnikliwie założenia i cele pracy, a następnie spis publikacji stanowiących podstawę pracy doktorskiej, co istotne we wszystkich jest ona pierwszym autorem. Ukazały się one w renomowanych czasopismach - „*Targeting acidic mammalian chitinase is effective in animal model of asthma*” - **Journal of Medicinal Chemistry** w 2018 (IF=6,054); „*Discovery of selective, orally bioavailable inhibitor of mouse chitotriosidase*” - **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 2018 (IF=2,44); „*Development of dual chitinase inhibitors as potential new treatment for respiratory system diseases*” - **Journal of Medicinal Chemistry** 2019 (IF=6,205); „*The anti-inflammatory effect of acidic mammalian chitinase inhibitor OAT-177*

in DSS-induced mouse model of colitis” - **International Journal of Molecular Sciences** 2022 (IF=5,924). Sumaryczny Impact Factor z tych wyżej wymienionych prac wynosi **26,547**.

W kolejnym rozdziale Doktorantka sumiennie i logicznie omawia pokrótce, strategię badawczą oraz dyskutuje opublikowane w tych pracach rezultaty. W pierwszej pracy oryginalnej opublikowanej w 2018 roku Doktorantka zaprezentowała badania, które zakończyły się stworzeniem selektywnego inhibitora kwaśnej chitynazy ssaczej OAT-177. Co ważne podjęła się tego zadania ponieważ pomimo ogromnego postępu jaki dokonał się w leczeniu astmy nadal istnieje potrzeba poszukiwania małowcząsteczkowych leków opartych o nowe cele molekularne. Doktorantka wybrała do swoich badań kwaśną chitynazę ssaczą, której zwiększone wytwarzanie stwierdzono w ostatnich latach w płucach osób chorych na astmę. Badania przeprowadzone na myszach wskazywały, że jej neutralizacja przeciwciałem monoklonalnym, a także nieselektywnym inhibitorem allosamidyną powoduje korzystne efekty w modelach zapalnych astmy wywołanych zarówno roztoczem kurzu domowego jak i albuminą jaja kurzego. W świetle danych literaturowych Doktorantka słusznie uznała, że kwaśna chitynaza ssacza może być nowym celem molekularnym w chorobach zapalnych płuc i rozpoczęła prace nad stworzeniem małowcząsteczkowego selektywnego jej inhibitora. Z listy istniejących inhibitorów chitynaz, do optymalizacji wybrała małowcząsteczkowy inhibitor, związek Wyeth 1. Szereg przeprowadzonych analiz wykazał, że w części centralnej cząsteczki odległość zasadowego atomu azotu piperazyny do reszty kwasu asparaginowego 213 jest nieoptymalna i wynosi 3,7 Å. Doktorantka, przesuając centralny zasadowy atom azotu z pierścienia piperazyny do 4-aminopiperidyny stworzyła związek **7a** o znacząco lepszej aktywności wobec kwaśnej chitynazy ssaczej w porównaniu ze związkiem Wyeth 1. Następnie we współpracy z grupą dr A. Podjarnego z Uniwersytetu w Strasburgu podjęła próbę krystalizacji inhibitora **7a**. Stworzona struktura krystalograficzna wykazała, że odległość pomiędzy kwasem kwas asparaginowym 213 i azotem wynosi 2,8 Å. Ta wprowadzona optymalizacja zaowocowała ponad 15-krotną poprawą aktywności w ludzkim enzymie i 20-krotną w mysim. Do dalszych badań wytypowała 5 związków (**7a**, **7f**, **7g**, **7j** i **15a**) i określiła ich stabilność metaboliczną w mysich mikrosomach wątrobowych oraz profil farmakokinetyczny. Wykazała, że 3 związki (**7f**, **7g** i **15a**) charakteryzują się dobrą biodostępnością i niskim klirensem. Optymalnym pod względem aktywności i parametrów farmakokinetycznych okazał się związek **7g**, który jednak wykazywał fototoksyczność. Ostatecznie do badań w modelach zwierzęcych wybrała inhibitor **7f**, który otrzymał nazwę **OAT-177**. Co warto podkreślić, jego działanie przeciwzapalne potwierdziła w badaniach *in vivo* w mysim modelu ostrego zapalenia dróg oddechowych, który uzyskała po podaniu ekstraktu z roztoczy kurzu domowego. Analiza dowiodła, że **OAT-177** zmniejsza napływ komórek zapalnych do płuc, a szczególnie eozynofili, a także obniża stężenia TGFβ1 w

popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych oraz poziom IgE w osoczu. Co ważne, związek ten nie wykazywał genotoksyczności w teście fluktuacyjnym Ames, a także charakteryzował się wysoką aktywnością *in vitro* wobec ludzkiej i mysiej kwaśnej chitynazy ssaczej, a także dobrym profilem farmakokinetycznym u myszy. Niemniej jednak, ze względu na zidentyfikowane w badaniach *in vitro* oddziaływania z istotnymi z punktu bezpieczeństwa farmakologicznego celami molekularnymi związek **OAT-177** został wykluczony z dalszego rozwoju przedklinicznego, chociaż nadal może służyć jako substancja narzędziowa w modelach zwierzęcych różnych chorób. I tak w kolejnych eksperymentach Doktorantka wykazała przeciwpalną skuteczność **OAT-177** w mysim modelu nieswoistych chorób zapalnych jelit wywołanym podaniem dekstranu siarczanu sodu. Rezultaty tych badań opublikowała w 2022 w pracy oryginalnej, w której podkreśliła, że **OAT-177** wykazuje bardzo wąski indeks terapeutyczny. Ponadto, Doktorantka wskazała, że leczenie nieswoistych chorób zapalnych jelit byłoby bardziej efektywne po zastosowaniu inhibitorów celujących w kwaśną chitynazę ssaczą i chitotriozydazę.

Warto podkreślić, że Doktorantka konsekwentnie podjęła się próby stworzenia zarówno selektywnego inhibitora mysiej chitotriozydazy, jak i podwójnego inhibitora kwaśnej chitynazy ssaczej i chitotriozydazy. Było to możliwe ponieważ w swoich wcześniejszych eksperymentach wytypowała już kilka związków o większej aktywności wobec chitotriozydazy aniżeli kwaśnej chitynazy ssaczej. I tak związek oznaczony jako wiodący nr 1 przedstawiony na Rys. 4 pracy doktorskiej został wybrany przez Doktorantkę do dalszych badań ze względu na możliwość modyfikacji pierścienia piperazyny w celu dalszej optymalizacji. Liczne zsyntetyzowane związki zawierające różne podstawniki R1 i R2 zostały przebadane przez Doktorantkę w testach enzymatycznych w celu potwierdzenia aktywności i selektywności względem chitotriozydazy, a uzyskane wyniki przedstawiła w rozbudowanej Tabeli 3. Ostatecznie Doktorantka wybrała analog nr 9 czyli **OAT-2068**, ponieważ charakteryzuje się on wysoką aktywnością wobec mysiej chitotriozydazy i 143-krotną selektywnością względem mysiej kwaśnej chitynazy ssaczej, co w połączeniu z dobrym profilem farmakokinetycznym uczyniło go bardzo dobrym narzędziem farmakologicznym. Niestety dalsze przeprowadzone przez mgr inż. Marzenę Mazur eksperymenty dowiodły, że aktywność **OAT-2068** wobec ludzkiej chitotriozydazy jest niewystarczająca. Natomiast, co istotne Doktorantka dowiodła że **OAT-2068** w mysim modelu włóknienia płuc wywołanym bleomycyną hamuje aktywność chitynolityczną w około 40-50% w osoczu, a analiza histopatologiczna skrawków płuca przy użyciu skali punktowej Ashcrofta potwierdziła jego skuteczność przeciwwłóknieniową. Co warto podkreślić, stworzony przez Doktorantkę związek **OAT-2068** jest pierwszym selektywnym inhibitorem mysiej chitotriozydazy o

dobrym profilem farmakokinetycznym i dlatego może on służyć do zbadania roli tego enzymu w zwierzęcych modelach różnorodnych chorób o podłożu zapalnym.

W dalszych badaniach mając na uwadze trudności związane z opracowaniem selektywnego inhibitora chitotriozydazy aktywnego zarówno w mysim, jak i w ludzkim enzymie, Doktorantka postanowiła stworzyć związek aktywny zarówno wobec mysiej kwaśnej chitynazy ssaczkiej jak i chitotriozydazy. Mgr inż. Marzena Mazur w swojej pracy podkreśliła, że w eksperymentach zwracała szczególną uwagę na zminimalizowanie kardiotoksyczności, związanej z hamowaniem kanału potasowego hERG oraz wpływie na transportery monoaminowe, w tym dopaminowy i serotoninowy - co zostało stwierdzone w przypadku **OAT-177**. Doktorantka projektowanie podwójnych inhibitorów chitynazy rozpoczęła od zmiany hydrofobowej grupy izobutylowej w związku **OAT-177** na małe polarne grupy. Podejście to miało na celu zoptymalizowanie aktywności wobec białek targetowych oraz zmniejszenie hamowania kanału hERG, jednakże nie doprowadziło to do uzyskania inhibitorów o założonym profilu. Doktorantka jednak się nie poddała, dogłębna analiza struktur krystalograficznych oraz modelowanie molekularne pokazało, że korzystne może być usztywnienie struktury inhibitora na drodze cyklizacji w pozycji benzylowej i fenetylowej do pierścieni 5- i 6-członowych. Takie podejście zaowocowało odkryciem związku nr 30, czyli **OAT-870**, będącego podwójnym inhibitorem kwaśnej chitynazy ssaczkiej i chitotriozydazy, który charakteryzuje się zoptymalizowanym profilem farmakokinetycznym u myszy i szczura. Związek ten nie wykazał genotoksyczności w teście fluktuacyjnym Ames, dlatego Doktorantka kontynuowała badania dotyczące jego oddziaływania z szeregiem kluczowych, z punktu bezpieczeństwa farmakologicznego, celów molekularnych w panelu różnorodności w CEREPie. Niestety **OAT-870** wykazał aktywność wobec transportera dopaminy, zarówno w teście komórkowym jak i wiązania radioliganda. Dlatego też, pomimo iż Doktorantka stworzyła podwójnego inhibitora kwaśnej chitynazy ssaczkiej i chitotriozydazy o nanomolowej aktywności wobec ludzkich i mysich enzymów, to jednak jego wpływ na transporter dopaminy uniemożliwił kontynuację dalszych badań przedklinicznych.

Podsumowując, pragnę podkreślić, że w trakcie przygotowywania rozprawy doktorskiej mgr inż. Marzena Mazur zaprojektowała i zsyntetyzowała ponad 250 związków. Ze sposobu prowadzonych eksperymentów wynika że charakteryzuje się Ona dużym samozaparciem i dociekliwością, a także odpornością na niepowodzenia co świadczy o Jej dojrzałości naukowej. Przeprowadzone na dużą skalę bardzo intensywne badania umożliwiły zidentyfikowanie selektywnych inhibitorów chitynaz o dobrym profilu farmakokinetycznym. Niewątpliwie ważnym sukcesem Doktorantki jest również to, że struktury nowych inhibitorów chitynaz są chronione przez 3 patenty, których jest współautorem. Ponadto spośród zaprojektowanych i zsyntezowanych związków 3 inhibitory chitynaz: **OAT-177**,

OAT-870 i OAT-2068 zostały przetestowane w modelach zwierzęcych, co miało na celu poznanie roli chitynaz w patologii chorób układu oddechowego i nieswoistych chorób zapalnych jelit.

Co bardzo ważne przeprowadzone przed Doktorantkę badania przyczyniły się do odkrycia związku **OATD-01**, nioselektywnego inhibitora kwaśnej chitynazy ssaczej i chitotriozydazy, który podobnie jak opisane w niniejszej rozprawie związki **OAT-177, OAT-2068 i OAT-870**, wykazał skuteczność w zwierzęcych modelach chorób zapalnych i włóknieniowych układu oddechowego. Jednocześnie związek ten charakteryzuje się bezpiecznym profilem farmakologicznym, dlatego został dopuszczony do I fazy badań klinicznych, której rezultaty potwierdziły jego dobre właściwości. Licencja na dalszy rozwój **OATD-01** została sprzedana, jak wspomina Doktorantka w swojej pracy, końcem 2020 roku firmie Galapagos NV, która jest światowym liderem w dziedzinie poszukiwań nowych terapii w leczeniu idiopatycznego włóknienia płuc i wkrótce rozpocznie się II faza badań klinicznych. Eksperymenty Doktorantki zaowocowały zidentyfikowaniem skutecznych narzędzi do badania roli chitynaz w przebiegu stanu chorobowego oraz odkryciem związku **OATD-01**, który w niedalekiej przyszłości może stać się elementem terapii nieuleczalnej choroby, jaką jest idiopatyczne włóknienie płuc.

Podsumowując, uzyskane w niniejszej rozprawie doktorskiej wyniki są nowatorskie - wskazują na ogromny potencjał inhibitorów chitynaz w leczeniu chorób, których podłożem jest stan zapalny (astma, choroby zapalne jelit), a także włóknienie tkanek (idiopatyczne włóknienie płuc, sarkoidoza, stłuszczeniowe zapalenie wątroby). Z przyjemnością, zatem pragnę stwierdzić, że przedstawiona do recenzji praca autorstwa mgr inż. Marzeny Mazur zatytułowana *„Inhibitory chitynaz jako potencjalne leki w chorobach o podłożu zapalnym i włóknieniowym”* spełnia określone ustawowo warunki stawiane rozprawie doktorskiej, dlatego mam zaszczyt wnieść do Wysokiej Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr inż. Marzeny Mazur do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie z uwagi na istotną wartość merytoryczną pracy, której wyniki mają implikacje kliniczne, zostały opublikowane w renomowanych czasopismach o łącznym Impact Factor 26,547, a także są chronione przez 3 patenty, składam wniosek o przyznanie Doktorantce wyróżnienia.



Prof. dr hab. n. med. Joanna Mika