

dr hab. inż. Grażyna Groszek, prof. PRz

Rzeszów, 24 lipca 2023

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Marioli Stypik

pt. *Opracowanie i synteza innowacyjnych związków małowcząsteczkowych, inhibitorów kinazy PI3K, jako potencjalnych leków w leczeniu toczenia rumieniowatego oraz innych chorób zapalnych i autoimmunologicznych*

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana i opisana przez mgr inż. Mariolę Stypik pod kierunkiem dra hab. inż. Zbigniewa Ochala jako promotora i dra inż. Marcina Zagozdy jako opiekuna pomocniczego. Została ona wykonana na rzecz współpracy pomiędzy Politechniką Warszawską a firmą farmaceutyczną Celon Pharma S.A. i weszła w tryb doktoratu wdrożeniowego.

Badania, które są przedmiotem opisu w rozprawie zostały w przeważającej kwocie sfinansowane ze środków projektów badawczych: Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (PIKCEL „*Preclinical and clinical development of innovative lipid kinases inhibitor as a candidate for the treatment of steroid-resistant and severe inflammatory lung diseases*”, nr POIR.01.01.01-00-1341/15; KICHAI “*Pre-clinical and clinical development of an innovative PI3 delta kinase inhibitor of as a candidate for the treatment of inflammatory disorders*”, nr POIR.01.02.00-00-0085/18), Narodowego Centrum Nauki (grant nr 2019/35/N/NZ7/04312) oraz firmy farmaceutycznej Celon Pharma S.A., której Doktorantka jest etatowym pracownikiem.

Rozprawa doktorska mgr inż. Marioli Stypik ma formę spójnego tematycznie zbioru trzech artykułów opublikowanych w latach 2022-2023, opatrzonych stosownym komentarzem - przewodnikiem po publikacjach wraz z niezbędnymi informacjami formalnymi, jakie powinny znaleźć się w rozprawie doktorskiej. Rozprawa liczy 152 strony ma postać dokumentu piśmienniczego. Znajdziemy tu oprócz strony tytułowej i podziękowań rozdziały: dwustronicowe streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz publikacji związanych tematycznie z rozprawą i aktualnym współczynnikiem wpływu (IF) oraz punktacją MNiSW, *Komentarz do rozprawy doktorskiej z podrozdziałami Wstęp, Cel pracy, Metodologia i zakres badań*, w którym zawarte są zagadnienia: *Projektowanie inhibitorów kinazy PI3K, Wybranie struktury najbardziej aktywnej i określenie związku wiodącego, ADMET, badania in vitro i in vivo*. Komentarz liczy 19 stron. Pozostałe rozdziały to: *Omówienie wyników stanowiących*

podstawę rozprawy doktorskiej z podziałem na publikacje (15 stron); Wyniki wchodzące w skład publikacji w trakcie przygotowania; Doktorat wdrożeniowy – wdrożenie do przemysłu; Podsumowanie i wnioski; Literatura cytowana (77 pozycji); Wykaz publikacji nie wchodzących w skład rozprawy doktorskiej (4 pozycje, w tym ostatnia nieindeksowana); Wykaz posterów i komunikatów ustnych (6 posterów, 3 komunikaty) – razem 15 stron. Następnie, do rozprawy dołączone są kopie trzech Publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej (68 stron) a kończą rozprawę Oświadczenia współautorów publikacji – jest ich 18, w tym trzy – Doktorantki, dwa – Promotora, po dwa – współautorów i trzy – Opiekuna pomocniczego.

Tematycznie spójny materiał publikacyjny przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej ujrzał światło dzienne w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym. Opublikowano go w czasopismach indeksowanych w bazie JCR (*Journal Citation Reports*) o średnim współczynniku wpływu $IF=5,119$ i sumarycznej liczbie punktów MNiSW 300. Są to prace opublikowane w *Pharmaceuticals* (2022, 15(8), 927 i 2022, 15(8), 949) oraz *Molecules* (2023, 28(8), 3531). Prace te są wieloautorskie: pierwsze dwie liczą po 23. autorów, trzecia – 11. autorów. W publikacjach oznaczonych **P1** i **P2** (w czasopiśmie *Pharmaceuticals*) Doktorantka jest autorem korespondencyjnym i na pierwszym miejscu; w trzeciej, oznaczonej **P3**, jest drugim autorem. Wieloautorstwo w publikacjach **P1-P3** podyktowane jest złożonością przedstawionych badań z obszarów syntezy organicznej, farmakologii i biologii. Zatem trudno sobie wyobrazić kompleksowe przedstawienie badań bez ich wsparcia wynikami wykonanymi przez specjalistów. Precyzyjnie zostało to ujęte w akapicie *Author Contributions* w publikacjach **P1**, **P2** i **P3**. Zgodnie z oświadczeniem Doktorantki, jej wkład autorski dotyczył głównie syntezy, koncepcji pracy, analizy formalnej, badaniach i opracowaniu manuskryptu. Doktorantka miała wsparcie zarówno w syntezie, jak i w badaniach oraz w opracowania manuskryptów, głównie w osobie Opiekuna pomocniczego dr Zagozdy.

Być może wytłumaczeniem wieloautorowości w publikacjach w *Pharmaceuticals* (**P1** i **P2**), jest fakt, że współautorzy są twórcami wynalazku opisanego w patencie PL 236355 B1 z datą zgłoszenia 02.04.2015, a udzielonego 11.01.2021 i patentu WO2016/157091. To właśnie w patencie PL 236355 B1 zastrzeżono strukturę chemiczną CPL302253 (**54**) z publikacji **P1**. Również w cytowanym wyżej opisie patentowym ujawniono strategię syntezy nowych struktur chemicznych, która została wykorzystana w opisie syntez w **P1-P3**. Nie rozumiem, dlaczego Autorka nie wyeksponowała w *Komentarzu do rozprawy doktorskiej* znaczenia syntetycznego patentu PL236355 B1, bo patent WO2016/157091 jest anglojęzyczną wersją patentu PL, i jest

błędnie cytowany. Mgr inż. Mariola Stypik figuruje w gronie twórców wynalazku przedmiotowego patentu ukryta pod panięmskim nazwiskiem Sekular. Z etycznego punktu widzenia nie ma powodu do nieujawniania numeru patentu PL 236355 B1 jako odnośnika literaturowego.

Pytanie: Czym kierowała się Pani dołączając *Oświadczenia*... tylko niektórych współautorów?

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały poddane wnikliwym recenzjom przez grono specjalistów z danej dziedziny oraz przez edytorów naukowych czasopism. Na pewno zostało to spełnione w obszarze badań farmakologicznych i biologicznych, mam jednak pewne wątpliwości, czy wypełniono to w obszarze syntezy chemicznej, ale o tym w dalszej części recenzji.

Ocena merytoryczna pracy

We wstępie rozprawy doktorskiej mgr inż. Mariola Stypik odpowiada na pytanie: Dlaczego I klasa kinaz PI3K jest celem terapeutycznym? Lista schorzeń medycznych powiązanych z działaniem względem kinazy PI3K (szczególnie I klasy) jest długa. Zatem poszukiwanie nowych skutecznych związków chemicznych w terapii chorób nowotworowych, zapalnych i autoimmunologicznych jest ważne. Skondensowanym przeglądem literatury przybliży czytelnikowi podział kinaz PI3K, mechanizm działania inhibitorów kinazy PI3K δ , aby ujawnić, która ogólna struktura chemiczna będzie przedmiotem modyfikacji chemicznej z przeznaczeniem do wstępnych badań farmakologicznych i biologicznych w leczeniu toczenia rumieniowatego, SLE. Doktorantka, z wykorzystaniem informacji literaturowych, uzasadnia wybranie fragmentu pirazolo[1,5-*a*]pirymidynowego (Rys. 3) jako kluczowego w nowych syntezowanych związkach. Nazywa go rdzeniem, wskazuje pozycje, w które będą wbudowywane podstawniki R¹ i R² (pozycje 2 i 5). A tak naprawdę to rdzeniem jest fragment 7-(morfolino-4-yl)pirazolo[1,5-*a*]pirymidyny. Wszystkie końcowe struktury chemiczne, opisane w rozprawie doktorskiej, zawierają przedmiotowy fragment. Obecność podstawnika morfolinowego w pozycji 7 w strukturze pirazolo[1,5-*a*]pirymidyny jest kluczowa dla aktywności. Po tym wprowadzeniu Doktorantka określa cele jakie chce osiągnąć. Jest ich sześć. Pierwsze cztery są zgodne z wynikami zamieszczonymi w publikacjach **P1-P3**. Cel piąty został sformułowany nieprecyzyjnie. Nie ma opisu porównawczego do zmniejszenia liczby etapów

syntezy czy redukcji kosztów. Cel szósty - nie ma opisu technologii syntezy związku – kandydata do badań I-szej fazy klinicznej. Zręczniejsz by było tu użyć czasu przyszłego.

W podrozdziale „*Metodologia i zakres badań*” Doktorantka przybliży kuchnię osiągnięcia celu pracy z uwzględnieniem stanu wiedzy (czystości patentowej), dokowania, własnych wyników opatentowanych przez firmę Celon Pharma S.A. Niestety, tutaj odnośnik [12] jest błędnie cytowany. Proszę o wyjaśnienie. Po wykonaniu syntez nowych struktur chemicznych, szeregu badań ich właściwości fizykochemicznych, określeniu ich parametrów farmakokinetycznych, wybrano grupę kandydatów (jest ich 5) do dalszych badań z przesłaniem do badań przedklinicznych. Powiększono skalę syntezy do 10 g wybranych kandydatów do dalszych badań, ale nie podano szczegółów. Rozszerzono badania aktywności, wybrano związek **6** do wstępnych badań biologicznych i zakwalifikowano jako strukturę wiodącą. Wyniki badań ADMET potwierdziły słuszność wyboru związku **6** i przejście do badań toksykologicznych.

W rozdziale piątym „*Omówienie wyników...*”, Doktorantka krótko omawia najważniejsze wyniki badań ujawnionych w publikacjach **P1-P3**. Tworzą one tematycznie całość. W omówieniu **P1** i **P2** nie znajdziemy odnośników (są w oryginalnych publikacjach), natomiast omówienie **P3** zostało o nie wzbogacone.

Z dużym rozczarowaniem czytałam fragmenty w rozdziale piątym odnoszące się do otrzymywania nowych związków chemicznych z przeznaczeniem do badań. Rażąco brakuje w analizowanym fragmencie odnośników literaturowych, które były inspiracją do rozwiązania syntetycznego. Tutaj to właśnie powinien być wypunktowany patent PL 236355 B1 z 2021 roku. Jeśli podobne rozwiązania syntetyczne stosowane przez Doktorantkę w otrzymywaniu nowych związków były opisane w literaturze czy to patentowej czy czasopismach (np. patent WO03/101993 A1 i WO 2013/028263 A1), to powinny być one wypunktowane. Regułą/obowiązkiem Twórcy publikacji jest, aby w naukowych pisemnych opracowaniach, do których zaliczamy rozprawy doktorskie, były cytowania związane tematycznie. Doktorantka, jako pierwszy i korespondencyjny autor publikacji **P1-P2** uwzględnia cytowania w obszarze farmakologicznym. Gorzej przedstawia się ten problem (cytowań) w obszarze chemicznym. Nie wiadomo, które związki były już opisane (brak odnośników), a które są nieopisane w literaturze. Do tego dochodzi niepełny opis właściwości fizycznych otrzymanych związków, takich jak temperatura topnienia, analiza elementarna, widma IR, UV-VIS. Co ciekawe,

w opisach wykonania Autorka produkty syntezy opisuje jako „*a white solid*”, powinno być: „*colourless solid*”.

Doktorantka zafascynowana jest analizą HRMS, która podana jest dla wszystkich opisanych produktów w **P1-P3**. Z przykrością nie znalazłam oznaczeń analizy elementarnej, zwłaszcza dla produktów w postaci krystalicznego osadu. Ona to jest wyznacznikiem czystości analizowanego związku. Obecność jonu $m/z = [M+H]^+$ znaleziona w zgodności z obliczoną nie jest wyznacznikiem czystości otrzymanego związku. Pytanie do Doktorantki, czy były wykonane pomiary temperatury topnienia i analizy elementarne. Jeśli nie, to dlaczego.

Brak jest w rozdziale *Omówienie wyników...* krytycznego komentarza do analizowanych transformacji chemicznych zilustrowanych schematami 1 i 2. Nie wszystkie etapy syntezy miały 100% wydajności. Czy badano produkty uboczne? One to niejednokrotnie także są przedmiotem badań farmakologicznych.

Nie rozumiem sformułowania „optymalizacja podstawnika R^2 (str. 22) - proszę wyjaśnić.

Co Pani rozumie pod sformulowaniem „...*wiązanie zasadowe...*” (str. 13 wiersz 6 od dołu).

Ocena formalna pracy

W *Streszczeniu w języku polskim* Doktorantka z pietyzmem tłumaczy nam skróty angielskie takie jak NMR, HPLC, MS, a zaniedbuje wyjaśnienie kluczowego parametru farmakologicznego IC_{50} .

W rozdziale „*Cytowana literatura*”, str. 40, wkrađło się sporo błędów, zwłaszcza w części odnoszącej się do sposobów otrzymania nowych związków – cz. chemiczna. Błędnie cytowany jest odnośnik [12] na str. 19, to samo dotyczy odnośnika [42] str. 15. Ten ostatni jest kluczowy z punktu widzenia realizacji syntezy opisanych struktur w publikacjach **P1-P3**.

Doktorantka pisze w podrozdziale 4.3.2 *Wybór kandydatów do rozwoju i określenie związku wiodącego*, tu cytat: „*wykonano syntezę wybranych kandydatów w większej skali (do 10 g)*”, a w rozdziale 8. *Podsumowanie i wnioski*, pisze „*CPL302415 został wyselekcjonowany jako związek wiodący w leczeniu tocznia rumieniowatego - najbardziej aktywna i selektywna struktura oparta na strukturze 2-metylodifluorobenzimidazolu (P2). Cząsteczka została zsyntezowana w większej skali (jednego kilograma)*”. Nie ma opisu syntezy *CPL302415* w publikacji **P2** w skali 1 kg. Nie ma też opisów w publikacjach **P1-P3** otrzymywania kandydatów w skali przekraczającej 1g. Są opisane sposoby otrzymania niektórych związków

pośrednich w skali gramowej. Jest jeden opis otrzymywania związku 13 (w **P2**) w skali 100 gramowej, ale z zabawnym błędem: trudno bowiem oddzielić fazę wodną od organicznej (DMF + octan etylu), której objętość wynosi ponad 2,5 L, po dodaniu tylko 3 mL wody.

Związek *CPL302415*, w publikacji **P2** o nr. **6**, otrzymany został w skali miligramowej i scharakteryzowany opisem widma $^1\text{H-NMR}$ o rozdzielczości 600 MHz. Zastanawia mnie rozbieżność w przypisaniu wartości przesunięć chemicznych sygnałów rezonansowych w opisie tekstowym z załączonym widmem związku **6** w *Supplementary data*.

Co więcej, dysponując widmem związku **6**, wykonanym na aparacie o rozdzielczości 600 MHz, precyzyjniej można było określić multipletowość poszczególnych sygnałów rezonansowych i przypisanie protonów do pozycji w strukturze chemicznej **6**. Proszę o komentarz.

W „*Komentarzu do...*” brak jest komunikacji rysunków, schematów i tabel z tekstem.

Ułatwieniem byłoby wskazanie numerów pozycji w rdzeniu struktury chemicznej.

Uchybienia stylistyczne i językowe: Doktorantka nadużywa w polskojęzycznym fragmencie rozprawy takich sformułowań jak: „w oparciu” czy „opartych” zamiast „metodą/sposobem”, czy „zawierające w swej strukturze”; „w celu” zamiast „dla”, „aby”; „na podstawie” (nagminnie) zamiast „zgodnie”, „stosownie do”; „poświęcona” zamiast „dotyczy”; „skupiono się” zamiast „skoncentrowano się”.

Praca jest napisana poprawnie, wyraźnie wyczuwa się presję terminu złożenia pracy czy terminu zakończenia realizowanych grantów, stąd wiele potknięć.

W konkluzji, nie mam innych uwag merytorycznych i formalnych.

Autorka wykonała ogromną liczbę eksperymentów, wykazała umiejętność analizy otrzymywanych wyników i łączeniu ich struktury chemicznej z modelem odpowiedzi aktywności farmakologicznej. Doktorantka osiągnęła cztery cele, które postawiła sobie na pierwszych stronach dysertacji. Zaprezentowany materiał literaturowy, dyskusyjny i doświadczalny jest wystarczający do podjęcia decyzji przez recenzentkę o dopuszczeniu do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Praca doktorska mgr inż. Marioli Stypik spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z punktami 1- 4 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r (Dz.U. 2018 poz. 1668 art. 187). Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

