



Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Wydział Farmaceutyczny
Zakład Biofarmacji
ul. Chodźki 4a 20-093 Lublin

Lublin, dn. 24.07.2023

dr hab. n. farm. Anita Płazińska
Prof. UM w Lublinie
Zakład Biofarmacji
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
e-mail: anita.plazinska@umlub.pl

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Marioli Stypik
pt.: *Opracowanie i synteza innowacyjnych związków małocząsteczkowych, inhibitorów kinazy PI3K, jako potencjalnych leków w leczeniu tocznia rumieniowatego oraz innych chorób zapalnych i autoimmunologicznych.*

wykonanej pod opieką naukową dr hab. inż. Zbigniewa Ochala, prof. uczelni

oraz

dr inż. Marcina Zagozdy, pełniącego rolę promotora pomocniczego

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej z dnia 25.05.2023 roku zgodnie z Uchwałą nr 327/32/2023 podjętą w dniu 23.05.2023 r.

Prace wykonane przez mgr inż. Mariolę Stypik, wykonane w ramach doktoratu koncentrowały się głównie na poszukiwaniu nowych selektywnych inhibitorów 3-kinazy fosfoinozytydu δ (PI3K δ). Białko to pełni niezwykle ważną rolę sygnalizacyjną, reguluje różnicowanie, proliferację, migrację i przeżycie komórek głównie odpornościowych. Nadaktywność tego białka powoduje dysfunkcje komórkowe w wielu chorobach zapalnych i autoimmunologicznych, w tym astmie, przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc (POChP), czy toczeniu rumieniowatym.

Doktorantka podczas swoich badań koncentrowała się na poszukiwaniu i rozwijaniu małych cząsteczek chemicznych, które mogą selektywnie wpływać na konkretny cel molekularny



związany z patogenezą m.in. toczenia rumieniowatego; w tym przypadku była to kinaza PI3K. Odkrywanie takich małowczątkowych leków może umożliwić bardziej ukierunkowane i celowe podejście do leczenia choroby. Warto podkreślić, że poszukiwanie nowych terapii jest procesem niezwykle złożonym i czasochłonnym, wymagającym wielu badań, w tym badań klinicznych w celu potwierdzenia skuteczności i bezpieczeństwa nowych leków.

Recenzowana rozprawa doktorska, napisana przez Panią mgr inż. Mariolę Stypik, poświęcona jest otrzymaniu związku czynnego biologicznie, potencjalnego leku stosowanego w leczeniu toczenia rumieniowatego, który stanowi chorobę wielonarządową o złożonym mechanizmie. W tym celu przeprowadzone zostały badania teoretyczne mające na celu projektowanie *in silico* nowych związków opartych na szkielecie pirazolo[1,5-a]pirymidyny, przeprowadzenie analizy SAR oraz modelowania molekularnego. Kolejnym etapem było zaprojektowanie optymalnego procesu syntezy inhibitorów PI3K, pozwalającego na stworzenie biblioteki potencjalnych selektywnych inhibitorów PI3K o odpowiednich właściwościach fizykochemicznych oraz obniżenie kosztów produkcji związku przy zachowaniu wysokiej wydajności procesu. Zsyntetyzowanych zostało ok. 130 związków, potencjalnych inhibitorów kinazy PI3K. Na podstawie wyników badań *in vitro* wytypowano związek, CLP302415, selektywnie hamujący aktywność kinazy PI3K δ . Dla wybranego związku przeprowadzono prace nad powiększeniem skali, badania *in vitro* oraz ADMET. Kończącym etapem badań było poddanie ww. związku badaniom toksykologicznym. Obecnie związek ten przygotowujemy jest do badań klinicznych I fazy.

Przedstawiona do oceny rozprawa skonstruowana jest w formie kompilacji trzech artykułów opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, znajdujących się na liście filadelfijskiej. Do kolekcji artykułów dołączony został krótki wstęp, w którym autorka przedstawiła wybrane zagadnienia bezpośrednio związane z tematyką przeprowadzonych badań a także skondensowany opis celów, metodologii przeprowadzonych badań oraz uzyskanych wyników.

Podstawą recenzowanej pracy są trzy oryginalne artykuły naukowe opublikowane w renomowanych czasopismach z listy filadelfijskiej. Artykuły o łącznym IF wynoszącym 15,357 opublikowane zostały w: *Pharmaceuticals* (IF = 5,215, punkty MEiN = 140), *Pharmaceuticals* (IF = 5,215, punkty MEiN = 140) oraz *Molecules* (IF = 4,927, punkty MEiN = 140).

Autorka określiła swój udział w realizacji wszystkich prac w sposób opisowy. Z opisu tego wynika, że jej rola w realizacji wszystkich prac będących podstawą doktoratu dotyczyła projektowania struktur nowych związków, planowania i przeprowadzenia syntez, optymalizacji



procesu powiększania skali, analizowania otrzymanych wyników, a także pisania publikacji oraz przeprowadzania analizy literatury. Tematem wiążącym wszystkie prace jest projektowanie struktur nowych, selektywnych inhibitorów PI3K, ich synteza, przebadanie związków pod kątem aktywności biologicznej, jak również optymalizacja procesu powiększania skali syntezy.

Cele zdefiniowane we wstępie przez Autorkę rozprawy dotyczą trzech głównych aspektów. Pierwszy z nich jest związany z problematyką projektowania struktur potencjalnych leków oraz mechanizmem oddziaływania nowych związków z celem molekularnym na poziomie molekularnym. Drugi cel dotyczy zaplanowania, przeprowadzenia syntezy nowych związków oraz optymalizacji procesu powiększania skali syntezy. Trzeci cel dotyczy wytypowania związku o optymalnych właściwościach farmakologicznych i wdrożenie do produkcji opracowanej wcześniej technologii syntezy inhibitorów PI3K.

Dołączone do zestawu publikacji Streszczenie oraz Komentarz do rozprawy doktorskiej są dość zwarte i pokazują, że Autorka rozprawy doskonale porusza się w tematyce prowadzonych przez siebie badań. Treść wstępu wprowadza czytelnika w tematykę rodziny kinaz PI3K i ich wpływu w powstawanie wielu schorzeń, inhibitorów PI3K, roli tzw. „półki tryptofanowej” pełniącej rolę w selektywnym oddziaływaniu leków z PI3K oraz wpływu konkretnych podstawników w wiodącej strukturze na aktywność i selektywność działania. W kolejnych sekcjach wstępu, dotyczących metodologii i zakresu badań, znajduje się jedynie przybliżenie najważniejszych informacji na temat projektowania nowych związków i ich dokowania do dwóch modeli kinazy PI3K δ , syntezy oraz przeprowadzenia badań ADMET. Z uwagi na szeroki zakres przeprowadzonych badań interdyscyplinarnych dokładniejsze informacje na temat badań eksperymentalnych dałyby lepszy wgląd w całość projektu.

Więcej szczegółów na temat metodologii i uzyskanych wyników znajduje się w kolejnych rozdziałach, dotyczących konkretnych publikacji wchodzących w cykl rozprawy doktorskiej (rozdział 5). Rozdział 6 stanowi opis badań wchodzących w skład publikacji, która jest w trakcie przygotowania. Rozdział 7 dostarcza informacji na temat realizowanego doktoratu, który jest doktoratem wdrożeniowym. Natomiast, rozdział 8 stanowi podsumowanie najważniejszych wyników uzyskanych w toku badań opisanych w niniejszej rozprawie. Kolejny rozdział stanowi bibliografia obejmująca 77 pozycji literaturowych. W dalszych częściach rozprawy doktorskiej znajduje się wykaz publikacji i doniesień konferencyjnych prezentowanych przez Doktorantkę, publikacje z cyklu oraz oświadczenia Doktorantki i współautorów prac

Poniżej omawiam badania i ich wyniki, zawarte w pracach będących podstawą rozprawy. Omówienie to jest dość pobieżnie z uwagi m.in. na to, że prace wchodzące w skład rozprawy



były już recenzowane. Dodatkowo, z racji faktu, iż prace dotyczą badań multidyscyplinarnych, skupiam się na elementach dotyczących bezpośrednio recenzowanej rozprawy.

- W pracy **P1** [*Design, Synthesis, and Development of pyrazolo[1,5-a]pyrimidine Derivatives as a Novel Series of Selective PI3K δ Inhibitors: Part I—Indole Derivatives*. Pharmaceuticals 2022, 15, 949] zamieszczona została biblioteka nowych związków ($n = 55$), potencjalnych leków mogących znaleźć zastosowanie w terapii astmy lub POChP. Na etapie projektowania nowych leków, zidentyfikowany został fragment bicyklicznych skondensowanych pierścieni pięcio- i sześcioczłonowych odpowiedzialny za aktywność biologiczną wykorzystywaną w leczeniu astmy lub POPChP. Następnie, struktura szkieletu 5-indol-4-ilo-pirazolol[1,5-a]pirymidyny modyfikowana była o podstawniki odpowiedzialne za: (i) wzrost rozpuszczalności w wodzie i (ii) tworzenie wiązań wodorowych z białkiem. Ponadto, autorzy pracy wykazali, że dodatek pierścieni piperazynowych lub piperdynowych z dużymi podstawnikami alifatycznymi pozwala na otrzymanie selektywnych inhibitorów kinazy PI3K. Zsyntetyzowano szereg związków oraz przebadano je pod kątem aktywności wobec czterech kinaz: PI3K δ , PI3K α , PI3K β , PI3K γ . Ponadto, dokowanie wykazało, że badane związki wiążą się w kieszeni wiążącej enzymu w podobny sposób co związek referencyjny. Związki, które wykazywały największą aktywność i selektywność działania wobec PI3K δ oddziaływały z resztami aminokwasowymi PI3K δ tworzącymi tzw. „półkę tryptofanową”. Badania wykazały, że pochodne indolowe lub azaindolowe wykazują wysoką selektywność działania wobec PI3K δ w porównaniu z resztą kinaz. Dwa związki wykazujące najwyższą aktywność zostały przebadane metodą cytometrii przepływowej, pod kątem pobudzenia proliferacji limfocytów B oraz stabilności metabolicznej. Oba wykazały się bardzo wysoką siłą hamowania proliferacji limfocytów B przy wartościach IC₅₀, odpowiednio, 20 nM i 19 nM. Do dalszych badań wytypowany został jeden związek (CLP302253), charakteryzujący się wysoką aktywnością wobec PI3K δ (IC₅₀ = 2,8 nM), selektywnością działania wobec ww. białka i dobrą rozpuszczalnością w wodzie oraz wysoką stabilnością metaboliczną.
- Praca **P2** [*Design, Synthesis, and Development of Pyrazolo[1,5-a]pyrimidine Derivatives as a Novel Series of Selective PI3K δ Inhibitors: Part II—Benzimidazole Derivatives*. Pharmaceuticals 2022, 15, 927] przedstawia proces syntezy, badań enzymatycznych i *in vitro* oraz modelowania molekularnego nowych inhibitorów PI3K. W tej pracy zsyntetyzowanych zostało 57 pochodnych pirazolo[1,5-a]pirymidyny reprezentujących zbiór nowych, silnych, aktywnych i selektywnych inhibitorów PI3K δ , wykazujących wartości IC₅₀ w zakresie od



1,892 do 0,018 μM . Spośród wszystkich otrzymanych związków związek CPL302415 wykazał najwyższą aktywność (wartość IC_{50} 18 nM dla PI3K δ), dobrą selektywność (dla PI3K δ w stosunku do innych izoform PI3K: PI3K α/δ = 79; PI3K β/δ = 1415; PI3K γ/δ = 939) oraz obiecujące właściwości fizykochemiczne. Dla powyższego związku przeprowadzono badania stabilności metabolicznej przy użyciu mysich i ludzkich mikrosomów wątrobowych, przenikalność przez błony (test PAMPA) oraz zdolność do wiązania innych białek. W dokowaniu badanych związków do modelu PI3K δ wykazana została sieć wiązań wodorowych z resztami aminokwasowymi odpowiedzialnymi za wiązanie cząsteczki inhibitora np.: Val828, Lys779 czy Asp787. Natomiast, w przypadku związku wykazującego najwyższą aktywność (CPL302415) zaobserwowano dodatkowe oddziaływanie z enzymem tj. pojawiło się oddziaływanie z Trp760.

Struktura wyselekcjonowanego związku jest uważana za potencjalnego przyszłego kandydata do badań klinicznych w leczeniu toczenia rumieniowatego. Związek ten przekazany został do dalszych badań toksykologicznych. Warto podkreślić, iż w trakcie badań powiększono skalę i otrzymano związek w ilości 1 kg, niezbędnej do przeprowadzenia badań toksykologicznych.

- o Publikacja **P3** [*Tuning the Biological Activity of PI3K δ Inhibitor by the Introduction of a Fluorine Atom Using the Computational Workflow*. Molecules. 2023 Apr; 28(8): 3531] stanowi trzecią pracę z cyklu i dotyczy projektowania, modelowania molekularnego, syntezy ($n = 19$) oraz oceny aktywności biologicznej nowych fluorowanych analogów CPL302415, związku otrzymanego we wcześniejszych badaniach opisanych w **P2**. W pracy **P3** przedstawiono wpływ atomu fluoru na właściwości biologiczne wybranych struktur. Sprawdzono korelację wyników otrzymanych z dokowania (entalpii swobodnej wiązania, ΔG) z wartościami IC_{50} dla PI3K. Symulacje dynamiki molekularnej wykazały stabilność oddziaływań związku CPL302415 z PI3K δ . Badania teoretyczne i eksperymentalne wykazały, że pozycja podstawionego atomu fluoru wpływa na aktywność badanych związków, co koreluje dobrze z wartościami entalpii swobodnej (ΔG). Otrzymane wyniki potwierdzają, że metody teoretyczne takie jak IFD, MD i QM/MM (QPLD) połączone z obliczeniami energetycznymi (metodą MM-GBSA), stanowią skuteczne narzędzie do przewidywania jak również rozróżniania związków aktywnych od nieaktywnych. Ponadto, takie połączenie metod obliczeniowych jest cennym narzędziem do racjonalnego projektowania nowych leków halogenowych.



Wyniki zawarte w ww. pracach oceniam jako wartościowe i wnoszące istotny wkład w dziedzinę farmakologii inhibitorów PI3K mogących znaleźć zastosowanie w terapii chorób zapalnych i autoimmunologicznych. Warto podkreślić, iż cele badawcze deklarowane przez Doktorantkę zostały w pełni zrealizowane a efektem doktoratu jest wdrożenie technologii syntezy substancji czynnej CPL302415.

Niezależnie od faktu, iż prace stanowiące rozprawę doktorską oraz wyniki w nich zawarte były już uprzednio recenzowane, szczegółowa analiza rozprawy, wliczając w to dołączony wstęp ujawniła pewne niedociągnięcia, które z obowiązku recenzenta przedstawiam w formie następujących uwag:

1. W Streszczeniu oraz w rozdziale 4.3.3. Autorka wspomina o przeprowadzonych badaniach *in vivo*. Na jakich modelach zwierzęcych były one przeprowadzone? O badaniach *in vivo* nie było wzmianki w publikacjach ujętych w cyklu.
2. W opisie poszczególnych publikacji zabrakło informacji na temat finansowania przeprowadzonych badań. Warto w rozprawie podkreślać swój udział w badaniach finansowanych ze źródeł zewnętrznych.

Oдноśnie pierwszej publikacji **P1** poproszę o przybliżenie kilku kwestii tj.:

- Na jakiej podstawie zdecydowano o poprawności dokowania związków do modelu PI3Kδ? Jakie obrano kryteria?
- Przy tak dużej ilości przebadanych związków warto byłoby pokusić się o korelację wartości funkcji skorującej otrzymanej z dokowania z wartościami względem IC₅₀.
- W jaki sposób parametry farmakokinetyczne T_{1/2} oraz Cl mogą informować nas o stabilności enzymatycznej leku?

Oдноśnie publikacji drugiej **P2** mam kilka pytań, a mianowicie:

- W publikacji oraz rozprawie nie jest wyjaśnione w jaki sposób Autorzy wyznaczyli szereg parametrów np.: przepuszczalność przez błony (brak metodyki), parametry wiązania z białkami osocza (PPBs) w zależności od gatunku; biodostępności (F) dla różnych gatunków zwierząt i różnych postaci preparatu. Poprosiłabym o więcej informacji na temat tych analiz. O jakich postaciach preparatu jest mowa w publikacji („Additionally, CPL302415 (6) was checked for bioavailability in mice (F > 55%) and dogs (F > 90%), depending on the formulation form”)?



- W publikacji trzeciej **P3** zabrakło jednostek przy wartościach *Docking score* dla *First pose* (Tabela 1, 2).

Zaznaczam, że ww. uwagi w dużej mierze są niezależne od wyników oraz dyskusji zawartych w załączonych artykułach. Odnosząc się do wyników zawartych w publikacjach stwierdzam poprawność zastosowanej metodologii, staranną i skrupulatną analizę wyników jak i ich interpretację pod kątem zjawisk zachodzących w skali molekularnej.

Oprócz dyskutowanej powyżej rozprawy doktorskiej oraz wyników w niej zawartych, należy także docenić aktywność naukową Doktorantki, na którą składają się dodatkowe 4 artykuły oryginalne opublikowane w czasopiśmie z listy filadelfijskiej. Łączny *Impact Factor* publikacji poza cyklem wynosi 20,28.

Podkreślić warto aktywność Doktorantki na innych polach związanych z nauką. W szczególności chodzi tu o aktywność konferencyjną. Doktorantka zaprezentowała 7 posterów na 5 konferencjach międzynarodowych oraz 2 konferencjach krajowych. Ponadto, wyniki badań zaprezentowała w formie komunikatu ustnego na 1 konferencji międzynarodowej (PDDP Amsterdam, 2023) oraz czterech krajowych.

Dwukrotnie została nagrodzona za najlepszy poster podczas konferencji ACCORD 2022 oraz Gali Młodych Naukowców Politechniki Warszawskiej.

Doktorantka była wykonawcą w 3 projektach finansowanych ze źródeł zewnętrznych. Brała udział w następujących projektach:

1. Projekt „KICHA1 — "Badania przedkliniczne i opracowanie kliniczne innowacyjnego inhibitora kinazy delta PI3 jako kandydata do leczenia zapalne”, POIR.01.02.00-0085/18, badania współfinansowane przez Celon Pharma S.A. oraz Narodowe Centrum Badań i Rozwoju.
2. Projekt „PIKCEL” – „Przedkliniczne i kliniczne opracowanie innowacyjnego inhibitora kinaz lipidowych jako kandydata do leczenia steroidooporności i ciężkich zapalnych chorób płuc”, POIR.01.01.01-00-1341/15, badania współfinansowane przez Celon Pharma S.A. oraz Narodowe Centrum Badań i Rozwoju.
3. Projekt Preludium. „Podstawienie fluorem – nowy algorytm zwiększania aktywności biologicznej”, 2019/35/N/NZ7/04312, finansowany przez Narodowe Centrum Nauki (NCN). Kierownik grantu: Wojciech Pietruś.



Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Wydział Farmaceutyczny
Zakład Biofarmacji
ul. Chodźki 4a 20-093 Lublin

Podsumowując, wysoko oceniam poziom badań naukowych będących podstawą recenzowanej rozprawy, ilość syntez oraz praktyczny aspekt przeprowadzonych badań.

Ponadto, stwierdzam, że przedstawiona przez Doktorantkę praca doktorska spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 187 ustawy z dnia 28 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2022 Poz. 574 ze zm.) w związku z czym zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej z wnioskiem o nadanie Pani mgr inż. Marioli Stypik stopnia doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauk chemicznych.

Z poważaniem,

dr hab. n. farm. Anita Płazińska, prof. UM w Lublinie