
Wydział Farmaceutyczny
Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej
Prof. dr hab. n. farm. inż. Dorota Gabriela Piotrowska

Łódź 3 lipca 2023

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Marioli Stypik zatytułowanej

„Opracowanie i synteza innowacyjnych związków małowcząsteczkowych, inhibitorów kinazy PI3K, jako potencjalnych leków w leczeniu toczenia rumieniowatego oraz innych chorób zapalnych i autoimmunologicznych” przedstawiona Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej w celu uzyskania stopnia doktora nauk chemicznych

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana w ramach współpracy pomiędzy Politechniką Warszawską a firmą farmaceutyczną Celon Pharma S.A. Zadaniem badawczym jakiego podjęła się mgr inż. Mariola Stypik było zaprojektowanie i synteza inhibitorów kinazy PI3K δ , analiza właściwości fizykochemicznych i biologicznych, a następnie powiększenie skali w celu otrzymania wyselekcjonowanego inhibitora w ilości niezbędnej do wykonania badań toksykologicznych, które warunkują możliwość wejście w pierwszą fazę badań klinicznych.

Kinaza 3-fosfatydylinozytolu (PI3K) jest enzymem białkowym biorącym udział w kluczowych procesach komórkowych, w tym proliferacji, produkcji cytokin czy apoptozy, a jego nadmierną aktywność obserwuje się w przypadku wystąpienia chorób zapalnych, autoimmunologicznych i nowotworów. Stanowią one zatem doskonały cel terapeutyczny w poszukiwaniu nowych substancji leczniczych. Tematyka podjęta w ramach doktoratu wdrożeniowego mgr inż. Marioli Stypik jest zatem wysoce aktualna w aspekcie odpowiedzi na bieżące potrzeby współczesnej medycyny.

Dysertacja przygotowana została w formie komentarza do spójnego tematycznie cyklu trzech współautorskich, wysoko punktowanych prac o zasięgu międzynarodowym. W świetle oświadczeń współautorów i deklarowanego udziału samej Doktorantki w powstanie wspomnianych prac, zastosowanie takiej formy przygotowania rozprawy doktorskiej jest w pełni uzasadnione. Przedstawiona dokumentacja jednoznacznie potwierdza bowiem wiodącą rolę Doktorantki w powstanie koncepcji przedstawionych badań, w opracowaniu metod syntezy

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

90-151 Łódź | ul. Muszyńskiego 1
tel. (042) 677 92 33
e-mail: dorota.piotrowska@umed.lodz.pl
www.umed.pl

zaprojektowanych związków, potwierdzeniu ich budowy i czystości, a także udział w interpretacji wyników badań właściwości fizykochemicznych i biologicznych wykonanych w ramach współpracy z poszczególnymi działami badawczo-rozwojowymi firmy Celon Pharma S.A. Najważniejszym i wartym podkreślenia jest fakt istotnego wkładu Doktorantki w przygotowanie manuskryptów; mgr inż. Mariola Stypik jest pierwszym i korespondencyjnym autorem dwóch z trzech prac ww. cyklu.

Opis prac własnych poprzedzony został krótkim wprowadzeniem, w którym Doktorantka przedstawiła zwięzłą charakterystykę kinazy PI3K oraz opisała znane inhibitory tego enzymu. Taki wstęp jest ważny z punktu widzenia podjętych badań i doskonale uzasadnia kierunek podjętych modyfikacji strukturalnych w poszukiwaniu potencjalnych inhibitorów.

Cel i zakres pracy zostały jednoznacznie zdefiniowane, a poszczególne cele badawcze racjonalnie zaplanowane. Na podkreślenie zasługuje interdyscyplinarny charakter prowadzonych badań. Wyniki prac badawczych Doktorantka opisała w kolejnych podrozdziałach, które korelują z wynikami opublikowanymi w odpowiednich publikacjach (publikacje **P2–P3**).

Projektowanie i synteza serii nowych związków, potencjalnych selektywnych inhibitorów kinazy PI3K δ , poprzedzone zostały szczegółowym przeglądam literatury, badaniami czystości patentowej oraz poparte wynikami modelowania molekularnego. Wybór podstawników wprowadzonych do szkieletu bicyklicznego układu pirazolo[1,5-*a*]pirymidynowego sfunkcjonalizowanego w pozycji C7 ugrupowaniem morfolin-4-ylowym dokonany został w sposób w pełni przemyślany, w którym nie ma miejsca na przypadkowość. Uwzględnione zostało największe prawdopodobieństwo wiązania potencjalnego liganda z białkiem. Łącznie otrzymano ponad 100 nowych pochodnych, sfunkcjonalizowanych ugrupowaniem indolowym (publikacja **P1**) oraz benzimidazolowym (publikacja **P2**), co wymagało opracowania wieloetapowych ścieżek syntetycznych, obejmujących konstrukcję centralnego układu pirazolo[1,5-*a*]pirymidynowego, a następnie jego dalszą funkcjonalizację odpowiednimi podstawnikami. Z zadania opracowanie dogodnych metod syntezy zaprojektowanych związków Doktorantka wywiązała się znakomicie. Przedstawione dowody strukturalne nie budzą wątpliwości. Mgr inż. Mariola Stypik udowodniła, że doskonale opanowała warsztat syntetyczny, swobodnie posługuje się również nowoczesnymi metodami identyfikacji związków organicznych o złożonej strukturze.

W ramach badań nad pierwszą serią pochodnych (publikacja **P1**) dokonano optymalnego wyboru podstawników w pozycji C2 w cząsteczce 7-(morfolin-4-yl)pirazolo[1,5-*a*]pirymidyny

tj. ugrupowania *N*-*tert*-butylopiperazyn-1-yłowego i 4-(2-hydroksypropan-2-ylo)piperydyn-1-yłowego, a następnie zsyntezowano analogi odpowiednio sfunkcjonalizowane w pozycji C5 głównego rdzenia pirazolo[1,5-*a*]pirymidyny, spośród których najbardziej selektywne wobec kinazy PI3K okazały się pochodne azaindolu i fluoroindolu. Największym osiągnięciem tej części projektu było wyselekcjonowanie spośród 33 związków 4-{2-[(4-*tert*-butylopiperazyn-1-yl)metylo]-5-{1*H*-pirolo[2,3-*c*]pirydyn-4-yl}pirazolo[1,5-*a*]pirymidyn-7-ylo}morfoliny (związek oznaczony jako CPL302253). Na podstawie wykonanego dla tej pochodnej dokowania molekularnego Doktorantka wnioskuje, że za silne oddziaływanie badanego związku z tzw. „półką tryptofanową” Trp-760, odpowiada hydrofobowa grupa *N*-*tert*-butylowa fragmentu *N*-*tert*-butylopiperazyny. W opublikowanych wcześniej badaniach przedklinicznych potwierdzono wysoką stabilność metaboliczną oraz dobrą rozpuszczalność tego związku. Podkreślić należy, że związek ten został wyselekcjonowany jako obiecujący kandydat do badań klinicznych w kierunku leczenia astmy.

Kontynuując prace nad sfunkcjonalizowanymi pochodnymi pirazolo[1,5-*a*]pirymidyny zaprojektowana została kolejna seria pochodnych (publikacja **P2**). Badania nad tą częścią projektu zaowocowały otrzymaniem kolejnych 48 pochodnych. Przy czym na podstawie analizy struktura-aktywność ustalono, że optymalnym fragmentem strukturalnym w pozycji C2 głównego rdzenia cząsteczki, tj. w pirazolo[1,5-*a*]pirymidynie, jest 2-(difluorometylo)-1*H*-benzimidazol-1-il. W dalszym rozwinięciu tej części badań podjęte zostały prace nad optymalizacją budowy podstawnika w pozycji C2 w pirazolo[1,5-*a*]pirymidynie, przy czym odpowiednie fragmenty heterocykliczne połączone zostały mostkiem metylenowym albo funkcją karbonylową. Skuteczność przyjętej strategii potwierdza wyselekcjonowanie spośród otrzymanej biblioteki związków pięciu pochodnych, dla których aktywność inhibicyjna wobec PI3K δ , wyrażona wartościami IC₅₀ mieściła się w zakresie 18 – 52 nM. W dalszym rozwinięciu, analizując aktywność enzymatyczną i komórkową, stabilność metaboliczną oraz stopień wiązania z białkiem, a także inne ważne parametry farmakokinetyczne i farmakodynamiczne, wyselekcjonowany został najbardziej obiecujący inhibitor PI3K δ tj. 1-{2-[(4-*tert*-butylopiperazyn-1-ylo)metylo]-7-(morfolin-4-ylo)pirazolo[1,5-*a*]pirymidyn-5-ylo}-2-(difluorometylo)-1*H*-benzimidazol (oznaczony w dalszych badaniach kodem: CPL302415). W oparciu o dokowanie molekularne wykazano, że CPL302415 tworzy wiązania wodorowe z Val-828 oraz Lys-779, dodatkowo potwierdzono oddziaływania z „półką tryptofanową” – Trp-760. Na podstawie analizy rozpuszczalności, stabilności mikrosomalnej, przepuszczalności przez błony i zdolności do wiązania innych białek Doktorantka postuluje, że CPL302415 wykazuje wysoki potencjał terapeutyczny. Niezaprzeczalnym sukcesem, stanowiącym zwieńczenie prac

Doktorantki nad benzimidazolowymi pochodnymi pirazolo[1,5-*a*]pirymidyny, jest wdrożenie technologii syntezy CPL302415. Opracowanie syntezy tego związku w większej skali, poprzedzone zostało niezbędną analizą kosztów. Procedura technologiczna syntezy ww. związku w skali jednego kilograma umożliwi poddanie go badaniom toksykologicznym, a w przypadku pozytywnych wyników badań przedklinicznych w dalszej perspektywie, jak postuluje Doktorantka, CPL302415 może stać się doskonałym kandydatem do pierwszej fazy badań klinicznych w leczeniu toczenia rumieniowatego.

Logicznym rozwinięciem prowadzonych z rozmachem prac syntetycznych było zaprojektowanie kolejnych serii związków obejmujących modyfikację struktury wiodącej poprzez wprowadzenie do CPL302415 dodatkowego podstawnika w pozycji C3. Trudno jednak odnieść się merytorycznie do analizy aktywności inhibicyjnej tych związków, ponieważ w chwili złożenia pracy do recenzji manuskrypt opisujący wyniki badań nad tą klasą połączeń był w trakcie przygotowania.

Należy podkreślić istotny udział Doktorantki w opracowaniu nowego modelu predykcji aktywności związków w oparciu o dokowanie molekularne połączone z odpowiednim modelem matematycznym (publikacja **P3**). Weryfikacja opracowanej metody wymagała porównania danych otrzymanych z modelu obliczeniowego z wynikami aktywności związków otrzymanymi w badaniach *in vitro* (wartości IC₅₀). W tym celu Doktorantka zaplanowała syntezy i otrzymała serię fluorowanych pochodnych CPL302415, dla których wykonano badania aktywności inhibicyjnej wobec badanego enzymu.

Podsumowując prace badawcze przedstawione w rozprawie doktorskiej mgr inż. Stypik pragnę podkreślić, że zostały one zaplanowane racjonalnie, a poszczególne cele konsekwentnie realizowane. Na uznanie zasługuje metodyczne podejście do badanych zagadnień. Doktorantka udowodniła, że potrafi pracować zespołowo, angażując się w interpretację wyników na każdym etapie realizacji projektu. Oprócz pozytywnej oceny merytorycznej dysertacji, którą charakteryzuje wysoki stopień trudności związany z interdyscyplinarnym charakterem prowadzonych badań, na podkreślenie zasługuje również to, że napisana ona została poprawnym językiem, choć Doktorantce nie udało się uniknąć nieprecyzyjnych sformułowań:

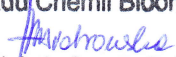
- str 24: „*dobra rozpuszczalność kinetyczna*” jest dość niezręcznym podsumowaniem wyników badania kinetyki rozpuszczalności związku CPL302253;
- str. 23: analizując modyfikacje strukturalne w serii pochodnych 7-(morfolin-4-ylo)pirazolo[1,5-*a*]pirymidyny Doktorantka opisuje wprowadzone zmiany w kategoriach amin użytych do ich syntezy tj. N-*tert*-butylo-piperazyny oraz 2-(piperydyn-4-

ylo)propan-2-olu. Nie jest to oczywiście błędem, choć posługiwanie się nazwami odpowiednich podstawników [tj. odpowiednio grupa *N-tert*-butylopiiperazyn-1-yłowa i 4-(2-hydroksypropan-2-ylo)piperdyn-1-yłowa] w odniesieniu do rozpatrywanych modyfikacji struktury jest zdecydowanie precyzyjniejsze, ponieważ w ten sposób jednoznacznie określa się sposób łączenia podstawnika z głównym szkieletem modyfikowanej cząsteczki.

Mgr inż. Mariola Stypik jest młodym naukowcem, o wyróżniającym dorobku naukowym, na który składa się 7 prac oryginalnych opublikowanych w latach 2015–2022 w wysoko punktowanych czasopismach z listy JCR oraz jeden patent międzynarodowy. W swoim dorobku posiada również wystąpienia (komunikaty/postery) zaprezentowane na zjazdach krajowych i zagranicznych.

Podsumowując, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że praca mgr inż. Marioli Stypik spełnia kryteria ustawowe stawiane rozprawom doktorskim (*Ustawa z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce; Dz.U. z 2020 r. poz. 85 z późniejszymi zmianami*). Wnoszę zatem do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoki poziom przeprowadzonych badań, aktualność tematyki badawczej i walory aplikacyjne wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

KIEROWNIK
Zakładu Chemii Bioorganicznej

prof. dr hab. Dorota G. Piotrowska

Wydział Farmaceutyczny
Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej
prof. dr hab. n. farm. inż. Dorota Gabriela Piotrowska

Łódź 3 lipca 2023

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne
Prof. dr hab. inż. Janusz Zachara
Politechnika Warszawska
Ul. Noakowskiego 3
00-664 Warszawa

Jako recenzent pracy doktorskiej mgr inż. Marioli Stypik zatytułowanej „*Opracowanie i synteza innowacyjnych związków małocząsteczkowych, inhibitorów kinazy PI3K, jako potencjalnych leków w leczeniu toczenia rumieniowatego oraz innych chorób zapalnych i autoimmunologicznych*”, biorąc pod uwagę wysoki poziom przeprowadzonych badań i aktualność tematyki badawczej, zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy.

W mojej ocenie praca doktorska mgr Stypik wnosi istotny wkład w wiedzę na temat właściwości pochodnych pirazolo[1,5-*a*]pirymidyny i możliwości ich wykorzystania jako skutecznych inhibitorów kinazy PI3K. Wykonane zostały wielokierunkowe badania obejmujące zarówno syntezę nowych związków organicznych oraz ocenę aktywności biologicznej. Należy podkreślić, że poszukiwanie nowych skutecznych leków w terapii chorób zapalnych i autoimmunologicznych jest uzasadnione wciąż rosnącymi potrzebami współczesnej medycyny.

Na wyróżnienie zasługuje wysoki poziom i szeroki zakres przeprowadzonych prac badawczych. Doktorantka doskonale opanowała warsztat badawczy właściwy dla uprawianej dziedziny, w tym techniki syntezy i identyfikacji związków organicznych oraz modelowanie molekularne. W ramach współpracy z poszczególnymi działami badawczo-rozwojowymi firmy Celon Pharma S.A. przeprowadzono kompleksowe badania aktywności biologicznej, a Doktorantka uczestniczyła w interpretacji wyników na każdym etapie realizacji projektu. Wyniki uzyskane przez mgr inż. Stypik mają wartość naukową nie tylko z punktu widzenia poznawczego, ale również

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

90-151 Łódź | ul. Muszyńskiego 1
tel. (042) 677 92 33
e-mail: dorota.piotrowska@umed.lodz.pl
www.umed.pl

aplikacyjnego (wdrożenie technologii syntezy najaktywniejszej pochodnej uzyskanej w ramach realizowanego projektu).

Wyniki prac opublikowane zostały w trzech wysoko punktowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym (dwie prace w *Pharmaceuticals* oraz jedna w *Molecules*), a Doktorantka jest pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym w dwóch pracach.

Doktorantka udowodniła, że potrafi w sposób przemyślany i systematyczny planować kolejne etapy prac badawczych, tak aby skutecznie rozwiązywać problemy naukowe.

W podsumowaniu, biorąc pod uwagę aktualność podjętej tematyki badawczej, a przed wszystkim całokształt przeprowadzonych prac badawczych i uzyskane wyniki stwierdzam, że rozprawa doktorska przygotowana przez mgr inż. Stypik przewyższa przeciętne wymagania stawiane pracom doktorskim w zakresie nauk chemicznych.

Łączę wyrazy uszanowania,



Dorota G. Piotrowska