

**mgr Barbara Dymek**

**Opracowanie drobnocząsteczkowego inhibitora chitotriozydazy  
(CHIT1) oraz weryfikacja CHIT1 jako nowego celu  
terapeutycznego w leczeniu śródmiąższowych chorób płuc**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu  
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: prof. dr hab. Rafał Krenke

Promotor pomocniczy: dr Karolina Dzwonek

Pracę wykonano w laboratoriach Molecure S.A  
w ramach programu Doktorat Wdrożeniowy  
realizowanym w Studium Medycyny Molekularnej  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2022 r.

**Słowa kluczowe:** inhibitory CHIT1, śródmiąższowe choroby płuc, sarkoidoza, idiopatyczne włóknienie płuc, odkrywanie leku

**Keywords:** CHIT1 inhibitors, interstitial lung diseases, sarcoidosis, idiopathic pulmonary fibrosis, drug discovery



*Wykonanie niniejszej pracy możliwe było dzięki wsparciu finansowemu udzielonemu przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Doktorat Wdrożeniowy 50//DW/2017/01/1) oraz Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (POIR.01.01.01-00-0168/15, POIR.01.01.01-00-0551/15, (MAZOWSZE/0128/19).*



## **Podziękowania**

*Składam serdecznie podziękowania:*

*Promotorowi, Panu Profesorowi Rafałowi Krenke za życzliwość i cenne wsparcie merytoryczne.*

*Promotor Pomocniczej, dr Karolinie Dzwonek, za inspirację i motywację do pracy naukowej, samorozwoju oraz nieocenione wsparcie w wielu trudnych momentach.*

*Wszystkim aktualnym i byłym pracownikom Molecure SA, w szczególności Agnieszce Zagożdżon, Michałowi Mląckiemu, Piotrkowi Sklepkiwiczowi, Ani Siwińskiej, Pauli Stańczak, Pawłowi Dobrzańskiemu i Zbyszkowi Zastonie, za stworzenie niezwykle przyjaznego miejsca pracy oraz nieoceniony wkład w badania nad chitynazami.*

*Pracownikom Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, w szczególności dr hab. Magdalenie Paplińskiej-Gorycy, dr Patrycji Nejman-Gryz oraz mgr Małgorzacie Proboszcz, za niezwykle udaną współpracę naukową i okazywaną życzliwość.*

*Wszystkim współautorom publikacji, które są podstawą tej rozprawy.*

*Rodzinie i bliskim, w szczególności Rodzicom, Siostrze i Chrzestnej za wsparcie i niezachwianą wiarę, że dam radę.*

*Mężowi i Córce – za to, że zawsze są blisko.*

## Spis treści

1	Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską .....	7
2	Streszczenie w języku polskim .....	8
3	Streszczenie w języku angielskim .....	10
4	Wykaz stosowanych skrótów .....	12
5	Wstęp.....	13
5.1	Śródmiąższowe choroby płuc .....	13
5.1.1	Idiopatyczne włóknienie płuc.....	13
5.1.2	Sarkoidoza.....	15
5.2	Chitynazy .....	18
5.2.1	Rodzina białek.....	18
5.2.1	Struktura białka CHIT1 .....	18
5.2.2	Ekspresja białka CHIT1 .....	19
5.3	CHIT1 jako potencjalny cel terapeutyczny .....	20
5.3.1	Rola CHIT1 w procesach zapalnych i fibrotycznych.....	20
5.3.2	Ekspresja CHIT1 w śródmiąższowych chorobach płuc, ze szczególnym uwzględnieniem idiopatycznego włóknienia płuc i sarkoidozy .....	20
5.3.3	Inhibitory chitynaz – AMCCase i CHIT1 .....	22
6	Założenia i cele pracy .....	25
7	Kopie opublikowanych prac .....	26
7.1	<i>Discovery of OATD-01, a first-in-class chitinase inhibitor as potential new therapeutics for idiopathic pulmonary fibrosis</i> .....	26
7.3	<i>Inhibition of CHIT1 as a novel therapeutic approach in idiopathic pulmonary fibrosis</i> .....	41
7.5	<i>Pharmacological inhibition of chitotriosidase (CHIT1) as a novel therapeutic approach for sarcoidosis</i> .....	55
8	Podsumowanie wyników .....	70
9	Wnioski .....	72
10	Piśmiennictwo do rozdziałów w języku polskim .....	73
11	Oświadczenia współautorów .....	81
12	Opinia Komisji Bioetycznej.....	130

# 1 Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską

1. Koralewski R, **Dymek B**, Mazur M, Sklepkiewicz P, Olejniczak S, Czestkowski W, Matyszewski K, Andryianau G, Niedziejko P, Kowalski M, Gruza M, Borek B, Jedrzejczak K, Bartoszewicz A, Pluta E, Rymaszewska A, Kania M, Rejczak T, Piasecka S, Mlacki M, Mazurkiewicz M, Piotrowicz M, Salamon M, Zagozdzon A, Napiorkowska-Gromadzka A, Bartłomiejczak A, Mozga W, Dobrzański P, Dzwonek K, Golab J, Nowotny M, Olczak J, Golebiowski A. **Discovery of OATD-01, a first-in-class chitinase inhibitor as potential new therapeutics for idiopathic pulmonary fibrosis**. J Med Chem. 2020; 63(24):15527-15540

Praca oryginalna

Punktacja MEiN: 200

Impact Factor: 7,446

2. Sklepkiewicz P\*, **Dymek B\***, Mlacki M, Koralewski R, Mazur M, Nejman-Gryz P, Korur S, Zagozdzon A, Rymaszewska A, von der Thüsen JH, Siwińska AM, Güner NC, Cheda Ł, Paplinska-Goryca M, Proboszcz M, van den Bosch TPP, Górka K, Golab J, Kamiński RM, Krenke R, Golebiowski A, Dzwonek K, Dobrzanski P. **Inhibition of CHIT1 as a novel therapeutic approach in idiopathic pulmonary fibrosis**. Eur J Pharmacol. 2022; 919:1-13

\* równoważne współautorstwo

Praca oryginalna

Punktacja MEiN: 100

Impact Factor: 5,195

3. **Dymek B**, Sklepkiewicz P, Mlacki M, Güner NC, Nejman-Gryz P, Drzewicka K, Przysucha N, Rymaszewska A, Paplinska-Goryca M, Zagozdzon A, Proboszcz M, Krzemiński Ł, von der Thüsen JH, Górka K, Dzwonek K, Zastona Z, Dobrzanski P, Krenke R. **Pharmacological inhibition of chitotriosidase (CHIT1) as a novel therapeutic approach for sarcoidosis**. J Inflamm Res. 2022; 15:5621-5634

Praca oryginalna

Punktacja MEiN: 140

Impact Factor: 4,631

łącznie punktacja MEiN: 440

łącznie IF cyklu publikacji: 17,272

## 2 Streszczenie w języku polskim

Śródmiąższowe choroby płuc to heterogenna grupa schorzeń charakteryzujących się różnym nasileniem i typem zmian zapalnych, którym może towarzyszyć nieodwracalne włóknieniem miąższu płucnego. Choroby te cechują się zróżnicowaną etiologią, obrazem klinicznym, przebiegiem oraz rokowaniem. Poszczególne choroby śródmiąższowe płuc należą do chorób rzadkich, ale sumarycznie dotyczą znacznej liczby pacjentów i, pomimo postępów w diagnostyce i terapii, nadal pozostają grupą schorzeń stanowiącą istotny problem społeczny i medyczny. Chitotriozydaza (CHIT1) należy do rodziny hydrolaz glikozydów GH18 i jest jedną z dwóch aktywnych enzymatycznie chitynaz u ssaków. CHIT1 to białko zaangażowane w procesy zapalne i włóknieniowe w płucach, które przedstawiane jest jako potencjalny nowy cel terapeutyczny w schorzeniach, u podstaw patobiologii których leży nieprawidłowa odpowiedź immunologiczna lub nadmierne odkładanie się białek macierzy zewnątrzkomórkowej. Ze względu na niedostateczną skuteczność dostępnych leków lub efekty uboczne terapii stosowanych w śródmiąższowych chorobach płuc, poszukiwane są substancje, których działanie oparte byłoby na nowym mechanizmie działania. Inhibicja CHIT1 może stanowić potencjalne nowe podejście terapeutyczne w leczeniu wybranych chorób należących do śródmiąższowych chorób płuc.

W niniejszej rozprawie doktorskiej przedstawiono wyniki badań nad ekspresją i aktywnością CHIT1 z wykorzystaniem materiałów biologicznych od pacjentów ze śródmiąższowymi chorobami płuc, opisano prace prowadzące do identyfikacji drobnocząsteczkowego inhibitora CHIT1, a w dalszej części przedstawiono proces charakteryzacji wyłonionego związku pod kątem jego właściwości farmakokinetycznych, farmakodynamicznych i farmakologicznych z wykorzystaniem modeli *in vitro* i *in vivo*. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń i analiz przedstawione zostały w formie cyku opublikowanych artykułów, z których każdy stanowi integralny element rozprawy doktorskiej.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że u pacjentów z idiopatycznym włóknieniem płuc obserwuje się znaczące podwyższenie aktywności i stężenia CHIT1 w surowicy i indukowanej plwocinie a gen *CHIT1* stanowi marker subpopulacji profibrotycznych makrofagów swoistych dla chorych ze śródmiąższowymi chorobami płuc. Pacjentów z sarkoidozą charakteryzuje znacznie podwyższona aktywność chitynolityczna oraz stężenie CHIT1 w surowicy. Co więcej, zaobserwowano także silną ekspresję CHIT1 w patologicznych zmianach ziarniniakowych obecnych w preparatach biopsyjnych węzłów chłonnych śródpiersia i błony śluzowej oskrzeli. OATD-01 jest nowym drobnocząsteczkowym inhibitorem CHIT1 o pożądanym profilu farmakokinetycznym i farmakodynamicznym. Wykazano, że OATD-01 jest aktywny *in vitro* i wpływa na zmniejszenie sekrecji prozapalnych mediatorów przez makrofagi wyizolowane z popłuczyn pęcherzykowo-oskrzelowych chorych na idiopatyczne włóknienie płuc i sarkoidozę. Inhibitor OATD-01 wykazał także efekt terapeutyczny w mysich modelach włóknienia

płuc i zapalenia ziarniniakowego, w których to modelach podanie inhibitora wpłynęło odpowiednio na ograniczenie włóknienia płuc oraz na zmniejszenie liczby patologicznych zmian w płucach.

Podsumowując, CHIT1 jest białkiem o podwyższonej ekspresji u pacjentów ze śródmiąższowymi chorobami płuc takimi jak idiopatyczne włóknienie płuc i sarkoidoza, a inhibicja CHIT1 z wykorzystaniem OATD-01 – nowego inhibitora o korzystnym profilu farmakologicznym, może stanowić skuteczne podejście terapeutyczne w schorzeniach z tej grupy.

### 3 Streszczenie w języku angielskim

#### Discovery and development of small-molecule chitotriosidase 1 (CHIT1) inhibitor and validation of CHIT1 as a new therapeutic target for the treatment of interstitial lung diseases

Interstitial lung diseases comprise a heterogeneous group of disorders characterized by the presence of inflammation of varying degrees, in some cases with accompanying irreversible fibrosis affecting the pulmonary interstitium. These diseases differ in etiology, clinical manifestation and outcome. Numerous interstitial lung diseases are considered to be rare, but collectively they affect a significant number of patients and remain a considerable social and medical problem despite the progress in diagnosis and therapy. Chitotriosidase (CHIT1) belongs to the GH18 glycoside hydrolase family and is one of two enzymatically active chitinases in mammals. CHIT1 is a protein involved in inflammatory and fibrotic processes in the lungs and it is considered a potential new therapeutic target in those diseases in which pathology is linked to abnormal immune response or excessive accumulation of extracellular matrix proteins. Due to the limited effectiveness or side effects of currently available therapies, new drugs with novel mechanism of action are pursued. CHIT1 inhibition may represent a new therapeutic approach in the treatment of several conditions that are classified as interstitial lung diseases.

This PhD thesis presents the results of studies on the expression and activity of CHIT1 in biological materials from patients with interstitial lung diseases, describes the process of the identification of a small-molecule CHIT1 inhibitor and presents the characterization of the pharmacokinetic, pharmacodynamic and pharmacological properties of the selected compound using *in vitro* and *in vivo* models. The results of the conducted experiments and analyzes were presented in the form of a series of original research articles, which constitute an integral part of this thesis.

The results of the studies indicate a significant increase in the activity and concentration of CHIT1 in serum and induced sputum in patients with idiopathic pulmonary fibrosis, with *CHIT1* gene being a marker of a subpopulation of profibrotic macrophages specific for patients with fibrosing interstitial lung diseases. Patients with sarcoidosis are characterized by a significantly increased chitinolytic activity and serum CHIT1 concentration. Moreover, a strong expression of CHIT1 was demonstrated in pathological granulomas present in biopsy specimens of mediastinal lymph nodes and bronchial mucosa. OATD-01 is a novel small-molecule CHIT1 inhibitor with a favorable pharmacokinetic and pharmacodynamic profile. The compound was shown to be active *in vitro* and to reduce the secretion of pro-inflammatory mediators by macrophages isolated from the bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis. Administration of OATD-01 inhibitor



reduced pulmonary fibrosis and decreased the number of lung lesions in murine models of lung fibrosis and granulomatous inflammation, respectively.

In summary, CHIT1 is a protein with expression upregulated in patients with interstitial lung diseases such as idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis. Inhibition of CHIT1 with OATD-01 - a novel inhibitor with a favorable pharmacological profile, may serve as an effective therapeutic approach in this group of diseases.

## 4 Wykaz stosowanych skrótów

Skrót	Pełna nazwa w języku angielskim	Pełna nazwa w języku polskim
AMCase	<i>acidic mammalian chitinase</i>	kwaśna chitynaza ssacza
BALf	<i>bronchoalveolar lavage fluid</i>	popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe
CBD	<i>chitin binding domain</i>	domena wiążąca chitynę
CBM 14	<i>carbohydrate-binding module family 14</i>	rodzina 14-ta modułów wiążących węglowodany
CCL4	<i>CC motive chemokine ligand 4</i>	chemokina CC ligand 4
CHIT1	<i>chitotriosidase</i>	chitotriozydaza
CLP	<i>chitinase-like protein</i>	białko chitynazo-podobne
FGFR	<i>fibroblast growth factor receptor</i>	receptor dla czynnika wzrostu fibroblastów
GH	<i>glycoside hydrolase</i>	hydrolaza glikozydowa
GlcNAc	<i>β-1,4-N-acetylglucosamine</i>	β-1,4-N-acetyloglukozaminy
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>	czynnik wzrostu kolonii granulocytów i makrofagów
IL-17	<i>interleukin 17</i>	interleukina 17
LacdiNAc	<i>N,N'-diacetyllactosamine</i>	N,N'-diacetylolaktozoamina
LacNAc	<i>N-acetyllactosamine</i>	N-acetylolaktozamina
PDGFR	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>	receptor dla czynnika płytkopochodnego
scRNASeq	<i>single cell RNA sequencing</i>	sekwencjonowanie RNA pojedynczych komórek
TGFBRAP1	<i>TGF-β receptor associated protein 1</i>	białko 1 związane z receptorem TGFβ
TGFβ	<i>transforming growth factor β</i>	transformujący czynnik wzrostu β
TIM	<i>triosephosphate isomerase</i>	izomeraza triozofosforanowa
TNFα	<i>tumor necrosis factor α</i>	czynnik nekrozy nowotworu α
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>	receptor dla czynnika wzrostu naczyniowo-śródbłonkowego

## 5 Wstęp

### 5.1 Śródmiąższowe choroby płuc

Śródmiąższowe choroby płuc to heterogenna grupa schorzeń charakteryzujących się różnym nasileniem i typem zmian zapalnych oraz procesów włóknienia miąższu płucnego (Travis i in., 2013; Wijsenbeek i Cottin, 2020). Choroby te cechują się zróżnicowaną etiologią, obrazem klinicznym, przebiegiem oraz rokowaniem (Adegunsoye i Ryerson, 2021; Wijsenbeek i in., 2022). Poszczególne choroby śródmiąższowe płuc należą do chorób rzadkich, ale sumarycznie dotyczą znacznej liczby pacjentów i stanowią istotny problem zdrowotny i społeczny. Współczynnik chorobowości szacuje się na 76 przypadków chorób śródmiąższowych płuc na 100 000 osób w Europie i 74 przypadki na 100 000 osób w Stanach Zjednoczonych (Wijsenbeek i Cottin, 2020).

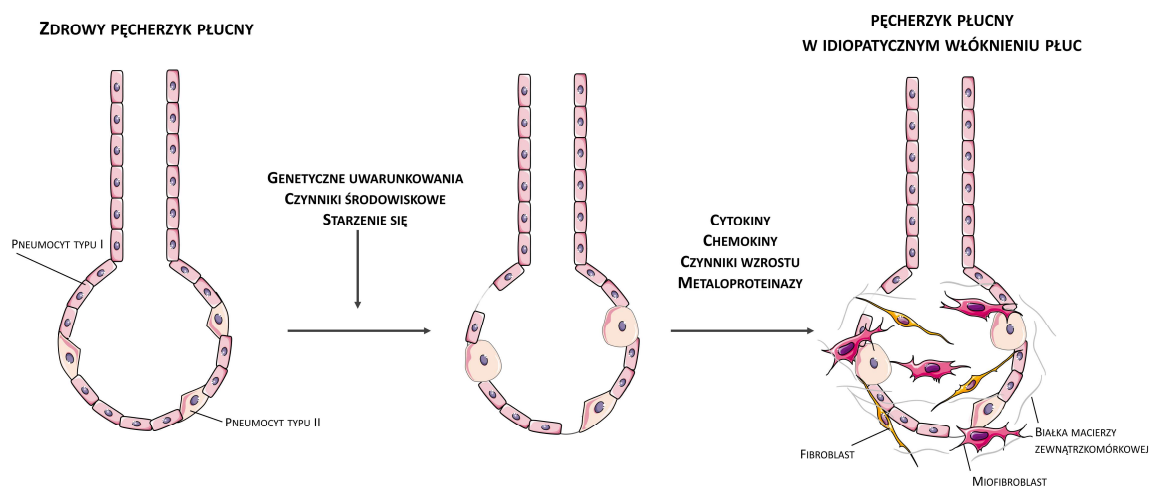
Do tej pory opisano ponad 200 różnych jednostek chorobowych należących do śródmiąższowych chorób płuc, ale z klinicznego punktu widzenia największe znaczenie mają sarkoidoza, idiopatyczne włóknienie płuc, alergiczne zapalenie pęcherzyków płucnych, pylice oraz choroby śródmiąższowe płuc związane z układowymi chorobami tkanki łącznej (Wijsenbeek i Cottin, 2020). Przyjmując za podstawę podziału etiologię choroby, śródmiąższowe choroby płuc można podzielić na schorzenia o znanej etiologii (obejmującej około 1/3 jednostek chorobowych należących do tej grupy) oraz schorzenia o nieznannej etiologii (blisko 2/3 pozostałych jednostek) (Ryerson i Collard, 2013). Do grupy chorób śródmiąższowych o znanej przyczynie zalicza się m.in choroby płuc powstałe w wyniku narażenia na szkodliwe czynniki środowiskowe, na przykład azbestoza czy beryloza,, schorzenia wywołane działaniem leków czy choroby śródmiąższowe płuc towarzyszące chorobom tkanki łącznej. Uważa się, że w przypadku śródmiąższowych chorób płuc o nieznannej etiologii znaczenie w ich inicjacji mają różnorodne, dokładnie nieokreślone czynniki środowiskowe, które wpływają na rozwój choroby u osób z genetycznymi predyspozycjami (Wijsenbeek i Cottin, 2020; Wijsenbeek i in., 2022).

#### 5.1.1 Idiopatyczne włóknienie płuc

Idiopatyczne włóknienie płuc jest postępującą, nieodwracalną chorobą włóknieniową, która charakteryzuje się uszkodzeniem komórek nabłonkowych, nadmierną produkcją fibrotycznej macierzy zewnątrzkomórkowej oraz przebudową śródmiąższu płuc. Jest to najczęściej występująca choroba spośród idiopatycznych śródmiąższowych zapaleń płuc. Charakteryzuje się złym rokowaniem, z medianą przeżycia od diagnozy wynoszącą od dwóch do pięciu lat (Ley i in., 2011; Hopkins i in., 2016; Strongman i in., 2018). Nieodwracalne uszkodzenie nabłonka oddechowego pęcherzyków płucnych prowadzi do przewlekłych zaburzeń czynności płuc i ostatecznie do ich niewydolności. Do najczęściej zgłaszanych

objawów idiopatycznego włóknienia płuc należy duszność oraz suchy kaszel, które nasilają się wraz z postępowaniem choroby, znacząco ograniczając jakość życia chorego (Kreuter i in., 2017).

Za zjawisko kluczowe dla patogenezy idiopatycznego włóknienia płuc uważa się powtarzające się lokalne mikrouszkodzenia komórek nabłonkowych pęcherzyków płucnych, w szczególności pneumocytów typu II, które w efekcie zaburzonego procesu reepitelizacji wydzielają różne mediatory prowadzące do różnicowania fibroblastów do miofibroblastów. Komórki te w wyniku aktywacji i nadmiernej produkcji białek macierzy zewnątrzkomórkowej (m.in. kolagenu) inicjują przebudowę i postępujące włóknienie śródmiąższu płuc (Richeldi i in., 2017). Zgodnie ze współczesną wiedzą idiopatyczne włóknienie płuc jest chorobą o złożonej, wieloczynnikowej etiopatogenezie, a znaczenie odgrywają w niej zarówno czynniki genetyczne (m.in. rzadkie warianty genów związanych z zaburzeniami w produkcji surfaktantów jak *SFTPC* czy dysfunkcją telomerów np. *TERT* i *TERC*) jak i środowiskowe (dym tytoniowy czy przewlekłe infekcje wirusowe) (Martinez i in., 2017; Richeldi i in., 2017). Najsilniejszym czynnikiem ryzyka rozwoju idiopatycznego włóknienia płuc jest jednak starszy wiek, a w płucach pacjentów obserwuje się często cechy przedwczesnego starzenia się komórek, szczególnie pneumocytów typu II, co sugeruje, że proces starzenia się płuc odgrywa kluczową rolę w rozwoju tej choroby (Martinez i in., 2017; Wolters i in., 2014).



**Rycina 1** Proponowany schemat etiopatogenezy idiopatycznego włóknienia płuc. W wyniku połączenia powtarzających się mikrouszkodzeń nabłonka na skutek działania czynników środowiskowych oraz procesu starzenia się komórek, u osób podatnych genetycznie dochodzi do nieprawidłowej aktywacji nabłonka. Aktywowane komórki nabłonkowe wydzielają różne mediatory o działaniu prowłóknieniowym, które aktywują fibroblasty i miofibroblasty do produkcji białek macierzy zewnątrzkomórkowej, co w efekcie prowadzi do włóknienia śródmiąższu płuc. Na podstawie Richeldi i in., 2017.

Współczynnik chorobowości dla idiopatycznego włóknienia płuc szacuje się na 8 do 60 przypadków na 100 000 osób i choroba ta występuje częściej w Europie i Ameryce Północnej

(Duchemann i in., 2017; Raghu i in., 2016). Idiopatyczne włóknienie płuc jest schorzeniem osób starszych, występuje głównie po 50 roku życia, a najczęściej u osób w wieku 70 lat lub starszych (Martinez i in., 2017).

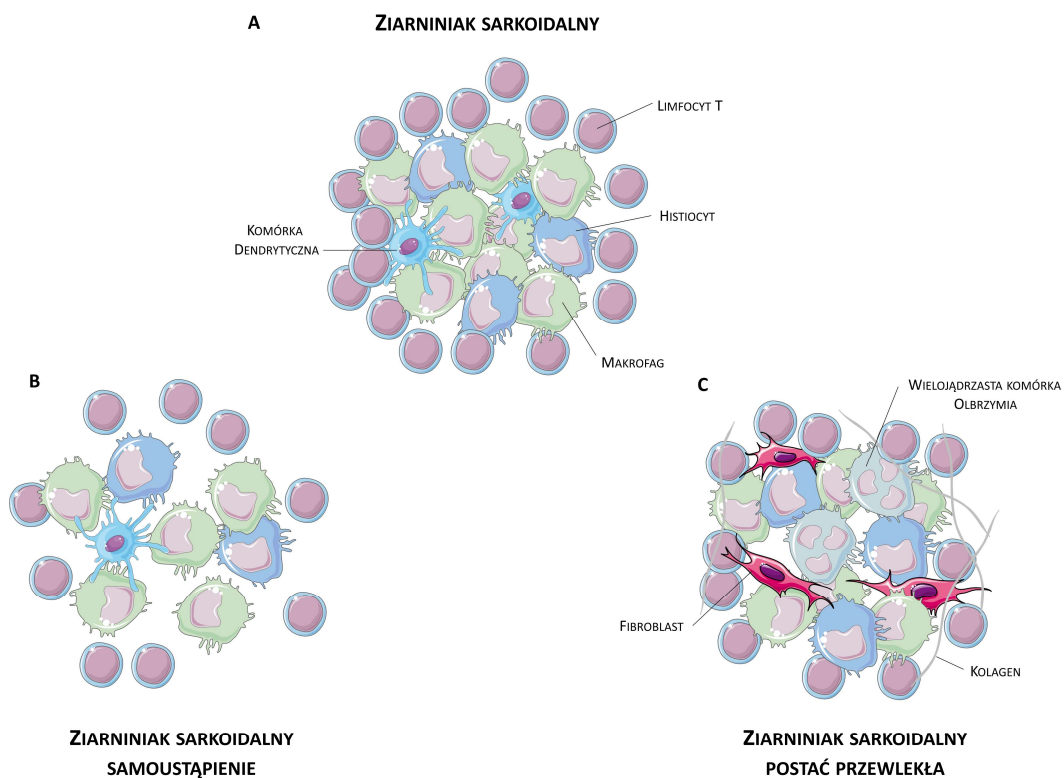
Aktualnie w leczeniu idiopatycznego włóknienia płuc stosuje się dwie substancje czynne – pirfenidon i nintedanib, które wpływają na spowolnienie progresji choroby oraz zmniejszenie tempa pogarszania się czynności płuc. Pirfenidon to lek o działaniu przeciwzapalnym oraz przeciwwłóknieniowym, którego mechanizm działania nie został w pełni opisany, ale uważa się, że substancja ta wpływa na zahamowanie proliferacji i aktywacji fibroblastów poprzez zmniejszenie poziomu transformującego czynnika wzrostu  $\beta 1$  (ang. *transforming growth factor  $\beta 1$* , TGF $\beta 1$ ). Drugi z zarejestrowanych leków - nintedanib jest inhibitorem kinaz tyrozynowych takich jak receptor dla czynnika wzrostu fibroblastów (ang. *fibroblast growth factor receptor*, FGFR), receptor dla czynnika wzrostu naczyniowo-śródbłonkowego (ang. *vascular endothelial growth factor receptor*, VEGFR) oraz receptor dla czynnika płytkopochodnego (ang. *platelet-derived growth factor receptor*, PDGFR). Poprzez zahamowanie aktywności wymienionych receptorów znajdujących się na powierzchni fibroblastów, nintedanib wpływa na ograniczenie migracji, proliferacji i różnicowania tych komórek (Wollin i in., 2015).

W niefarmakologicznym leczeniu idiopatycznego włóknienia płuc stosuje się rehabilitację oddechową oraz tlenoterapię w przypadku niewydolności oddechowej. Ze względu na fakt, że oba stosowane leki – pirfenidon i nintedanib tylko spowalniają postęp choroby, ale go nie zahamowują, część pacjentów jest poddawana przeszczepieniu płuca. Mając na względzie przewlekły, postępujący charakter idiopatycznego włóknienia płuc oraz ograniczenia dostępnych terapii, uzasadnione wydaje się poszukiwanie nowych terapii o potencjale zastosowania u pacjentów z tych schorzeniem.

### 5.1.2 Sarkoidoza

Sarkoidoza to choroba zapalna o nieznanym podłożu, która może przebiegać bezobjawowo lub z obecnością różnych objawów klinicznych – objawów ogólnych, takich jak zmęczenie, podwyższona temperatura ciała, utrata masy ciała, nocne poty lub objawów charakterystycznych, związanych z zajęciem konkretnego narządu. W około 90% przypadków sarkoidoza obejmuje płuca i węzły chłonne, dlatego też najczęściej obserwowane u chorych objawy dotyczą układu oddechowego i są to kaszel, ból w klatce piersiowej i duszność (Spagnolo i in., 2018; Grunewald i in., 2019). Zdecydowanie rzadziej sarkoidoza obejmuje inne narządy jak serce, narząd wzroku, skóra, układ nerwowy czy wątroba, a objawy są wtedy związane z uszkodzeniem zajętego narządu. U części chorych obserwuje się ostrą postać sarkoidozy, zwaną zespołem Löfgrena, która charakteryzuje się gorączką, bólem stawów i rumieniem guzowatym (Baughman i in., 2011).

Charakterystyczną cechą w obrazie histologicznym sarkoidozy jest występowanie nieserowaciejących ziarniakiów w narządach objętych chorobą (Rycina 2). Ziarniniaki są skupiskiem makrofagów oraz pochodzących od makrofagów komórek nabłonkowych – histiocytów oraz wielojądrzastych komórek olbrzymich utworzonych przez fuzję makrofagów, które otoczone są limfocytami T (Zissel i Müller-Quernheim, 2015). W pierwszym etapie tworzenia się ziarniakiów patologicznie aktywowane makrofagi uwalniają prozapalne mediatory m.in. czynnik nekrozy nowotworu  $\alpha$  (ang. *tumor necrosis factor  $\alpha$* , TNF $\alpha$ ) i interleukinę 17 (IL-17), które aktywują limfocyty T i tym samym inicjują ich migrację do miejsca tworzenia ziarniniaka. Makrofagi mogą w dalszej kolejności różnicować się do komórek nabłonkowych (histiocytów), które następnie na skutek fuzji tworzą wielojądrzaste komórki olbrzymie o obfitej cytoplazmie, średnicy kilkudziesięciu mikrometrów i z nawet kilkuset jądrami (Sakthivel i Bruder, 2017). W przewlekłej sarkoidozie często liczba napływowych limfocytów T zmniejsza się, natomiast ziarniniak zaczyna być otaczany przez fibroblasty, które odpowiadają za produkcję białek macierzy zewnątrzkomórkowej prowadząc do procesu włóknienia śródmiąższu płuc (Zissel i Müller-Quernheim, 2015; Grunewald i in., 2019).



**Rycina 2 Schemat budowy ziarniniaka sarkoidalnego** A) Ziarniniaki są skupiskiem makrofagów oraz pochodzących od makrofagów komórek nabłonkowych – histiocytów, które otoczone są limfocytami T. B) W przypadku samoistnie ustępującej postaci sarkoidozy, w wyniku procesu efektywnej odpowiedzi immunologicznej, ziarniniak ustępuje C) W chronicznej postaci sarkoidozy, makrofagi często na skutek fuzji tworzą wielojądrzaste komórki olbrzymie, jednocześnie w obrębie ziarniniaka zmniejsza się liczba napływowych limfocytów T, natomiast ziarniniak zaczyna być otaczany przez fibroblasty, które odpowiadają za produkcję białek macierzy zewnątrzkomórkowej np. kolagenu. Na podstawie Grunewald i in., 2019.

Współczynnik chorobowości na świecie szacuje się na 1 do 141 przypadków sarkoidozy na 100 000 osób. Odnotowuje się istotne różnice rasowe i geograficzne w występowaniu sarkoidozy. Choroba ta występuje częściej w Europie (szczególnie w krajach skandynawskich – współczynnik chorobowości wynoszący 11,5 przypadków na 100 000 mieszkańców Szwecji) oraz Ameryce Północnej wśród Afroamerykanów (współczynnik chorobowości 141 przypadków na 100 000 mieszkańców), a najrzadziej schorzenie to notuje się w populacji azjatyckiej (1 przypadek na 100 000 mieszkańców Korei Południowej) (Arkema i in., 2016; Baughman i in., 2016; Yoon i in., 2018). Sarkoidoza średnio ujawnia się u osób w wieku 40–55 lat, ale u mężczyzn często obserwuje się ją już w młodszym wieku (30-50 lat), natomiast u kobiet diagnozuje się ją najczęściej po 50 roku życia (Grunewald i in., 2019).

W znacznej części przypadków sarkoidoza nie wymaga leczenia, a choroba ulega samoograniczeniu i u pacjentów obserwuje się samoistną remisję. Jeśli sarkoidoza nie ma charakteru postępującego i nie obejmuje innych niż płuca narządów, może pozostawać nieleczona a jedynie monitorowana. U około 20-30% chorych przebieg sarkoidozy jest jednak postępujący, a choroba może powodować trwałe uszkodzenie narządów. (Baughman i in., 2021; Nunes i in., 2019) W przypadku sarkoidozy płuc może dojść do znaczącego, czasem nieodwracalnego, zaburzenia czynności płuc na skutek włóknienia śródmiąższu płuc (Jeny i in., 2016; Nunes i in., 2019). W przypadku postępującego zaburzenia funkcji płuc, sarkoidozy serca, układu nerwowego czy narządu wzroku, stosuje się leczenie objawowe w postaci leków przeciwzapalnych, które ograniczają wzrost ziarniniaków. Lekami pierwszego rzutu są doustne glikokortykosteroidy, a w dalszej kolejności stosuje się leki immunosupresyjne, np. metotreksat. (Baughman i Grutters, 2015). Pomimo niezaprzeczalnych krótkoterminowych korzyści dla pacjentów leczonych glikokortykosteroidami, korzyści długofalowe stosowania takiej terapii są często ograniczone. Możliwość zastosowania leków immunosupresyjnych w leczeniu sarkoidozy zwiększa opcje terapeutyczne w tej grupie chorych, jednak nadal nie wszyscy pacjenci uzyskują poprawę. Zastosowanie zarówno glikokortykosteroidów jak i leków immunosupresyjnych wiąże się także często z uciążliwymi efektami ubocznymi takimi jak: otyłość, zaburzenia gospodarki węglowodanowej, osłabienie odporności i ciężkie zakażenia, zaburzenia nastroju czy osteoporoza (Sellarés i in., 2020; Gerke, 2020). Skutkują one często decyzją o zaprzestaniu terapii. Biorąc pod uwagę odsetek pacjentów, u których aktualnie dostępne terapie nie są skuteczne a także znaczące skutki uboczne tych leków, sarkoidoza stanowi istotny problem medyczny, stąd potrzeba opracowania nowych terapii celowanych, które modyfikowałyby przebieg choroby, szczególnie w przypadku jej postępującej czy nawracającej postaci (Gerke, 2020).

## 5.2 Chitynazy

### 5.2.1 Rodzina białek

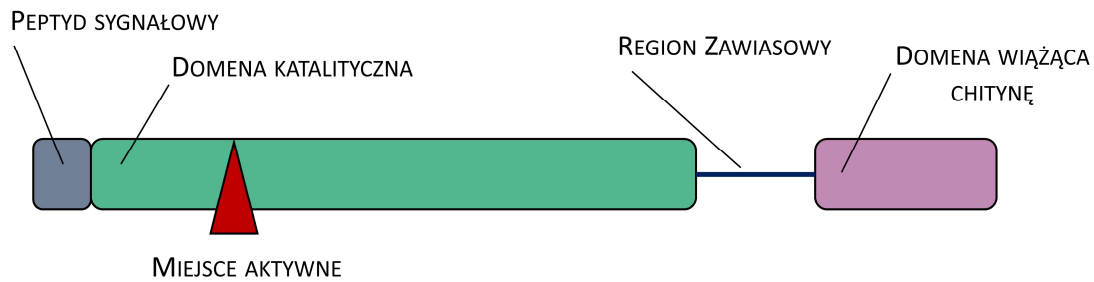
Chitynazy to powszechnie występujące białka obecne w wielu organizmach – od bakterii i grzybów, poprzez rośliny i owady, aż po ssaki. Chitynazy należą do bardzo dużej grupy hydrolaz glikozydowych, które zostały podzielone na 3 rodziny – hydrolazy glikozydowe (ang. *glycoside hydrolase*, GH) 18, GH 19 oraz GH 20. Powyższy podział uwzględnia znaczące różnice w strukturze oraz sekwencji aminokwasów. Większość chitynaz bakteryjnych, wszystkie chitynazy grzybów oraz owadów, a także część chitynaz ssaczy należy do rodziny GH 18. Chitynazy z rodziny GH 19 występują u niektórych bakterii oraz u roślin. Rodzina GH 20 składa się z N-acetyloglukozoaminidaz bakteryjnych, grzybowych oraz ludzkich o innej specyficzności substratowej niż rodziny GH 18 i GH 19. (Adrangi i Faramarzi, 2013)

Chitynazy to enzymy katalizujące hydrolizę chityny, stanowiącej nierozpuszczalny polimer zbudowany z monomerów  $\beta$ -1,4-N-acetyloglukozaminy (GlcNAc) połączonych za pomocą wiązań  $\beta$ -1,4-glikozydowych. U ludzi występują dwa białka z tej rodziny posiadające aktywność enzymatyczną - kwaśna chitynaza ssacza (ang. *acidic mammalian chitinase*, AMCCase) i chitotriozydaza (CHIT1) (Boot i in., 1998; Boot i in., 2001), ale także białka, które nie posiadają aktywności chitynolitycznej, nazywane białkami chitynazo-podobnymi (ang. *chitinase-like proteins*, CLPs), do których należą m.in. YKL-40, YKL-39 czy owiduktyna.

### 5.2.1 Struktura białka CHIT1

Pełnej długości białko CHIT1 jest zbudowane z N-końcowej domeny katalitycznej połączonej poprzez ok. 30-aminokwasowy region zawiasowy (ang. *hinge*) z C-końcową domeną wiążącą chitynę (ang. *chitin binding domain*, CBD) (Fadel i in., 2016) (Rycina 3). Domena katalityczna ma strukturę beczki ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> TIM (ang. *triosephosphate isomerase*), która jest cechą charakterystyczną rodziny hydrolaz GH 18. Silnie zakonserwowany motyw DXDXE w centrum aktywnym białka zawiera w pozycji 140 kwas glutaminowy (Glu), który stanowi kluczowy aminokwas katalizujący reakcję hydrolizy chityny (Van Aalten i in., 2001; Fadel i in., 2015). Domena wiążąca chitynę jest zaklasyfikowana do rodziny 14-tej modułów wiążących węglowodany (ang. *carbohydrate-binding module family 14*, CBM 14) i odpowiada za wiązanie chityny krystalicznej poprzez jej oddziaływanie z resztami aromatycznymi oraz silnie zakonserwowanymi resztami cysteiny tworzącymi mostki dwusiarczkowe (Fadel i in., 2016). Krótsza izoforma CHIT1 o masie 39 kDa składa się wyłącznie z domeny katalitycznej i w efekcie ma zdolność do hydrolizy krótkich oligomerów chityny, ale nie wiąże krystalicznej chityny w związku z brakiem domeny CBD (Renkema i in., 1997).





**Rycina 3 Schemat struktury białka CHIT1.** CHIT1 jest zbudowane z N-końcowej domeny katalitycznej, na początku której zlokalizowany jest peptyd sygnałowy, która połączona jest poprzez ok. 30-aminokwasowy region zawiasowy (ang. *hinge*) z C-kończącą domeną wiążącą chitynę (CBD). Na podstawie Kzhyshkowska i in., 2020.

Domena katalityczna CHIT1 katalizuje hydrolizę wiązania  $\beta$ -(1,4)-glikozydowego pomiędzy N-acetyloglukozoaminami tworzącymi oligomery i polimery chityny. Pierwsze prace opisujące mechanizm hydrolizy chityny przez CHIT1 wskazywały, że enzym ten jest enzymem o niskiej procesywności, a główny produkt hydrolizy oligomerów chityny stanowi dimer N-acetyloglukozoamin – chitobioza. Ostatnie badania wskazują, że w stosunku do krystalicznej chityny CHIT1 może wykazywać także aktywność endo-chitynazy (Kuusk i in., 2017). W przypadku wysokich stężeń produktów reakcji CHIT1 ma także zdolność do katalizowania reakcji odwrotnej do hydrolizy, czyli transglikozylacji, prowadzącej do powstania wiązań  $\beta$ -(1,4)-glikozydowego pomiędzy podjednostkami N-acetyloglukozoaminy, natomiast rola i znaczenie tego procesu u ludzi nie zostały jeszcze opisane (Aguilera i in., 2003). Co więcej, wykazano również, że CHIT1 oddziałuje także z innymi niż chityna substratami cukrowymi takimi jak N-acetylolaktozamina (LacNAc) i N,N'-diacetylolaktozamina (LacdiNAc), które stanowią podjednostki cukrowe naturalnie występujących u człowieka O- i N-glikanów (Larsen i in., 2014).

## 5.2.2 Ekspresja białka CHIT1

Białko CHIT1 wykazuje ekspresję w komórkach linii mieloidalnej, m.in. w neutrofilach, makrofagach, np. makrofagach płuc i komórkach Kupffera, ale także w komórkach nabłonkowych płuc (Di Rosa i in., 2013; Malaguarnera i in., 2006; van Eijk i in., 2005). Wykazano, że neutrofile i makrofagi wydzielają CHIT1 między innymi w odpowiedzi na stymulację czynnikami prozapalnymi np. czynnikiem wzrostu kolonii granulocytów i makrofagów GM-CSF (ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) (van Eijk i in., 2005). Wykazano także wzrost ekspresji CHIT1 podczas różnicowania monocytów krwi obwodowej do makrofagów (Di Rosa i in., 2013).

Co interesujące, u części osób wstępuje duplikacja o długości 24 par zasad w egzonie 10 genu *CHIT1*, w efekcie której w transkrypcie pojawia się dodatkowe miejsce splicingowe prowadzące do delecji fragmentu o długości 87 nukleotydów (Boot i in., 1998). Białko powstające w wyniku translacji

tego transkryptu nie wykazuje aktywności enzymatycznej i cechuje się także bardzo krótkim czasem półtrwania, co skutkuje brakiem aktywnego białka CHIT1 u homozygot z tą delecją. Pokazano, że częstość występowania homozygot z duplikacją w genie CHIT1 wynosi średnio kilka procent, jednak może różnić się pomiędzy populacjami (Boot i in., 1998; Malaguarnera i in., 2003).

### 5.3 CHIT1 jako potencjalny cel terapeutyczny

#### 5.3.1 Rola CHIT1 w procesach zapalnych i fibrotycznych

Jedną z podstawowych biologicznych funkcji CHIT1 jest hydroliza chityny. Ludzki genom nie zawiera genów kodujących białka o aktywności syntazy chityny, a w ludzkim organizmie wykrywane są tylko śladowe ilości chityny, co w połączeniu z aktywnością enzymatyczną CHIT1 sugeruje, że chitynaza ta odgrywa istotną rolę w obronie przed zewnętrznymi czynnikami zawierającymi chitynę, takimi jak patogenne grzyby czy stawonogi. Wiele badań wskazuje, że CHIT1 jest dominującą chitynazą w ludzkich płucach (Seibold i in., 2008), co może wskazywać na szczególną rolę CHIT1 w odpowiedzi na aeroalergeny zawierające chitynę, w tym na wymienione już patogenne grzyby, ale także odchody roztoczy kurzu domowego. Jak opisano powyżej, CHIT1 jest białkiem produkowanym i wydzielanym przez makrofagi i neutrofile (van Eijk i in., 2005), co wskazuje na potencjalną rolę tego białka w nieswoistej odpowiedzi immunologicznej, jednak mechanizm działania CHIT1 nie został jeszcze dokładnie poznany. W efekcie aktywacji makrofagów w wyniku zarówno ostrego jak i chronicznego stanu zapalnego, w komórkach tych dochodzi do znacznego podwyższenia ekspresji CHIT1, co jest obserwowane jako wzrost aktywności chitynolitycznej w osoczu pacjentów z różnymi chorobami o podłożu zapalnym (Przysucha i in., 2020; James i in., 2016). Wyniki badań *in vitro* wykorzystujące mysie makrofagi oraz ludzkie fibroblasty płuc wskazują, że CHIT1 bezpośrednio reguluje szlak sygnałowy zależny od transformującego czynnika wzrostu (ang. *transforming growth factor*  $\beta$ , TGF $\beta$ ) (Lee i in., 2019). Zostało pokazane, że działanie profibrotyczne CHIT1 jest związane z wpływem na białkowy inhibitor ścieżki TGF $\beta$  – SMAD7 oraz interakcją z białkiem oddziałującym bezpośrednio z receptorem białek z rodziny TGF $\beta$  – TGFBRAP1 (ang. *TGF- $\beta$  receptor associated protein 1*) (Lee i in., 2019).

#### 5.3.2 Ekspresja CHIT1 w śródmiąższowych chorobach płuc, ze szczególnym uwzględnieniem idiopatycznego włóknienia płuc i sarkoidozy

Jedną z pierwszych prac, która wskazywała na potencjalną rolę CHIT1 w procesach zapalnych i fibrotycznych towarzyszących śródmiąższowym chorobom płuc, była publikacja Lee i wsp., która dowodziła, że aktywność oraz stężenie CHIT1 są znacząco podwyższone zarówno w osoczu jak i płucach pacjentów z twardziną układową w porównaniu do grupy kontrolnej, a systemowa aktywność CHIT1 jest jeszcze wyższa w subpopulacji pacjentów, u których zaobserwowano zmiany śródmiąższowe płuc

w przebiegu tej choroby (Lee i in., 2012). Badania z wykorzystaniem mysiego modelu włóknienia płuc indukowanego bleomycyną pokazały, że zmiany fibrotyczne w płucach są znacząco ograniczone w płucach myszy transgenicznych z wyłączonym genem kodującym CHIT1, natomiast w płucach myszy transgenicznych z nadekspresją tego genu włóknienie płuc było bardziej nasilone (Lee i in., 2012).

Dane przedstawiające aktywność bądź ekspresję CHIT1 wśród pacjentów z idiopatycznym włóknieniem płuc są ograniczone do kilku publikacji. W jednym z pierwszych badań wykazano w grupie chorych na idiopatyczne włóknienie płuc zwiększoną aktywność chitynolityczną w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych (ang. *bronchoalveolar lavage fluid*, BALf) lecz nie w surowicy (Bargagli i in., 2007). W polskiej kohorcie pacjentów z tym schorzeniem aktywność chitynolityczna CHIT1 w surowicy była istotnie statystycznie wyższa w porównaniu do grupy kontrolnej (Majewski i in., 2022). W badaniu tym nie zaobserwowano znaczących różnic w medianie poziomu aktywności CHIT1 w surowicy w trakcie leczenia (pirfenidonem lub nintedanibem), natomiast wykazano, że aktywność chitynolityczna w grupie pacjentów, u których zaobserwowano progresję choroby, była wyższa niż w grupie pacjentów ze stabilną postacią choroby w pierwszym roku obserwacji, natomiast zależność ta była odwrotna po 24 miesiącach (Majewski i in., 2022). Oprócz podwyższonej aktywności CHIT1 w BALf czy w surowicy, wykazano także zwiększoną liczbę komórek wykazujących ekspresję CHIT1 (głównie makrofagów i komórek nabłonka) w preparatach biopsji płuc chorych z idiopatycznym włóknieniem płuc w porównaniu do płuc kontrolnych (Lee i in., 2022). Ostatnie badania wykorzystujące technikę sekwencjonowania RNA pojedynczych komórek (ang. *single cell RNA sequencing*, scRNASeq) pozwoliły na wyodrębnienie nowej profibrotycznej subpopulacji makrofagów płucnych swoistych dla idiopatycznego włóknienia płuc, którą cechuje wysoka ekspresja CHIT1 (Adams i in., 2020).

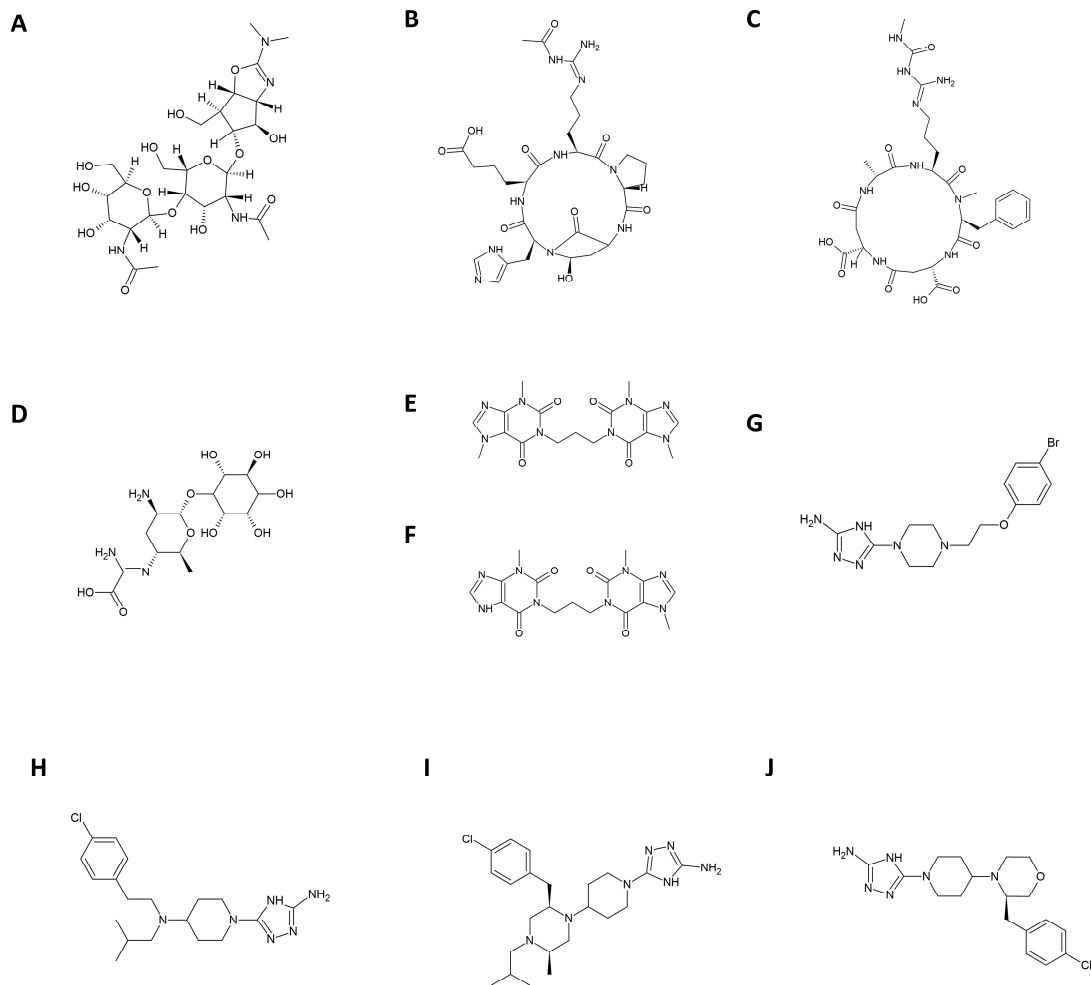
Wiele niezależnych badań wykazało znacznie podwyższenie aktywności chitynolitycznej CHIT1 w osoczu lub surowicy pacjentów z sarkoidozą (Boot i in., 2010; Harlander i in., 2014; Bargagli i in., 2013). Co więcej, wyniki przeprowadzonych badań wskazują na korelację pomiędzy aktywnością CHIT1 a zaawansowaniem choroby (Bennett i in., 2020) a także sugerują, że aktywność lub poziom CHIT1 w osoczu mogłyby stanowić biomarker aktywnej sarkoidozy (Di Francesco i in., 2021). Pomiar aktywności enzymu pozwala na rozróżnienie pomiędzy pacjentami z aktywnym stadium choroby a pacjentami w remisji lub leczonymi, u których obserwuje się znacznie niższy poziom aktywności CHIT1 (Di Francesco i in., 2021). Inna grupa badawcza pokazała także, że jednojądrzaste komórki krwi obwodowej wyizolowane od pacjentów z sarkoidozą, inkubowane z kulkami pokrytymi antygenem PPD (ang. *purified protein derivative*), tworzą *in vitro* struktury podobne do ziarniniaków a CHIT1 jest jednym z genów, który ulega najbardziej znaczącemu podwyższeniu ekspresji *ex vivo* (Crouser i in., 2017). Dodatkowo, wskazano także, że CHIT1 jest genem, który ulega ekspresji na znacząco wyższym poziomie w płucach pacjentów z sarkoidozą w porównaniu do grupy kontrolnej (Crouser i in., 2017).

### 5.3.3 Inhibitory chitynaz – AMCase i CHIT1

Pierwszym opisanym w literaturze inhibitorem chitynaz jest allosamidyna (Rycina 4A) – pseudotrójoligosacharyd wyizolowany ze *Streptomyces sp.* (Sakuda i in., 1987). Inhibitor ten jest nieselektywnym inhibitorem chitynaz z rodziny GH18: zarówno enzymów bakteryjnych, grzybiczych, owadzych jak i ssaczych (zarówno AMCase jak i CHIT1). Do dzisiaj opisano w literaturze kilka naturalnych pochodnych allosamidyny m.in. metyloallosamidynę oraz glukoallosamidynę A, ale allosamidyna pozostaje najlepiej scharakteryzowanym inhibitorem z tej klasy. W mysim modelu astmy alergicznej wywołanym owoalbuminą, w którym obserwowano znaczne podwyższenie ekspresji AMCase w płucach, wykazano, że allosamidyna wpływa na zmniejszenie liczby napływowych komórek zapalnych w płucach (Zhu i in., 2004). Związek ten jednak nie ma odpowiednich właściwości fizykochemicznych (m.in. ma dużą masę molową, i znaczną liczbę donorów i akceptorów wodoru i tym samym nie spełnia kryteriów Lipinskiego), by stanowić kandydata na lek (Lipinski i in., 2001). Taka charakterystyka powoduje, że związek ten ma niedostateczny profil farmakokinetyczny oraz ograniczoną biodostępność.

Odmianą strukturalnie grupę inhibitorów chitynaz z rodziny GH18 stanowią argifina i argadina (Rycina 4BC) – pentapeptydy wyizolowane z grzybów *Clonostachys sp. FO-7314* i *Gliocladium sp. FTD-0668* (Arai, Shiomi, Iwai, i in., 2000; Arai, Shiomi, Yamaguchi, i in., 2000). Związki te stanowią grupę podwójnych inhibitorów AMCase i CHIT1, z tym że pokazano, że argadina z dużo większym powinowactwem wiąże się do CHIT1 niż argifina (Rao, Houston, i in., 2005). Pomimo swojej aktywności względem ludzkich chitynaz, związki z grupy pentapeptydów, podobnie jak pseudotrójoligosacharydy, nie posiadają właściwości lekopodobnych w związku ze swoją złożoną strukturą chemiczną, dużą masą molową i ograniczoną biodostępnością.

Innym inhibitorem chitynaz z rodziny GH18 o naturalnym pochodzeniu jest kasugamycyna (Rycina 4D) należąca do grupy antybiotyków aminoglikozydowych wykorzystywana w rolnictwie do walki z chorobami bakteryjnymi i grzybiczymi roślin uprawnych (Qi i in., 2021). Inhibitor ten, pomimo ograniczonej aktywności względem ludzkich i mysich chitynaz, wykazał znaczące działanie przeciwłóknieniowe w mysim modelu fibrozy płuc wywołanym podaniem bleomycyny, a efekt ten był obserwowany zarówno w przypadku terapeutycznego jak i prewencyjnego podania tego związku (Lee i in., 2022). Grupa Lee i wsp. pokazała, że kasugamycyna hamuje bezpośrednio oddziaływanie CHIT1 z TGFBRAP1 - białkiem wiążącym się z receptorami dla TGFβ i odgrywającym rolę w transmisji sygnału zależnej od TGFβ.



**Rycina 4** Struktura wybranych inhibitorów chitynaz. A) allosamidyna, B) argifina C) argadina, D) kasugamycyna, E) bisdionina C, F) bisdionina F, G) związek 2 (Wyeth), H) OAT-177, I) OAT-2068, J) OAT-870.

Wiele niezależnych grup badawczych podjęło próbę identyfikacji inhibitorów chitynaz o korzystniejszych właściwościach fizykochemicznych i tym samym mogących stanowić związki wiodące w procesie odkrywania i rozwoju leków. Pierwszą grupę cząsteczek stanowiły naturalnie występujące pochodne metylksantyny – teofilina i kofeina (Rao, Andersen, i in., 2005). Choć cechowały się ograniczonym powinowactwem do ludzkich chitynaz, miały jednocześnie niską masę molową i mogły zostać łatwo poddane dalszym modyfikacjom. Dalsze prace nad tą serią związków doprowadziły do odkrycia grupy pochodnych di-kofeiny określanych wspólną nazwą bisdioniny (Schüttelkopf i in., 2011). Przykładowo, bisdionina C (Rycina 4E) charakteryzuje się mikromolową aktywnością względem zarówno AMCCase jak i CHIT1 oraz jednocześnie posiada dobre właściwości lekopodobne. Dalsze prace nad tą serią związków doprowadziły do opracowania bisdioniny F (Rycina 4F) – inhibitora o zmienionym profilu selektywności w porównaniu do bisdioniny C, którą charakteryzuje 20-krotnie większe powinowactwo do AMCCase niż do CHIT1 (Sutherland i in., 2011). Zastosowanie bisdioniny F w mysim

modelu alergicznego zapalenia dróg oddechowych wywołanym owoalbuminą doprowadziło do istotnego statystycznie zmniejszenia eozynofilii przy jednoczesnym zwiększeniu liczby neutrofilów w BALf (Sutherland i in., 2011).

Inne badanie prowadzone przez firmę Wyeth pozwoliło, dzięki wykorzystaniu kombinacji testów wysokoprzepustowych oraz wirtualnego badań przesiewowych, na identyfikację zupełnie nowej serii inhibitorów AMCCase i CHIT1 (Cole i in., 2010). Spośród zidentyfikowanych związków, inhibitor o największej aktywności względem AMCCase - związek 2 (Rycina 4G) zmniejszył aktywność chitynaz w BALf myszy, którym podano alergen w postaci ekstraktu z roztoczy kurzu domowego oraz karaluchów (Cole i in., 2010).

Związek 2 odkryty przez grupę z Wyeth stanowił związek wyjściowy do opracowania przez grupę Molecure (dawniej OncoArendi Therapeutics) bardziej aktywnych inhibitorów AMCCase i CHIT1 o lepszym profilu farmakokinetycznym m.in. selektywnego inhibitora mysiej AMCCase OAT-177 (Rycina 4H) oraz selektywnego inhibitora mysiej CHIT1 OAT-2068 (Rycina 4I) (Mazur, Olczak, i in., 2018; Mazur, Bartoszewicz, i in., 2018). Podanie pierwszego z tych związków w mysim modelu zapalenia dróg oddechowych wywołanym podaniem ekstraktu z roztoczy kurzu domowego skutkowało znaczącą redukcją zapalenia, przy jednoczesnym zahamowaniu aktywności chitynolitycznej (Mazur, Olczak, i in., 2018). Dalsze prace nad rozwojem tej serii inhibitorów chitynaz pozwoliły na identyfikację grupy podwójnych inhibitorów AMCCase i CHIT1, w tym związku OAT-870 (Rycina 4J), który charakteryzował się nanomolową aktywnością względem zarówno mysich jak i ludzkich chitynaz przy jednoczesnym znakomitym profilu farmakokinetycznym i farmakologicznym (Mazur i in., 2019). Inhibitor ten posiadał jednak niepożądaną aktywność względem transportera dopaminy, co wskazywało na potrzebę dalszej optymalizacji tej serii związków w celu otrzymania inhibitora o równie dobrym profilu, ale jednak o poprawionej selektywności. Wyniki tych prac, prowadzące do odkrycia inhibitora OATD-01, są częścią przedstawionej rozprawy doktorskiej.

## 6 Założenia i cele pracy

W badaniach będących podstawą rozprawy doktorskiej skoncentrowałam się na scharakteryzowaniu aktywności i ekspresji chitynaz w materiale klinicznym od pacjentów z wybranymi śródmiąższowymi chorobami płuc, takimi jak sarkoidoza oraz idiopatyczne włóknienie płuc oraz na identyfikacji i określeniu właściwości farmakologicznych nowego drobnocząsteczkowego inhibitora CHIT1 z wykorzystaniem modeli *in vitro* oraz modeli zwierzęcych.

Główny cel rozprawy obejmował realizację następujących celów szczegółowych:

1. Porównanie aktywności i ekspresji chitynaz w próbkach surowicy oraz indukowanej plwociny od pacjentów z idiopatycznym włóknieniem płuc oraz analiza ekspresji genu *CHIT1* w komórkach płuc z wykorzystaniem publicznie dostępnych baz danych.
2. Analiza ekspresji i aktywności CHIT1 w surowicy pacjentów z sarkoidozą oraz ocena ekspresji CHIT1 metodami immunohistochemicznymi w preparatach biopsyjnych węzłów chłonnych śródpiersia i błony śluzowej oskrzeli chorych z sarkoidozą.
3. Selekcja inhibitora CHIT1 z wykorzystaniem badań przesiewowych oraz dalsza charakterystyka wyłonionego związku pod kątem jego właściwości farmakokinetycznych, farmakodynamicznych oraz farmakologicznych.
4. Ocena wpływu inhibitora CHIT1 OATD-01 na ekspresję prozapalnych i prowłóknieniowych cytokin i chemokin wydzielanych przez makrofagi wyizolowane z BALf od pacjentów ze śródmiąższowym włóknieniem płuc oraz sarkoidozą.
5. Ocena efektów terapeutycznych OATD-01 w mysich przedklinicznych modelach włóknienia płuc oraz zapalenia ziarniniakowego.

## 7 Kopie opublikowanych prac

### 7.1 *Discovery of OATD-01, a first-in-class chitinase inhibitor as potential new therapeutics for idiopathic pulmonary fibrosis*



## Discovery of OATD-01, a First-in-Class Chitinase Inhibitor as Potential New Therapeutics for Idiopathic Pulmonary Fibrosis

Robert Koralewski, Barbara Dymek, Marzena Mazur, Piotr Sklepkiewicz, Sylwia Olejniczak, Wojciech Czestkowski, Krzysztof Matyszewski, Gleb Andryianau, Piotr Niedziejko, Michal Kowalski, Mariusz Gruza, Bartłomiej Borek, Karol Jedrzejczak, Agnieszka Bartoszewicz, Elżbieta Pluta, Aleksandra Rymaszewska, Magdalena Kania, Tomasz Rejczak, Sylwia Piasecka, Michal Mlacki, Marcin Mazurkiewicz, Michal Piotrowicz, Magdalena Salamon, Agnieszka Zagodzdon, Agnieszka Napiorkowska-Gromadzka, Aneta Bartłomiejczak, Witold Mozga, Paweł Dobrzański, Karolina Dzwonek, Jakub Golab, Marcin Nowotny, Jacek Olczak, and Adam Golebiowski\*



Cite This: <https://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01179>



Read Online

ACCESS |



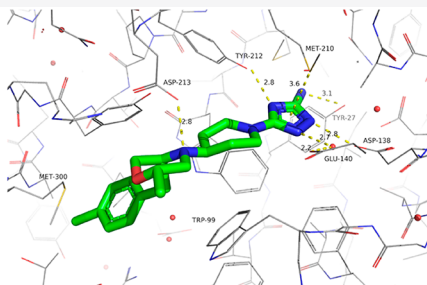
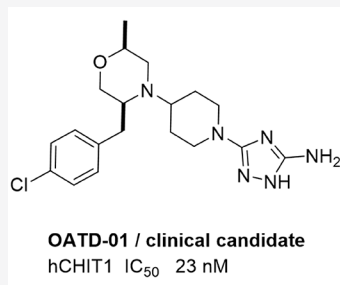
Metrics & More



Article Recommendations



Supporting Information



**ABSTRACT:** Chitotriosidase (CHIT1) and acidic mammalian chitinase (AMCase) are the enzymatically active chitinases that have been implicated in the pathology of chronic lung diseases such as asthma and interstitial lung diseases (ILDs), including idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and sarcoidosis. The clinical and preclinical data suggest that pharmacological inhibition of CHIT1 might represent a novel therapeutic approach in IPF. Structural modification of an advanced lead molecule 3 led to the identification of compound 9 (OATD-01), a highly active CHIT1 inhibitor with both an excellent PK profile in multiple species and selectivity against a panel of other off-targets. OATD-01 given orally once daily in a range of doses between 30 and 100 mg/kg showed significant antifibrotic efficacy in an animal model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. OATD-01 is the first-in-class CHIT1 inhibitor, currently completed phase 1b of clinical trials, to be a potential treatment for IPF.

### INTRODUCTION

Chitinases are chitin-degrading enzymes that belong to the glycosyl hydrolase family 18, which includes enzymatically active chitinases and chitinase-like proteins without enzymatic activity.<sup>1–3</sup> Mammals have two distinct genes encoding for chitinase enzymes, chitotriosidase (CHIT1) and acidic mammalian chitinase (CHIA, hereafter referred to as AMCase).<sup>4</sup> Both enzymes are composed of a catalytic domain linked by a flexible hinge to chitin binding domain belonging to the carbohydrate-binding module family 14. The catalytic domain shows a conserved cluster of three acidic residues in its active-site cleft that are involved in the reaction of chitin hydrolysis. The highly conserved chitin binding domain facilitates recognition of crystal chitin.<sup>5</sup> Both enzymes were shown to modulate inflammatory response in chitin-dependent and -independent manner. While AMCase is mostly produced at sites of Th2 inflammation and modulates allergic response in animal models of asthma,<sup>6–8</sup> CHIT1 was reported to be the

main chitinase produced by tissue activated macrophages<sup>3,9–11</sup> and expressed in human lung<sup>12</sup> and liver.<sup>13–15</sup> Moreover, CHIT1 was shown to modulate TGFβ and IL-13 signaling pathways to promote fibrotic response in animal models of pulmonary fibrosis.<sup>16</sup>

Currently, most antifibrotic treatment strategies are limited to specific diseases or organs. More evidence demonstrates great similarities among inflammatory and fibroproliferative diseases, and new drugs are being shown to be effective antifibrotic therapies across different diseases and organs.<sup>17</sup>

Received: July 7, 2020



CHIT1 is having a wide spectrum of scientific and clinical interest mostly due to its specific localization in chronically activated tissue macrophages that infiltrate the lungs of patients suffering from chronic lung diseases, such as severe asthma,<sup>9,18–20</sup> progressive fibrotic interstitial lung diseases (ILDs), such as idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)<sup>16,21</sup> or sarcoidosis,<sup>21–23</sup> and chronic obstructive pulmonary disease (COPD).<sup>9,18,24</sup> However, pathological tissue macrophages that highly express CHIT1 are found also in liver disorders such as nonalcoholic steatohepatitis (NASH) or hepatic fibrosis and cirrhosis in general suggesting their role in liver diseases that progress to fibrosis.<sup>14</sup>

IPF is a devastating and rapidly progressing fibroproliferative lung disease, with an estimated 5-year survival of approximately 20%, characterized by epithelial damage, fibroproliferative matrix deposition, and parenchymal remodeling.<sup>25–28</sup> Despite pirfenidone and nintedanib being approved for the treatment of IPF, these compounds show moderate efficacy in delaying the lung functional decline and disease progression. IPF is still a greatly unmet medical need; therefore the search for new therapeutic targets to support existing treatments is highly demanded.

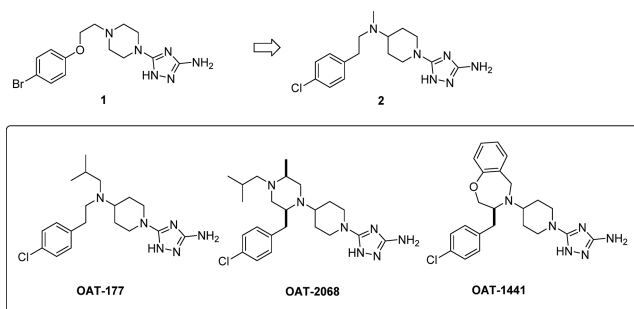
Activated profibrotic tissue macrophages<sup>29</sup> are thought to be the drivers of fibrosis in IPF lungs. Intriguingly, CHIT1 is the only chitinase induced in activated macrophages *in vitro*<sup>3,9,12,17</sup> and found to be one of the markers of profibrotic macrophages in IPF lungs. Initial studies evaluating the role of CHIT1 in the pathogenesis of pulmonary fibrosis in mice showed that CHIT1 deficiency resulted in decreased pulmonary fibrosis by significant modulation of TGF- $\beta$ - and IL-13-driven fibrotic responses.<sup>16</sup> This suggests a critical role of chitinases in the development of airway and interstitial fibrotic remodeling and implicates that pharmacological inhibition of CHIT1 is an attractive approach for patients suffering from fibrotic lung diseases.<sup>30,31</sup>

In addition, CHIT1 was suggested to facilitate tissue remodeling processes in fibroblastic liver tissue (similar to the lung) being produced by liver-specific macrophages, Kupffer cells, which by activating hepatic stellate cells induce hepatic fibrosis and cirrhosis.<sup>14,15</sup> Higher activity of CHIT1 has been also detected in the sera of patients with chronic hepatitis C virus (HCV) infection as compared to control individuals but most importantly also in the sera of patients with more pronounced fibrosis or liver cirrhosis as compared to patients with no or minimal liver fibrosis.<sup>14,32,33</sup> This significant correlation between serum CHIT1 and histological fibrosis stages or liver stiffness further underlines the important role of CHIT1 along with senescence for liver fibrogenesis.<sup>32,34</sup>

In the current studies we demonstrate discovery and development of a selective chitinase inhibitor OATD-01 with low nanomolar activity toward CHIT1, exhibiting exceptional PK profile in multiple animal species. Furthermore, we confirmed antifibrotic properties of OATD-01 in pulmonary interstitial fibrosis model induced by bleomycin.

## RESULTS AND DISCUSSION

The main goal of our studies was to develop a chitinase inhibitor for the treatment of inflammation-driven fibrotic diseases. We searched for a molecule with single-digit nanomolar activity toward CHIT1, excellent PK/PD profile, and therapeutic activity in preclinical animal models of chronic pulmonary inflammation and fibrosis.

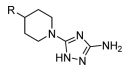


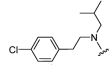
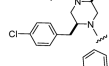
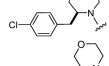
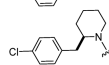
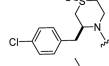
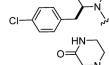
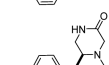
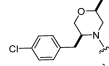
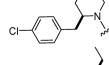
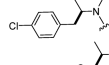
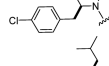
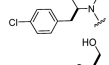
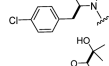
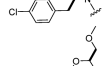
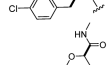
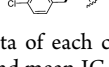
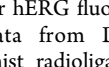

Our early research on chitinases inhibitors started from natural product, allosamidin, cyclic peptides,<sup>35</sup> and the literature reported molecule 1 (also called Wyeth 1),<sup>36</sup> which was optimized into an advanced lead compound 2.<sup>20</sup> The initial SAR development led to improvement of *in vitro* activity by optimizing interactions with Asp213 (mostly by shifting scaffold design from the central piperazine ring into 4-aminopiperidine) and by further exploring hydrophobic interactions to gain selectivity toward murine (m) mAMCase (e.g., OAT-177),<sup>20</sup> human (h) hAMCase (e.g., OAT-1441),<sup>37</sup> and mCHIT1 (e.g., OAT-2068) (Table 1).<sup>38</sup> For the future clinical candidate, we decided to focus our work on hCHIT1/hAMCase inhibitors and progress lead compound 3.<sup>39</sup> The independent, very recent publication on m- and hCHIT1 selective inhibitor and its antifibrotic activity in bleomycin induced lung fibrosis model in mice was reported by Jiang et al.<sup>40</sup>

Molecule 3, compared to many others made in the program (>3K chitinase inhibitors have been synthesized and tested), has a unique *in vitro* profile, being a very strong inhibitor of all four isoforms of key chitinase targets, i.e., both mouse and human CHIT1 and AMCase. It also has a very good PK profile in both mice and rats, but its main liability is relatively high activity against dopamine transporter (DAT IC<sub>50</sub> = 370 nM). This off-target effect was not surprising considering that the phenethylamine substructure (also present in all monoamines) can be easily found in the compound 3. We have seen this off-target activity in some other of our early inhibitors, e.g., OAT-177 (DAT 95% inhibition at 10  $\mu$ M).<sup>19</sup>

In the first step, we have studied chitinase inhibition activity of other ring analogs of molecule 3, e.g., compounds 4–8. Piperidine series (represented by compound 4) were as active as morpholines but with higher activity against hERG and monoamine transporters (likely because of higher basicity of the nitrogen atom in piperidines vs morpholines). Other replacements of the oxygen atoms (compounds 5–8) proved to be inferior, with piperazine 6 being the most promising lead molecule. Further development of the SAR of compound 6 led to a higher mCHIT1 selectivity at the cost of activity against human enzymes, and although it gave an interesting tool molecule, i.e., mCHIT1 selective inhibitor OAT-2068,<sup>38</sup> it was later discontinued.

Alkyl substitution at position 2 of the morpholine ring, i.e., molecules 9–17, turned out to be a suitable modification instantly abrogating activity toward dopamine transporter. This result represents the classic case of SAR-cliff or “magic methyl” discovery.<sup>43–45</sup> The *cis*-diastereoisomer 9 turned out to be a synthetically preferred isomer over the *trans* compound 10,<sup>46</sup> with coincident higher activity against chitinases. Increasing the size of the 2-substituent (e.g., compounds 11–17) led in general to equipotent inhibitors but with much inferior PK (e.g., compounds 11, 15, 16, 17; see Supporting Information).

**Table 1. Structure–Activity Relationship of Selected Analogs of Compound 3<sup>a</sup>**


Cmpd #	R	hCHIT1 (IC <sub>50</sub> nM)	mCHIT1 (IC <sub>50</sub> nM)	hAMCase (IC <sub>50</sub> nM)	mAMCase (IC <sub>50</sub> nM)	hERG <sup>b</sup> (IC <sub>50</sub> μM)	DAT <sup>c</sup>
OAT-177		232 ± 48	2955 ± 50	14.2 ± 1.0	18.8 ± 0.4	4.0	95%
OAT-2068		1250 ± 71	29 ± 4	84 ± 1.4	4170 ± 42	2.4	NT <sup>d</sup>
OAT-1441		915 ± 85	137 ± 3.5	7.0 ± 2.0	59 ± 2.1	22	37%
3		48 ± 8.2	74 ± 13.4	22 ± 2.1	30 ± 12.7	39	95%
4		41 ± 8.5	87 ± 7.8	23 ± 2.1	81 ± 12	8.3	NT
5		4200 ± 990	1700 ± 280	850 ± 0.0	3000 ± 71	NT	NT
6		18000 ± 4900	1600 ± 0.0	400 ± 110	7600 ± 570	IA	3%
7		IA	27000 ± 5000	6400 ± 71	22000 ± 3500	NT	NT
8		1400 ± 350	5300 ± 780	1300 ± 210	660 ± 140	80	12%
9 OATD-01		23 ± 4.5	28 ± 3.4	9.0 ± 1.0	7.8 ± 1.2	23	IA <sup>d</sup>
10		5100 ± 140	7200 ± 1100	830 ± 91	1000 ± 99	NT <sup>d</sup>	NT <sup>d</sup>
11		14 ± 0.7	14 ± 0.7	54 ± 11	1.3 ± 0.1	33	NT <sup>d</sup>
12		18 ± 0.7	19 ± 2.8	3.4 ± 0.5	2.1 ± 0.1	34	34%
13		16 ± 2.3	15 ± 0.7	1.6 ± 0.1	1.0 ± 0.6	8.5	28%
14		22 ± 0.7	25 ± 3.5	6.8 ± 0.3	6.7 ± 0.6	72	NT <sup>d</sup>
15		23 ± 0.6	29 ± 5.7	7.0 ± 2.5	5.5 ± 1.6	IA <sup>d</sup>	1%
16		22 ± 3.5	30 ± 5.7	8.9 ± 0.3	7.7 ± 1.5	100	4%
17		32 ± 6.4	49 ± 1.4	24 ± 4.2	7.8 ± 0.6	IA <sup>d</sup>	8

<sup>a</sup>IC<sub>50</sub> data of each compound were determined in 2–3 independent assays, and mean IC<sub>50</sub> ± SD values are shown in the table. <sup>b</sup>Data from Predictor hERG fluorescence polarization assay.<sup>41</sup> <sup>c</sup>% inhibition at 10 μM. Data from DAT human dopamine transporter binding (antagonist radioligand) assay, Cerep.<sup>42</sup> <sup>d</sup>NT = not tested; IA = inactive.

Thus, compound 9 (OATD-01) was selected for further studies. To thoroughly determine its affinity toward h/mCHIT1 and h/mAMCase, the inhibitory constants ( $K_i$ ) for all four enzymes have been measured and revealed good

correlation with earlier established IC<sub>50</sub> data (hCHIT1  $K_i$  = 17.3 ± 11.3 nM; mCHIT1  $K_i$  = 26.05 ± 7.7 nM; hAMCase  $K_i$  = 4.8 ± 1.3 nM; mAMCase  $K_i$  = 5.7 ± 4.1 nM; n = 3). Off-target in vitro effects of compound OATD-01 have been evaluated at 10 μM in the Eurofins Panlabs panel of 98 in vitro binding and enzymatic assays, involving diverse molecular classes of proteins. These studies demonstrated no significant interactions as no inhibition or stimulation higher than 50% was observed. Similarly, no significant inhibition was observed in the panel of seven CYPs and 13 transporters (see Supporting Information for details).

An X-ray crystallography approach was used to gain insights into the structure of the hCHIT1–OATD-01 complex and to understand the increased activity of the compound toward recombinant hCHIT1 in comparison with the previously reported OAT-177.<sup>20</sup> OATD-01 was cocrystallized with the catalytic domain of hCHIT1. The obtained crystals belong to space group  $P2_12_12_1$  and diffracted X-rays to 1.5 Å resolution at a synchrotron source. The hCHIT1–OATD-01 complex structure was solved by molecular replacement, using the hCHIT1 structure (PDB code 1WB0) as the search model.

The OATD-01 inhibitor occupies the chitin-binding cleft of hCHIT1 (Figure 1). The binding mode is largely the same as previously observed for the OAT-177 compound. Two of the hCHIT1 catalytic triad residues (Asp136, Asp138, Glu140) bind the OATD-01 aminotriazole ring by direct (Asp138, 2.8 Å) and water-mediated (Glu140) hydrogen bonds. In the apo structure (PDB code 4WJX) the side chain of Asp138 adopts two conformations, but in the presence of OATD-01 is stabilized through a hydrogen bond with Asp136. The position of the carbonyl group of one of the alternative conformations of Asp138 in apo protein, in the inhibitor complex structure, is occupied by a water molecule mediating the Glu140–inhibitor interaction. The aminotriazole moiety is also directly H bonded to Tyr212 (2.7 Å) and Tyr27 (3.1 Å). The position of the ring is stabilized by van der Waals interactions with Met210, Met356, Trp358, Tyr27, and Ala183. Strong interaction between carboxylic group of the conserved catalytic Asp213 and nitrogen of the central ring of the inhibitor is crucial for the potency of inhibitors toward hCHIT1 and AMCase. As for compound OAT-177, 4-aminopiperidine core of the OATD-01 forms stable hydrogen bond of 2.8 Å with Asp213.

The key difference between OAT-177 and OATD-01 is the presence of the 2-methylmorpholine ring. The analysis of the X-ray structure reveals why the inhibitor's activity is modified by the addition of the ring. First, the interactions between the inhibitor and Arg269 residue are altered (compare superimposition of the active site residues in hCHIT1 complexed to OATD-01 and OAT-177; Supporting Information Figure 1). In the OAT-177 complex the side chain of this residue adopts two alternative conformations, while in complex with OATD-01 Arg269 has one conformation and forms van der Waals interactions with the 2-methylmorpholine ring (3.3–4.0 Å). Second, O03 oxygen and C04 carbon of the ring form van der Waals interactions with the side chain of Met300.

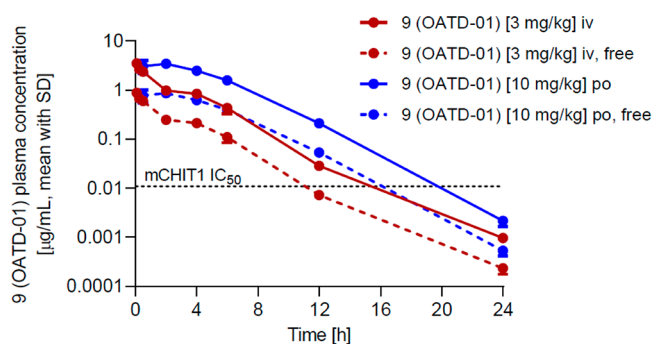
Similar to OAT-177, the 4-chlorobenzyl part of OATD-01 occupies a hydrophobic pocket formed by Leu362, Ala302, Leu301, Tyr267, and Met300 residues. All of these residues form van der Waals interactions with OATD-01. Chloride atom, located deep in the hydrophobic cavity, interacts with Thr295 within 3.6 Å distance. It was shown<sup>20</sup> that this interaction is key for inhibition of AMCase and CHIT1





sequence (Scheme 1). Amino alcohol **18**<sup>39</sup> was acylated using optically active (R)-2-bromopropionic acid, and the intermediate **19** was subsequently cyclized to form morpholin-3-one **20**. Reduction of the amide bond led to optically pure morpholine **21**, which was used as an amino substrate in the reductive amination, Boc-deprotection sequence to form piperidine **22**. Previously described<sup>20</sup> aminotriazole formation was used to form the final product **OATD-01** with 15% overall yield.

The pharmacokinetic (PK) properties of **OATD-01** were evaluated based on mouse, rat, and dog single dose administrations of the compound (iv and po) under fasting conditions in the following doses: 2 mg/kg (iv), 3 mg/kg (iv), 6 mg/kg (po), 10 mg/kg (po). As formulations, aqua solutions of solutol, glucose, and/or ethanol were examined. The concentrations of **OATD-01** in animal plasma samples were monitored by LC/MS–MS analysis, until 24 h after dose (Figure 2). Mean PK parameters of individual species calculated by the noncompartmental model (NCA) are shown in Table 2.



**Figure 2.** Plasma concentration time–course for compound **OATD-01** after single intravenous 3 mg/kg (iv) bolus and after 10 mg/kg oral administration (po) into female BALB/c mice. Free concentrations were obtained based on *in vitro* plasma protein binding (PPB); unbound fraction (fu) in mice is 0.253.

**OATD-01** showed a favorable pharmacokinetic profile in the studied species in all formulations. Following iv dosing, **OATD-01** was characterized by low clearance (0.1–0.35 (L/h)/kg) and moderate volume of distribution (1–2 L/kg). Following po administration, systematic exposure expressed by  $AUC_{0-24}$  ranged between 5.5 and 31 mg·h/L, depending on species and formulation, while  $C_{max}$  (in the range of 2.2–7.6 mg/L) was reached in 30 min (dogs) to 2 h (rodents) after dosing. Following fast absorption, **OATD-01** was eliminated with an elimination half-life of 1.9–4.5 h in rodents and 23 h in dogs, which is comparable to intravenous administration of the compound. **OATD-01** showed high bioavailability (from 77 to 107%) in tested species and formulations.

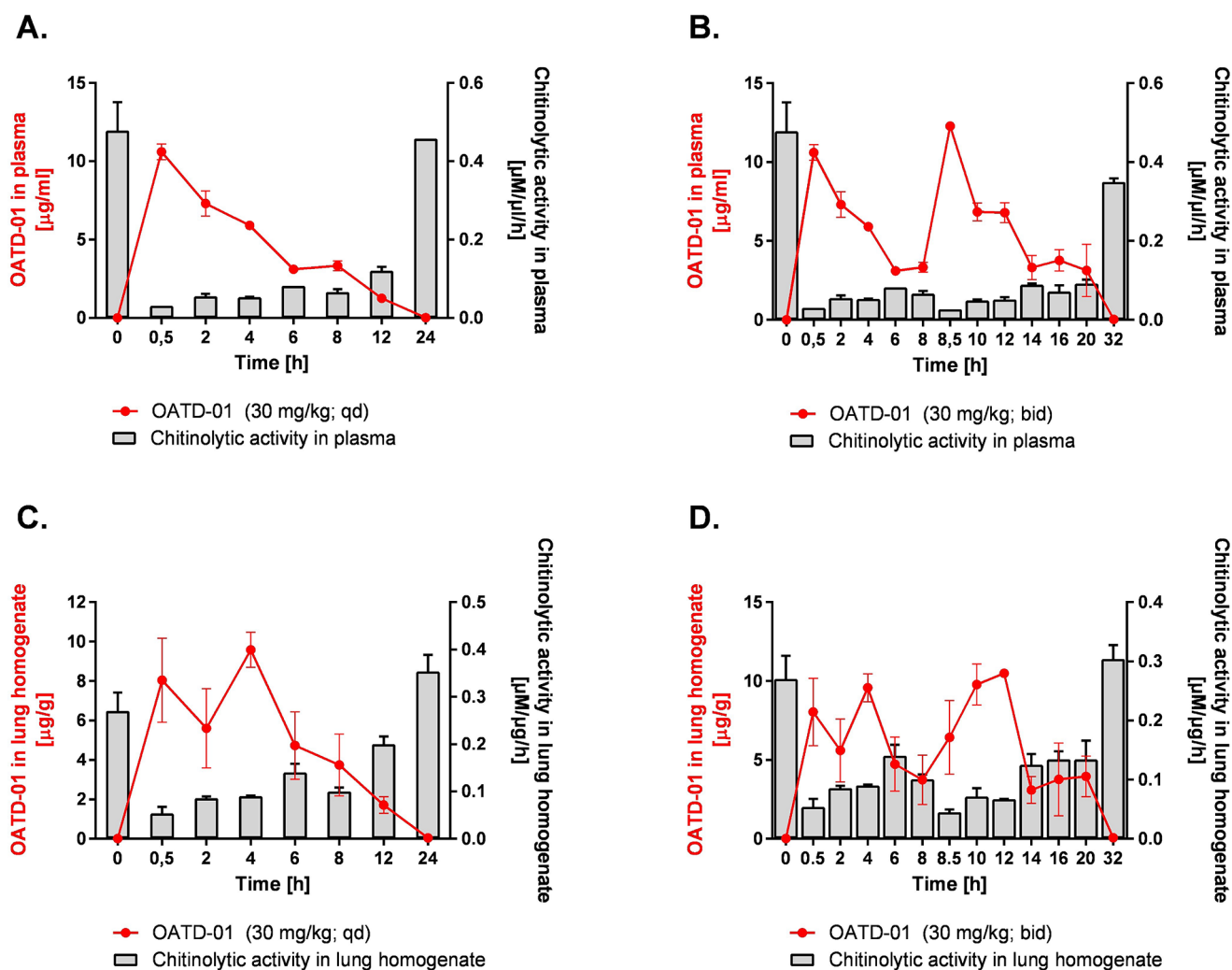
**Pharmacodynamics in Lungs.** In order to evaluate the PK/PD relationship of **OATD-01** in mice, the chitinolytic activity (the pharmacodynamic marker) in plasma and lungs upon oral administration of **OATD-01** was monitored. Mice were administered with one or two doses of **OATD-01** (30 mg/kg) under fasting conditions. Plasma and perfused lungs, collected before and at defined time points up to 24 h after the last dose, were used for the determination of the levels of **OATD-01** and chitinolytic activity. As shown in Figure 3, a decrease in chitinolytic activity following **OATD-01** administration was concomitant with the increasing concentration of **OATD-01** in plasma and lung tissue, thus demonstrating target engagement *in vivo* in both plasma and lungs. Single administration of **OATD-01** resulted in at least 70% reduction of chitinolytic activity in plasma for up to 12 h. Sequential two doses of **OATD-01**, separated by 8 h led to more sustained inhibition of chitinolytic activity levels over time. Among the tested time points, the peak of compound activity was detected at 0.5 h after dosing in either scheme of administration.

**In Vivo Therapeutic Efficacy of OATD-01.** CHIT1 was suggested to be the main chitinase active in the human lungs<sup>12</sup> that facilitates pulmonary fibrotic response.<sup>16</sup> Further studies were carried out to evaluate direct antifibrotic effects of **OATD-01** due to additional inhibition of CHIT1 in a robust model of pulmonary interstitial fibrosis induced by administration of bleomycin. Our recent studies (data not shown) showed that CHIT1 is induced in the lungs of bleomycin

**Table 2.** Mean Pharmacokinetic Parameters of **OATD-01** in Mice, Rats, and Dogs Determined by the Noncompartmental Model (NCA)<sup>a</sup>

	species					
	rat	mouse	dog	rat	mouse	dog
route	iv	iv	iv	po	po	po
sex	male	female	male	male	female	male
dose (mg/kg)	2	3	3	6	10	10
$AUC_{0-24}$ (mg·h/L)	5.56	8.60	31.01	20.28	22.18	94.13
$AUC_{0-24}/D$ (kg·mg·h/(L·mg))	2.78	2.87	10.34	3.38	2.22	9.41
$C_0$ or $C_{max}$ (mg/L)	1.00	3.97	2.47	2.21	3.42	7.64
$C_{max}/D$ (kg·mg/(L·mL))	n/a	n/a	0.82	0.37	0.34	0.76
$T_{max}$ (h)	n/a	n/a	n/a	2.00	2.00	0.5*
$T_{1/2}$ (h)	4.49	2.09	21.94	4.47	1.88	22.87
CL ((L/h)/kg) (0–inf)	0.34	0.35	x	n/a	n/a	n/a
CL ((L/h)/kg) (0–24)	0.34	0.35	0.10	n/a	n/a	n/a
$V_{ss}$ (L/kg) (0–24)	1.82	1.01	0.96	n/a	n/a	n/a
bioavailability (%)	n/a	n/a	n/a	107.46	77.38	91.42
formulation	A	B	C	A	B	C

<sup>a</sup>A, mix of ethanol and solutol (aq solution); B, mix of solutol and glucose (aq solution); C, glucose (aq solution); n/a, not applicable; x, not calculated as the % AUC extrapolated (% exp) was greater than 20%;  $T_{max}$  calculated from analytical data; \*, median.



**Figure 3.** Relationship between total OATD-01 concentration in plasma (A, B) and lungs (C, D) following single (A, C) or double (8 h interval between doses; B, D) administration of OATD-01 at 30 mg/kg.

administered mice; its expression is mostly restricted to macrophage population and correlated with fibrotic gene signature in the lungs. Therefore, antifibrotic efficacies of both OATD-01 (30, 100 mg/kg, po; q.d.) and designated clinically approved therapeutic, nintedanib (100 mg/kg; po; q.d.), were evaluated using semiquantitative Ashcroft scoring scale<sup>47,48</sup> of the lungs of bleomycin-induced model in a therapeutic regimen (d7–d21), (Figure 4A,B). This analysis revealed that OATD-01 significantly reduced the degree of lung fibrosis (Figure 4B) in a dose-dependent manner, ultimately achieving comparable therapeutic efficacy to reference treatment with nintedanib in this animal model. Moreover, these results correlated with a significant reduction of bleomycin-induced chitinolytic activity in plasma (Figure 4C), as opposed to nintedanib treatment confirming that CHIT1 inhibition is one of potential mechanisms to reduce fibrotic lesions in bleomycin-induced pulmonary fibrosis, and potential new strategy for IPF treatment.

## CONCLUSIONS

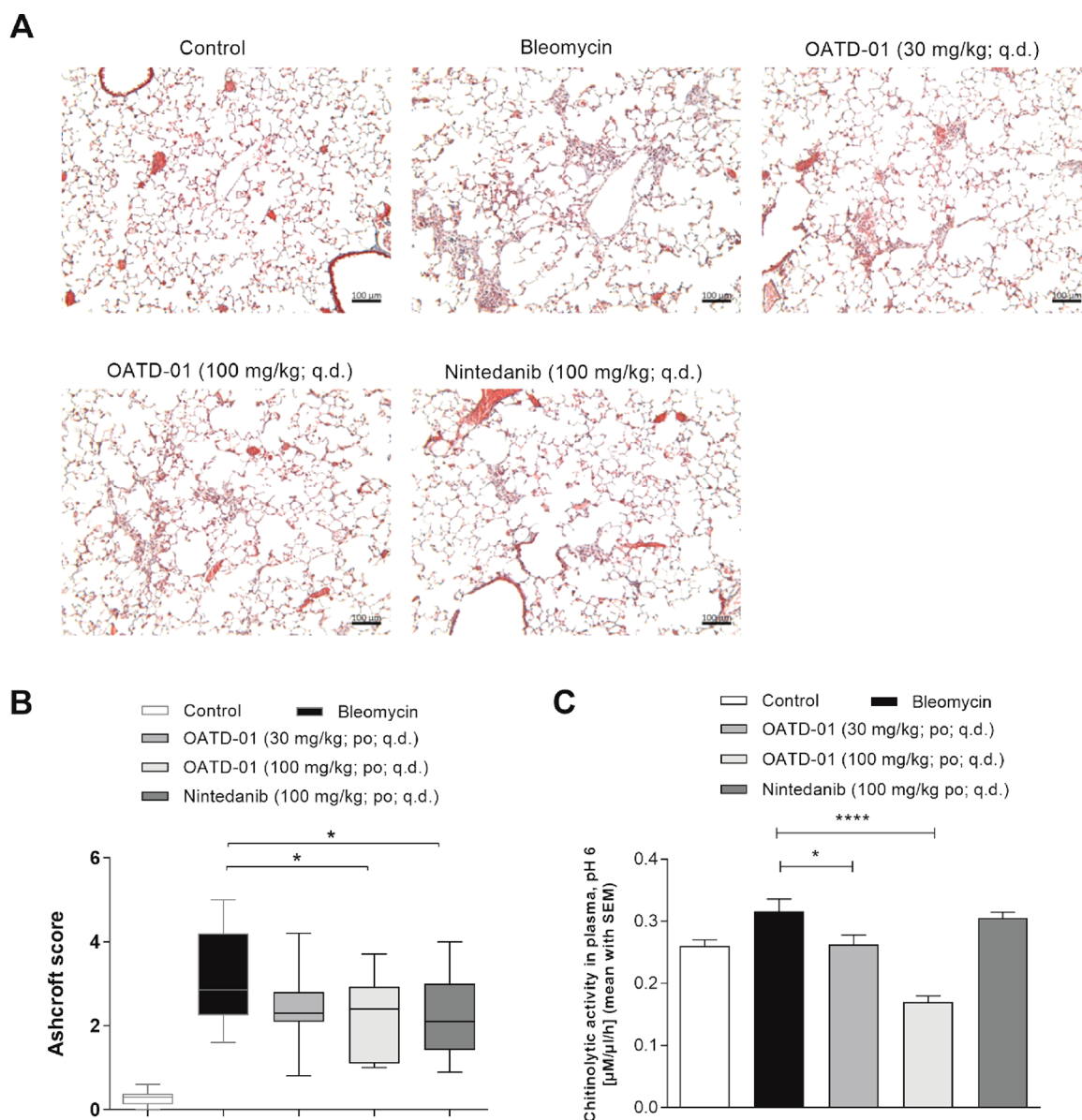
An advanced lead molecule 3 was modified and its overall activity optimized. The strategic placement of the “magic methyl” group significantly changed its *in vitro* activity profile and led to the identification of the molecule OATD-01.

OATD-01 is a highly potent CHIT1 inhibitor, also inhibiting AMCase, with excellent PK properties across multiple animal species. Given once daily in a range of doses between 30 and 100 mg/kg orally *in vivo*, it showed significant antifibrotic efficacy in preclinical animal model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. Provided data package for OATD-01 and its antifibrotic efficacy in preclinical models *in vivo* will hopefully lay the grounds for novel therapeutic approach in IPF and possibly other fibrosis-related clinical indications such as NASH. The preclinical studies have shown that the OATD-01 is well tolerated, has low toxicity, and has a favorable pharmacokinetic profile. OATD-01 is currently being clinically studied (completed phase 1b).

## EXPERIMENTAL SECTION

**Chemical Methods.** All solvents, substrates, and reagents that were commercially available were used without further purification. TLC analysis was performed using precoated glass plates ( $0.2 \pm 0.03$  mm thickness, GF-254, particle size 0.01–0.04 mm) from Fluorochem Ltd., U.K. Column chromatography was performed using high-purity grade silica gel (pore size 60 Å, 220–440 mesh particle size, 35–75  $\mu\text{m}$  particle size) from Fluka. Preparative HPLC was performed on LC-20AP Shimadzu with ELSD-LTII detector equipped with Hypersil GOLD 21.2/250 mm, 5  $\mu\text{m}$  C18 column. <sup>1</sup>H NMR spectra were recorded on Agilent Mercury 400 MHz





**Figure 4.** OATD-01 treatment ameliorates bleomycin-induced lung fibrosis in a dose-dependent manner. (A) Representative Masson's trichrome staining of pulmonary fibrosis 21 days after bleomycin injury, with or without treatment with OATD-01 or nintedanib. (B) Semiquantitative analysis of pulmonary fibrosis by Ashcroft score (0–6) in the lung sections ( $n = 3$  per animal) with or without OATD-01 (30 and 100 mg/kg; q.d.) and nintedanib (100 mg/kg; q.d.) as compared to vehicle treated controls. (C) Chitinolytic activity in plasma collected 24 h after the last dose of OATD-01 (30 and 100 mg/kg; q.d.) or nintedanib (100 mg/kg; q.d.) as compared to vehicle treated controls. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM.  $P$ -values of  $<0.05$  were considered as statistically significant and presented as \* for  $p < 0.05$ , \*\* for  $p < 0.01$ , \*\*\* for  $p < 0.001$ , and \*\*\*\* for  $p < 0.0001$ .

spectrometer and on Bruker AVANCE DRX500, AVANCE DRX600, or Bruker AVANCE II PLUS (respectively at 500, 600, or 700 MHz) NMR spectrometers. All spectra were recorded in appropriate deuterated solvents ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ , methanol- $d_4$ , etc.) that were commercially available. Resonances are given in parts per million relative to tetramethylsilane. Data are reported as follows: chemical shift, multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, m = multiplet, br = broad), coupling constants ( $J$  in Hz), and integration. LC–MS spectra were recorded on a Shimadzu LC-20AD LPG separation module with a SPD-M20A UV detector and LCMS-2020 mass detector equipped with Kinetex 2.1/50 mm, 2.6  $\mu\text{m}$  C18 column eluted with 0.5 mL/min flow of 10–90% gradient (over 6 min) of acetonitrile in water. Purities of all final reported compounds were greater than 95% based on HPLC chromatograms. Purification of the final compounds by preparative HPLC was accomplished on C-18 250 mm  $\times$  21 mm column in 0.05% TFA in water/acetonitrile 95:5

$\rightarrow$  45:55 gradient over 30 min followed by freeze-drying of the pooled fractions containing pure products. In some cases, the so obtained trifluoroacetate salts of the final compounds were judged to be of insufficient quality for biological testing due to their physical appearance (oils with a distinguished scent of trifluoroacetic acid). Therefore, they were redissolved in a small amount of 0.1 M HCl and subjected to the second lyophilization providing well-behaving hydrochloride salts.

Synthesis of compounds 5, 7, 8, and 15–17 are described in Supporting Information.

**(S)-4-(1-(5-Amino-4H-1,2,4-triazol-3-yl)piperidin-4-yl)-3-(4-chlorobenzyl)thiomorpholine 1,1-Dioxide (5).**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  7.31 (m,  $J_{\text{AA'BB'}}$  = 8.5 Hz, 2H), 7.24 ( $J_{\text{AA'BB'}}$  = 8.5 Hz, 2H), 5.48 (bs, 2H), 3.71–3.64 (m, 2H), 3.52–3.43 (m, 1H), 3.11–2.96 (m, 3H), 2.94–2.79 (m, 4H), 2.78–2.70 (m, 1H), 2.64–2.52 (m, 2H), 1.65–1.55 (m, 2H), 1.37–1.18 (m, 3H);  $^1\text{H}$  NMR

(700 MHz, DMSO- $d_6$  + D<sub>2</sub>O, 348 K)  $\delta$  7.32–7.29 (m, 2H), 7.29–7.20 (m, 2H), 3.79–3.63 (m, 2H), 3.63–3.52 (m, 1H), 3.40–3.31 (m, 1H), 3.19–3.12 (m, 1H), 3.06–2.99 (m, 2H), 2.99–2.76 (m, 5H), 2.72–2.60 (m, 2H), 1.69–1.61 (m, 2H), 1.45–1.25 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (176 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  138.3, 131.7 (2 $\times$ ), 131.3, 128.7 (2 $\times$ ), 60.4, 57.5, 55.8, 52.2, 50.2, 46.0, 45.9, 41.5, 35.2, 30.2, 28.0, 21.2; HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S [M + H]<sup>+</sup> 425.1521 found 425.1533.

**(S)-5-(4-(2-(4-Chlorobenzyl)-4-methylpiperazin-1-yl)-piperidin-1-yl)-4H-1,2,4-triazol-3-amine (6).**<sup>38</sup> <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.86 (bs, 1H), 7.32–7.26 (m, 2H), 7.17 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 5.59 (s, 2H), 3.77–3.67 (m, 2H), 2.91–2.71 (m, 3H), 2.70–2.51 (m, 7H), 2.00 (s, 3H), 1.98–1.90 (m, 2H), 1.75–1.55 (m, 2H), 1.49–1.22 (m, 2H); <sup>1</sup>H NMR (700 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.42–7.28 (m, 2H), 7.28–7.15 (m, 2H), 3.88–3.65 (m, 2H), 2.97–2.88 (m, 1H), 2.88–2.79 (m, 2H), 2.76–2.62 (m, 3H), 2.62–2.53 (m, 2H), 2.38–2.23 (m, 2H), 2.11–1.99 (m, 5H), 1.78–1.73 (m, 1H), 1.69–1.64 (m, 1H), 1.53–1.46 (m, 1H), 1.41–1.30 (m, 1H); <sup>13</sup>C NMR (176 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  139.7, 131.5 (2 $\times$ ), 130.8, 128.6 (2 $\times$ ), 58.8, 56.7, 55.74, 55.66, 46.5, 46.3, 46.1, 43.7, 40.5, 32.7, 30.1, 25.9 (one signal is missing due to overlap); HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for C<sub>19</sub>H<sub>29</sub>ClN<sub>7</sub> [M + H]<sup>+</sup> 390.2167 found 390.2173.

**(S)-4-(1-(5-Amino-4H-1,2,4-triazol-3-yl)piperidin-4-yl)-3-(4-chlorobenzyl)piperazin-2-one 2,2,2-Trifluoroacetate (7).** <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.88 (s, 1H), 7.32–7.22 (m, 4H), 3.85–3.59 (m, 4H), 3.15–2.75 (m, 8H), 1.73 (d,  $J$  = 12.2 Hz, 1H), 1.66–1.53 (m, 1H), 1.51–1.28 (m, 2H); <sup>1</sup>H NMR (700 MHz, DMSO- $d_6$  + D<sub>2</sub>O, 348 K)  $\delta$  7.34–7.20 (m, 4H), 3.73–3.55 (m, 3H), 3.24–3.17 (m, 1H), 3.11–3.01 (m, 3H), 2.99–2.76 (m, 5H), 1.75–1.62 (m, 2H), 1.51–1.33 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (176 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  159.4, 137.4, 131.9 (2 $\times$ ), 131.5, 128.3 (2 $\times$ ), 62.0, 57.2, 45.7, 45.6, 41.3, 40.0, 38.5, 35.1, 28.3, 27.0, 25.2; HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>ClN<sub>7</sub>O [M + H]<sup>+</sup> 390.1804 found 390.1809.

**(S)-4-(1-(5-Amino-4H-1,2,4-triazol-3-yl)piperidin-4-yl)-5-(4-chlorobenzyl)piperazin-2-one 2,2,2-Trifluoroacetate (8).** <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.28 ( $J_{AA'BB'}$  = 7.3 Hz, 2H), 7.14 ( $J_{AA'BB'}$  = 7.7 Hz, 2H), 4.07–4.12 (m, 1H), 4.01 (d,  $J$  = 16.7 Hz, 1H), 3.86 (d,  $J$  = 16.9 Hz, 1H), 3.73–3.77 (m, 2H), 3.32–3.36 (m, 1H), 3.17–3.22 (m, 2H), 2.81–3.04 (m, 4H), 2.09–2.15 (m, 2H), 1.68–1.75 (m, 2H); <sup>1</sup>H NMR (700 MHz, DMSO- $d_6$  + D<sub>2</sub>O, 348 K)  $\delta$  7.41–7.24 (m, 4H), 3.87–3.77 (m, 2H), 3.74–3.69 (m, 1H), 3.67–3.62 (m, 1H), 3.60–3.52 (m, 1H), 3.37–3.23 (m, 3H), 3.12–3.07 (m, 1H), 3.06–2.99 (m, 1H), 2.99–2.86 (m, 2H), 2.82–2.72 (m, 1H), 2.02–1.91 (m, 2H), 1.71–1.56 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (176 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  159.2, 135.0, 132.4, 131.7 (2 $\times$ ), 129.2 (2 $\times$ ), 59.2, 54.3, 48.1, 47.4, 45.3, 45.1, 40.3, 40.0, 26.4, 25.4, 24.5; HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>ClN<sub>7</sub>O [M + H]<sup>+</sup> 390.1804 found 390.1821.

**5-(4-((2S,5S)-5-(4-Chlorobenzyl)-2-methylmorpholino)-piperidin-1-yl)-4H-1,2,4-triazol-3-amine Hydrochloride (9).** **Step 1. Synthesis of (S)-2-Amino-3-(4-chlorophenyl)propan-1-ol (18).** To a solution of 4-chloro-L-phenylalanine (20.0 g; 100 mmol) in tetrahydrofuran (200 mL) borane dimethylsulfide complex (28.16 mL; 300 mmol) was added dropwise at 0 °C (foaming!). After addition was complete, the cooling bath was removed, and the reaction mixture was refluxed for 5 h. The reaction progress was monitored by LC–MS. The reaction mixture was cooled to room temperature and 6 N HCl aq (100 mL) was carefully added (foaming!) and then refluxed for an additional 1 h. The reaction mixture was cooled to room temperature, 4 N NaOH aq was added to reach pH 12 and subsequently extracted with ethyl acetate (2  $\times$  500 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in vacuo. The oily residue was triturated with diethyl ether and the solids were filtered off to give (S)-2-amino-3-(4-chlorophenyl)propan-1-ol (18) as a white solid in 89% yield (16.5 g; 88.88 mmol). ESI-MS  $m/z$  for C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>ClNO found 185.7/187.7 [M + H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.28 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 7.11 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 3.62 (dd,  $J$  = 10.6, 3.8 Hz, 1H), 3.37 (dd,  $J$  = 10.5, 6.9 Hz, 1H), 3.11–3.07 (brs, 1H), 2.76 (dd,  $J$  = 13.6, 5.4 Hz, 1H), 2.50 (dd,  $J$  = 13.6, 8.6 Hz, 1H).

**Step 2. Synthesis of (R)-2-Bromo-N-((S)-1-(4-chlorophenyl)-3-hydroxypropan-2-yl)propanamide (19).** To the solution of alcohol 18 (1 g; 4.5 mmol) and (R)-2-bromopropionic acid (0.4 mL; 4.5 mmol) in DCM (30 mL) at 0 °C, diisopropylethylamine (DIPEA; 2.35 mL; 13.5 mmol) and TBTU (1.44 g; 4.5 mmol) were added sequentially, and the reaction mixture was stirred at this temperature for 3 h. After this time TLC control showed complete consumption of the starting materials, so the reaction mixture was transferred to the separatory funnel and washed sequentially with 1 M HCl, 1 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. The organic phase was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in vacuo, and the crude product was purified by flash column chromatography (DCM/MeOH 100:1 v/v), and product 19 was obtained as a white solid in 64% yield (0.6 g; 2.88 mmol). ESI-MS  $m/z$  for C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>BrClNO<sub>2</sub> found 320.7/322.7 [M + H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.25 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H), 7.14 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H), 6.58 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 1H), 4.33 (dd,  $J$  = 14.1, 7.1 Hz, 1H), 4.13–4.06 (m, 1H), 3.69–3.64 (m, 1H), 3.61–3.57 (m, 1H), 2.90–2.81 (m, 2H), 2.17 (brs, 1H), 1.82 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 3H).

**Step 3. Synthesis of (2S,5S)-5-(4-Chlorobenzyl)-2-methylmorpholin-3-one (20).** To the solution of compound 19 (1.46 g; 4.52 mmol) in THF (45 mL) sodium hydride (NaH) (60% in mineral oil; 0.65 g; 13.56 mmol) was added in one portion and stirred at room temperature for 30 min. TLC showed consumption of the starting material. The reaction was quenched by addition of water and then extracted with diethyl ether. Combined organic extracts were then washed with brine, dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in vacuo to provide product 20 as a white solid after washing with hexane in 77% yield (0.83 g; 3.46 mmol). ESI-MS  $m/z$  for C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>ClNO<sub>2</sub> found 240.1/242.1 [M + H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.27 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H), 7.10 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H), 6.13 (brs, 1H), 4.18 (m, 1H), 3.76 (d,  $J$  = 3.0 Hz, 2H), 3.55–3.50 (m, 1H), 2.91–2.83 (m, 2H), 1.46 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 3H).

**Step 4. Synthesis of (2S,5S)-5-(4-Chlorobenzyl)-2-methylmorpholine (21).** To the solution of lactam 20 (1.03 g; 4.29 mmol) in tetrahydrofuran (21.25 mL) borane dimethylsulfide complex (1.2 mL; 12.89 mmol) was added dropwise at 0 °C (foaming!). The cooling bath was removed, and the reaction mixture was refluxed for 2 h. LC–MS analysis showed consumption of the starting material. The mixture was cooled to room temperature, and 6 M HCl aq (10 mL) was carefully added (foaming!), then refluxed for another 1 h. The reaction mixture was cooled to room temperature and 4 M NaOH aq was added to reach pH 10 and then extracted with ethyl acetate (2  $\times$  50 mL). The combined organic phases were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in vacuum to give product 21 as a colorless oil in 90% yield (871 mg; 3.86 mmol). ESI-MS  $m/z$  for C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>ClNO found 226.4/228.4 [M + H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$  + D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.33 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 7.23 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 3.50–3.48 (m, 1H), 3.49–3.47 (m, 2H), 2.87–2.81 (m, 1H), 2.80–2.76 (m, 2H), 2.65 (dd,  $J$  = 12.4 Hz, 8.3 Hz, 1H), 2.58 (dd,  $J$  = 12.4 Hz, 3.0 Hz, 1H), 1.09 (d,  $J$  = 6.2 Hz, 3H).

**Step 5. Synthesis of (2S,5S)-5-(4-Chlorobenzyl)-2-methyl-4-(piperidin-4-yl)morpholine Hydrochloride (22).** To a solution of compound 21 (1.36 g; 6.02 mmol) in 1,2-dichloroethane (4 mL) Boc-piperidine (1.8 g; 9.03 mmol) was added followed by acetic acid (0.69 mL; 12.4 mmol), and the reaction mixture was stirred for 4 h at ambient temperature. Sodium triacetoxyborohydride [NaBH(OAc)<sub>3</sub>] (2.61 g; 12.4 mmol) was then added in one portion, and the reaction mixture was stirred overnight at ambient temperature. To this mixture 5% aq NaHCO<sub>3</sub> (10 mL) was added, and after stirring for 5 min the mixture was extracted with dichloromethane (2  $\times$  20 mL). The organic phases were combined, dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in vacuum. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH 100:0 to 200:1 v/v) white foam (1.10 g; 2.68 mmol; 45% yield) was treated with 3M HCl(g)/AcOEt (26.8 mL), and the reaction mixture was stirred for 40 min at ambient temperature. The solvent was removed in vacuo and residue was triturated with diethyl ether and filtered to give product 22 as a hydrochloride salt as a white solid in 34% yield (640 mg; 1.85 mmol). ESI-MS  $m/z$  for C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>2</sub>O found 309.9/311.9 [M + H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.35 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 7.33 (d,  $J$  =



8.4 Hz, 2H), 4.04 (brs, 2H), 3.59 (brs, 2H), 3.45 (brs, 1H), 3.40 (m, 1H), 3.39–3.36 (m, 2H), 3.10 (brs, 2H), 2.98 (brs, 1H), 2.87 (brs, 2H), 2.31 (brs, 2H), 2.17 (brs, 2H), 1.21 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H).

**Step 6. Synthesis of 5-(4-((2*S*,5*S*)-5-(4-Chlorobenzyl)-2-methylmorpholino)piperidin-1-yl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-amine Hydrochloride (9).** To a solution of piperidine **22** (640 mg; 1.85 mmol) in acetonitrile (10.0 mL) was added *S,S*-dimethyl *N*-cyanodithioiminocarbonate (298 mg; 2.03 mmol) followed by potassium carbonate (563 mg; 4.07 mmol), and the reaction mixture was refluxed for 1.5 h. LC–MS analysis showed consumption of the starting material. To this mixture hydrazine monohydrate (0.27 mL; 5.55 mmol) was added, and reflux was maintained for an additional 2 h. The reaction mixture was cooled down to ambient temperature, filtered, and the filtrate was concentrated in vacuo. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH 250:1 to 50:1 v/v). The material obtained after evaporation of solvents was dissolved in a small amount of AcOEt, and then 3 M HCl/AcOEt (20 mL) was added. The mixture was stirred for 5 min and concentrated in vacuo. The residue was dissolved in methanol (2 mL) and as a solution was added dropwise to vigorously stirred diethyl ether (250 mL). Stirring was continued for an additional 20 min at room temperature and then the precipitate was filtered off to give product **9** as a hydrochloride salt as a white solid in 72% yield (568 mg; 1.33 mmol).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.39 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.30 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 3.87–3.79 (m, 3H), 3.66 (brs, 2H), 3.58 (brs, 1H), 3.52–3.45 (m, 2H), 3.09 (brs, 2H), 3.00–2.93 (m, 2H), 2.92–2.88 (m, 1H), 2.20 (brs, 2H), 1.67 (brs, 2H), 1.20 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H);  $^1\text{H}$  NMR (700 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6/\text{methanol-}d_4$ )  $\delta$  7.13 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 6.89 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 3.99 (br s, 2H), 3.66 (br s, 3H), 3.56 (d,  $J = 11.4$  Hz, 1H), 3.54–3.46 (m, 1H), 3.37 (d,  $J = 11.4$  Hz, 1H), 2.90–2.80 (m, 3H), 2.68 (d,  $J = 10.4$  Hz, 1H), 2.40 (d,  $J = 11.9$  Hz, 2H), 2.32–2.25 (m, 1H), 2.05 (t,  $J = 11.2$  Hz, 1H), 1.81 (d,  $J = 12.5$  Hz, 1H), 1.65 (d,  $J = 12.5$  Hz, 1H), 1.54–1.46 (m, 1H), 1.46–1.37 (m, 1H) and 1.11 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H);  $^1\text{H}$  NMR for free base (400 MHz, methanol- $d_4$ )  $\delta$  7.32–7.23 (m, 2H), 7.21–7.12 (m, 2H), 3.88–3.77 (m, 2H), 3.66–3.52 (m, 2H), 3.51–3.42 (m, 1H), 3.02–2.92 (m, 2H), 2.91–2.76 (m, 4H), 2.72–2.63 (m, 1H), 2.43–2.30 (m, 1H), 2.09–1.98 (m, 2H), 1.56–1.37 (m, 2H), 1.18 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (175 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ )  $\delta$  139.0, 132.1, 131.2, 129.0, 128.1, 72.6, 67.8, 56.5, 55.7, 50.1, 48.9, 45.8, 45.7, 29.7, 29.2, 27.7, 19.3;  $^{13}\text{C}$  NMR for free base (101 MHz, methanol- $d_4$ )  $\delta$  138.7, 131.5, 130.6 (2 $\times$ ), 128.2 (2 $\times$ ), 72.3, 67.1, 56.2, 55.3, 49.5, 45.26, 45.25, 29.0, 28.5, 26.7, 18.0 (two signals are missing due to overlap); HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{ClN}_6\text{O}$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$  391.2008 found 391.2004.

**5-(4-((2*R*,5*S*)-5-(4-Chlorobenzyl)-2-methylmorpholino)piperidin-1-yl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-amine Hydrochloride (10).** The title compound **10** was obtained as a hydrochloride salt (3% overall yield) in the same manner as molecule **9** with the exception that (2*S*)-2-bromopropionic acid instead of (2*R*)-2-bromopropionic acid was used in the second synthetic step.  $^1\text{H}$  NMR (700 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.41 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.35 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 4.08 (br s, 1H), 3.91–3.84 (m, 2H), 3.83–3.80 (m, 2H), 3.70–3.67 (m, 2H), 3.48 (d,  $J = 12.7$  Hz, 2H), 2.87 (t,  $J = 11.6$  Hz, 1H), 2.75 (t,  $J = 11.5$  Hz, 1H), 2.70 (dd,  $J = 14.5, 7.7$  Hz, 1H), 2.65 (t,  $J = 12.0$  Hz, 1H), 1.80–1.90 (m, 2H), 1.63 (qd,  $J = 12.3, 4.2$  Hz, 1H), 1.11 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (176 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  135.7, 132.1, 131.4 (2 $\times$ ), 129.2 (2 $\times$ ), 69.5, 67.3, 58.7, 57.8, 50.3, 45.6, 45.3, 40.5, 31.7, 26.2, 22.5, 18.6 (one signal is missed due to overlap); HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{ClN}_6\text{O}$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$  391.2008 found 391.2015.

**5-(4-((2*S*,5*S*)-5-(4-Chlorobenzyl)-2-ethylmorpholino)piperidin-1-yl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-amine Hydrochloride (11).** The title compound **11** was obtained as a hydrochloride salt (7% overall yield) in the same manner as molecule **9** with the exception that (2*R*)-2-bromobutanoic acid instead of (2*R*)-2-bromopropionic acid was used in the second synthetic step.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$  +  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7.38 (d,  $J_{\text{AA}'\text{BB}'}$  = 8.5 Hz, 2H), 7.27 (d,  $J_{\text{AA}'\text{BB}'}$  = 8.3 Hz, 2H), 3.81 (brd,  $J = 12.8$  Hz, 2H), 3.67–3.69 (m, 1H), 3.52–3.56 (m, 4H), 3.38–3.41 (m, 1H), 2.99–3.06 (m, 3H), 2.85–2.93 (m, 2H), 2.15–2.21 (m, 2H), 1.48–1.60 (m, 4H), 0.89 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3H);  $^1\text{H}$  NMR (700 MHz, DMSO- $d_6$  +  $\text{D}_2\text{O}$ , 348 K)  $\delta$  7.41–7.36 (m,

2H), 7.36–7.29 (m, 2H), 3.94–3.85 (m, 2H), 3.80–3.77 (m, 1H), 3.74–3.68 (m, 2H), 3.67–3.46 (m, 3H), 3.16–3.10 (m, 2H), 3.10–3.01 (m, 1H), 3.01–2.90 (m, 2H), 2.28–2.12 (m, 2H), 1.83–1.72 (m, 2H), 1.64–1.48 (m, 2H), 0.95 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (176 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  135.0, 132.3, 132.0 (2 $\times$ ), 129.2 (2 $\times$ ), 75.1, 64.9, 58.7, 55.5, 51.9, 47.3, 45.3, 45.1, 40.0, 38.9, 27.3, 25.8, 25.7, 9.5; HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{ClN}_6\text{O}$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$  405.2164 found 405.2166.

**5-(4-((2*S*,5*S*)-5-(4-Chlorobenzyl)-2-isopropylmorpholino)piperidin-1-yl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-amine 2,2,2-Trifluoroacetate (12).** The title compound **12** was obtained as a TFA salt (2% overall yield) in the same manner as example **9** with the exception that (2*R*)-2-bromo-3-methylbutanoic acid instead of (2*R*)-2-bromopropionic acid was used in the second synthetic step.  $^1\text{H}$  NMR (700 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.15 (s, 1H), 7.45–7.41 (m, 2H), 7.36–7.31 (m, 2H), 7.05 (bs, 2H), 3.88 (t,  $J = 16.8$  Hz, 2H), 3.83–3.75 (m, 1H), 3.63–3.53 (m, 3H), 3.49–3.37 (m, 2H), 3.17–3.07 (m, 1H), 3.03 (t,  $J = 12.5$  Hz, 1H), 2.94 (t,  $J = 12.8$  Hz, 1H), 2.84 (t,  $J = 12.5$  Hz, 1H), 2.28 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H), 2.22 (d,  $J = 12.2$  Hz, 1H), 1.82 (ddd,  $J = 13.7, 9.4, 5.9$  Hz, 1H), 1.69–1.59 (m, 2H), 0.97 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H), 0.96 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (176 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  134.9, 132.4, 131.9 (2 $\times$ ), 129.2 (2 $\times$ ), 78.2, 64.9, 61.3, 58.8, 55.5, 45.8, 45.3, 45.1, 39.9, 30.7, 27.3, 25.8, 25.6, 18.6, 17.3; HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{ClN}_6\text{O}$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$  419.2321 found 419.2325.

**5-(4-((2*S*,5*S*)-5-(4-Chlorobenzyl)-2-isobutylmorpholino)piperidin-1-yl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-amine 2,2,2-Trifluoroacetate (13).** The title compound **13** was obtained as a TFA salt (3% overall yield) in the same manner as example **9** with the exception that (2*R*)-2-bromo-4-methylpentanoic acid instead of (2*R*)-2-bromopropionic acid was used in the second synthetic step.  $^1\text{H}$  NMR (700 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.43 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.34 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 6.99 (br s, 1H), 3.89–3.85 (m, 3H), 3.79–3.47 (m, 7H), 3.12 (d,  $J = 7$  Hz, 2H), 3.00 (s, 1H), 2.95–2.91 (m, 1H), 2.86–2.83 (m, 1H), 2.23–2.18 (m, 2H), 1.82–1.76 (m, 1H), 1.64–1.59 (m, 2H), 1.53–1.49 (m, 1H), 1.31–1.27 (m, 1H), 0.91–0.87 (m, 6H);  $^{13}\text{C}$  NMR (176 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  135.0, 132.3, 131.9 (2 $\times$ ), 129.2 (2 $\times$ ), 72.6, 65.1, 60.0, 58.7, 55.6, 47.8, 45.3, 45.1, 41.3, 40.0, 27.3, 25.9, 25.6, 23.9, 23.5, 22.1; HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{ClN}_6\text{O}$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$  433.2477 found 433.2489.

**((2*R*,5*S*)-4-(1-(5-Amino-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)piperidin-4-yl)-5-(4-chlorobenzyl)morpholin-2-yl)methanol Hydrochloride (14).** The title compound **14** was obtained as a hydrochloride salt (8% overall yield) in the same manner as example **9** with the exception that (2*R*)-2-bromo-3-*tert*-butoxypropanoic acid instead of (2*R*)-2-bromopropionic acid was used in the second synthetic step.  $^1\text{H}$  NMR (700 MHz, DMSO- $d_6$  +  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7.43–7.37 (m, 2H), 7.37–7.29 (m, 2H), 3.96–3.80 (m, 4H), 3.77–3.65 (m, 2H), 3.65–3.52 (m, 4H), 3.21–3.07 (m, 3H), 3.04–2.95 (m, 2H), 2.29–2.18 (m, 2H), 1.87–1.74 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (176 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  135.0, 132.3, 132.0 (2 $\times$ ), 129.2 (2 $\times$ ), 74.7, 64.6, 61.7, 58.7, 55.5, 45.2, 45.1, 44.9, 39.9, 27.1, 25.8, 25.6 (one signal is missing due to overlap); HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{ClN}_6\text{O}_2$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$  407.1957 found 407.1969.

**2-((2*R*,5*S*)-4-(1-(5-Amino-4*H*-1,2,4-triazol-3-yl)piperidin-4-yl)-5-(4-chlorobenzyl)morpholin-2-yl)propan-2-ol 2,2,2-Trifluoroacetate (15).**  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$  +  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7.39 ( $J_{\text{AA}'\text{BB}'}$  = 8.5 Hz, 2H), 7.31 ( $J_{\text{AA}'\text{BB}'}$  = 8.5 Hz, 2H), 3.89–3.77 (m, 2H), 3.75–3.69 (m, 1H), 3.67–3.53 (m, 3H), 3.46–3.37 (m, 2H), 3.21–2.97 (m, 3H), 2.97–2.86 (m, 2H), 2.25–2.16 (m, 2H), 1.64–1.55 (m, 2H), 1.15 (s, 3H), 1.14 (s, 3H);  $^1\text{H}$  NMR (700 MHz, DMSO- $d_6$  +  $\text{D}_2\text{O}$ , 348 K)  $\delta$  7.45–7.35 (m, 2H), 7.35–7.26 (m, 2H), 3.96–3.84 (m, 2H), 3.76–3.62 (m, 4H), 3.54–3.50 (m, 2H), 3.22–3.16 (m, 1H), 3.12–3.06 (m, 2H), 2.97–2.87 (m, 2H), 2.30–2.13 (m, 2H), 1.73–1.61 (m, 2H), 1.19 (s, 6H);  $^{13}\text{C}$  NMR (176 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  134.9, 132.4, 132.0 (2 $\times$ ), 129.2 (2 $\times$ ), 70.4, 65.0, 59.4, 59.01, 57.7, 55.4, 52.1, 45.3, 45.2, 44.0, 40.0, 27.2, 27.1, 25.6, 24.6; HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{ClN}_6\text{O}_2$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$  435.2270 found 435.2282.

**5-(4-((2*R*,5*S*)-5-(4-Chlorobenzyl)-2-(methoxymethyl)morpholino)piperidin-1-yl)-4*H*-1,2,4-triazol-3-amine 2,2,2-Trifluoroacetate (16).**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.42 ( $J_{\text{AA}'\text{BB}'}$

= 8.3 Hz, 2H), 7.33 ( $J_{AA'BB'}$  = 8.2 Hz, 2H), 3.91–3.80 (m, 4H), 3.64–3.53 (m, 3H), 3.53–3.44 (m, 3H), 3.30 (s, 3H), 3.15–3.02 (m, 3H), 2.94–2.86 (m, 1H), 2.85–2.79 (m, 1H), 2.21–2.12 (m, 2H), 1.66–1.55 (m, 2H);  $^1\text{H}$  NMR (700 MHz, DMSO- $d_6$  + D $_2$ O, 348 K)  $\delta$  7.40–7.35 (m, 2H), 7.35–7.26 (m, 2H), 3.92–3.83 (m, 3H), 3.74–3.66 (m, 2H), 3.66–3.60 (m, 2H), 3.55–3.50 (m, 2H), 3.44–3.38 (m, 1H), 3.36–3.28 (m, 3H), 3.20–3.07 (m, 3H), 2.96–2.85 (m, 2H), 2.21–2.09 (m, 2H), 1.69–1.57 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (176 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  134.9, 132.4, 131.9 (2 $\times$ ), 129.2 (2 $\times$ ), 72.2, 64.9, 59.2, 58.84, 58.76, 55.6, 45.2, 45.1, 39.9, 27.4, 25.91, 25.89, 25.6 (one signal is missing due to overlap); HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for C $_{20}$ H $_{30}$ ClN $_6$ O $_2$  [M + H] $^+$  421.2113 found 421.2131.

**(2R,5S)-4-(1-(5-Amino-4H-1,2,4-triazol-3-yl)piperidin-4-yl)-5-(4-chlorobenzyl)-N-methylmorpholine-2-carboxamide 2,2,2-Trifluoroacetate (17).**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ , 348 K)  $\delta$  7.62 (bs, 1H), 7.35 ( $J_{AA'BB'}$  = 8.5 Hz, 2H), 7.30 ( $J_{AA'BB'}$  = 8.5 Hz, 2H), 4.05–3.97 (m, 1H), 3.82–3.74 (m, 2H), 3.63–3.54 (m, 2H), 3.30–3.11 (m, 2H), 3.02–2.82 (m, 6H), 2.66 (d,  $J$  = 4.7 Hz, 3H), 1.98–1.92 (m, 2H), 1.57–1.47 (m, 2H);  $^1\text{H}$  NMR (700 MHz, DMSO- $d_6$  + D $_2$ O, 348 K)  $\delta$  7.42–7.32 (m, 4H), 4.37–4.29 (m, 1H), 3.91–3.79 (m, 3H), 3.76–3.63 (m, 3H), 3.33–3.23 (m, 1H), 3.15–3.08 (m, 2H), 3.04–2.93 (m, 2H), 2.54–2.45 (m, 3H), 2.23–2.11 (m, 2H), 1.84–1.66 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (176 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  167.8, 134.9, 132.4, 132.0 (2 $\times$ ), 129.1 (2 $\times$ ), 73.2, 64.6, 58.7, 55.9, 45.2, 45.1, 44.7, 39.8, 27.9, 26.0, 25.9, 25.5 (one signal is missing due to overlap); HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for C $_{20}$ H $_{29}$ ClN $_7$ O $_2$  [M + H] $^+$  434.2066 found 434.2071.

**Protein Expression and Purification.** Gene coding human chitotriosidase hCHIT1 catalytic domain (residues 1–386) was cloned into the pCMV2 expression vector. Protein expression was performed in suspension-cultivated mammalian FreeStyle 293-F HEK cells using FectoPro transfection reagent (Polyplus transfection). The secreted protein was purified using three-step protocol. Clarified culture medium was precipitated with ammonium sulfate added to a final saturation of 45%. The precipitate was collected by centrifugation and resuspended in buffer A (20 mM Tris, pH 8.5, 10 mM NaCl, 1 mM DTT). The suspension was concentrated, and the buffer was exchanged to buffer A to remove excess of ammonium sulfate. The material was loaded on a 1 mL Resource Q column (GE Healthcare) equilibrated with buffer A. After loading, the column was washed with buffer A and bounded proteins were eluted with 1 M sodium chloride in buffer A. The flow-through fraction containing hCHIT1 protein was purified by size-exclusion chromatography on a Superdex 200 Increase 10/30 GL (GE Healthcare) column in buffer B (20 mM Tris, pH 8.5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT). The protein purity was estimated by SDS–PAGE followed by Coomassie Brilliant Blue staining. The enzyme concentration was determined from the absorption at 280 nm using a UV NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific).

**Crystallization.** For crystallization, the hCHIT1 protein was concentrated to 7.3 mg/mL in buffer B and mixed with OATD-01 ligand in 1:5 molar ratio. Single crystals were obtained for hCHIT1–OATD-01 complex mixed with an equal volume of reservoir buffer that contained 0.2 M potassium sodium tartrate (pH 7.2) and 31% (w/v) PEG 3350 using the hanging drop vapor diffusion method at 18 °C. Crystals were cryoprotected in 30% glycerol and flash frozen in liquid nitrogen.

**Diffraction Data Collection, Structure Solution, and Refinement.** X-ray diffraction data for hCHIT1–OATD-01 crystals were collected at beamline 14.1 at Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung (BESSY).<sup>34</sup> The diffraction data were collected to 1.5 Å resolution. Data were processed and scaled with XDS.<sup>49</sup> Phases were determined by molecular replacement using Phaser-MR module in Phenix.<sup>50</sup> The structure of one molecule of hCHIT1 (PDB code 1WBO) was used as the starting model for molecular replacement. Six independent copies of hCHIT1 were found as a MR solution.

The model was improved by manual model building using Coot<sup>51</sup> and refined in Phenix.refine with 5% of unique reflections flagged for  $R_{\text{free}}$  calculation. The structure of the hCHIT1–OATD-01 complex

was refined with 98.39% residues in the favored region of the Ramachandran plot. X-ray data collection and refinement statistic are summarized in Table 3. Structural analyses and figures were prepared using PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, version 2.2.1, Schrödinger, LLC).

**Table 3. Data Collection and Refinement Statistics of hCHIT1–OATD-01 Complex Crystal<sup>a</sup>**

Data Collection	
space group	$P 2_1 2_1 2_1$
cell dimensions	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	87.34, 93.76, 281.68
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (deg)	90.00, 90.00, 90.00
resolution (Å)	47.34–1.50 (1.59–1.50) <sup>b</sup>
$R_{\text{meas}}$ (%)	7.3 (104.6) <sup>b</sup>
$I/\sigma(I)$	17.04 (1.70) <sup>b</sup>
$CC_{1/2}$ <sup>c</sup>	99.9 (61.0) <sup>b</sup>
completeness (%)	99.6 (97.7) <sup>b</sup>
Refinement	
unique reflections	368652
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ (%)	12.3/16.8
number of atoms	20052
protein	17508
ligand ion	162 6
water	2370
B factor	23.6
protein	21.3
ligand/ion	18.1
water	41.0
rms deviation	
bond length (Å)	0.0133
bond angle (deg)	1.14

<sup>a</sup>The data collection statistics are based on a single crystal. <sup>b</sup>Values in parentheses are for highest-resolution shell. <sup>c</sup> $CC_{1/2}$ , correlation coefficient between the average intensities in two parts of the unmerged data, each with a random half of the measurements of each unique reflection.

**Enzymatic Assays.** Determination of IC $_{50}$  toward human and mouse AMCase and human and mouse CHIT1 was done as described previously.<sup>39</sup>

**In Vivo Studies.** The pharmacokinetics studies were performed in accordance with protocols by the Institute for Animal Care and Use Committee and were approved by Warsaw Local Ethics Committee for Animal Experimentation (Approvals 79/2015, 82/2015, 452/2017), Poland. The animals used in the bleomycin-induced pulmonary fibrosis model were cared for following guidelines Act on Welfare and Management of Animals, Standards Relating to the Care and Management of Laboratory Animals and Relief of Pain, and Guidelines for Proper Conduct of Animal Experiments, Japan.

**Pharmacokinetics Measurements in Mice.** The PK properties of OATD-01 were measured in female BALB/c mice following single intravenous bolus (3 mg/kg) or oral (10 mg/kg) administration. Compound 9 (OATD-01) was prepared in a in 20% solutol/4% glucose in water vehicle for intravenous bolus and oral administrations at 5 mL/kg, respectively, and administered to 2 mice/group per time point with samples collected up to 24 h after dose. Blood collection was performed by cardiac puncture under anesthesia with sampling of blood into K $_2$ EDTA anticoagulant tubes, followed by centrifugation to obtain plasma. Samples were stored frozen at –80 °C or lower prior to compound extraction and LC–MS/MS analysis. Pharmacokinetic parameters of compound OATD-01 in mice were calculated by standard noncompartmental modeling from the systemic plasma concentration–time profile.

**Pharmacokinetics Measurements in Rats.** The PK properties of OATD-01 were evaluated in male Sprague-Dawley (SD) rats

following single intravenous bolus (2 mg/kg) or oral (6 mg/kg) administration. OATD-01 was prepared in a 10% ethanol/10% solutol in water vehicle for intravenous bolus and oral administrations at 1.5 mL/kg or 5 mL/kg, respectively. Blood collection was performed at 5 min (iv only), 15 min (iv only), 30 min, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h, and 24 h after OATD-01 administration ( $n = 2$ ) serially from same animal by tail vein puncture without anesthesia. Blood was collected into K<sub>2</sub>EDTA anticoagulant tubes followed by centrifugation to obtain plasma. Plasma samples were snap frozen and stored at  $-80$  °C or lower prior to compound extraction and LC-MS/MS analysis. Pharmacokinetic parameters of OATD-01 in rats were calculated by standard noncompartmental modeling from the systemic plasma concentration–time profile.

**Pharmacokinetics Measurements in Dogs.** The PK properties of OATD-01 were evaluated in male Beagle dogs following single intravenous bolus (3 mg/kg) or oral (10 mg/kg) administration. OATD-01 was prepared in a 5% aqueous glucose vehicle for intravenous bolus and oral administrations at 0.75 mL/kg or 2.5 mL/kg, respectively. Blood collection was performed at 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, and 24 h after dose of OATD-01 administration, serially from same animal by jugular vein puncture without anesthesia. Blood was collected into sodium heparin anticoagulant tubes followed by centrifugation to obtain plasma. The concentrations of OATD-01 in dog plasma after extraction were determined by LC-MS/MS. Pharmacokinetic parameters were calculated by standard noncompartmental modeling from the systemic plasma concentration–time profile.

**PK/PD Study of OATD-01 (9) in Mice.** The PK/PD properties of compound OATD-01 were evaluated in female C57BL/6N mice (Charles River, Germany) following single (q.d.) and double (b.i.d., interval 8 h) dose of OATD-01 in 0.5% carboxymethyl cellulose (CMC) administered by oral gavage at 30 mg/kg/dose. A control group received vehicle only. At the defined time-points up to 24 h after last compound administration, mice were preanesthetized with isoflurane, euthanized by overdosing of pentobarbital and blood was collected to EDTA-coated tubes, mixed, and centrifuged 2000g for 10 min in 4 °C. The collected plasma was stored in  $-80$  °C until analysis. The perfused lungs were homogenized using bead tissue homogenizer (Bertin Instruments) in 10% ethanol, centrifuged, and the supernatants were collected and stored in  $-80$  °C until analysis. OATD-01 concentrations in plasma and tissue homogenate were assayed by LC-MS/MS. Chitinolytic activity (PD parameter) in plasma and tissue homogenates was measured as described previously.<sup>39</sup>

**Bleomycin-Induced Model of Pulmonary Fibrosis.** The study applying bleomycin-induced pulmonary fibrosis model in mice was performed at SMC Laboratories, Inc., Tokyo, Japan. On day 0, 60 mice were anesthetized with pentobarbital sodium (Kyoritsu Seiyaku, Japan) and intratracheally administered with bleomycin (lot no. 261810, Nippon Kayaku, Japan) in saline at a dose of 3 mg/kg, in a volume of 50  $\mu$ L per animal using a Microsprayer (Penn-Century, USA). The mice were transferred to a clean cage (resting cage) and kept until recovery from anesthesia. The bleomycin administration took place on two separate days, with equal numbers of mice assigned to each day. Control mice were intratracheally administered with saline, instead of the bleomycin, and served as the sham-control group. In each slot, bleomycin-induced pulmonary fibrosis model mice were divided into 5 groups of 6 mice based on the body weight changes on the day before the start of treatment at day 7. OATD-01 and nintedanib were prepared in 0.5% carboxymethyl cellulose solution and administered orally in a volume of 10 mL/kg. OATD-01 was administered at two doses 30 and 100 mg/kg q.d., while nintedanib was administered at a reference dose of 100 mg/kg q.d.

**Chitinolytic Activity in Plasma.** The plasma samples were stored at  $-80$  °C prior to measurement of the chitinolytic activity in these samples as described previously.<sup>39</sup>

**Histopathological Analysis of Pulmonary Fibrosis.** Right lung tissues prefixed in 10% neutral buffered formalin were embedded in paraffin and sectioned at 4  $\mu$ m. For fibrosis analysis, the sections were stained with Masson's trichrome kit (Sigma, USA) according to the manufacturer's instructions. The degree of pulmonary fibrosis was

evaluated using the Ashcroft score<sup>47,48</sup> for the semiquantitative histological analysis.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.0c01179>.

Molecular formula strings and some data (XLS)

Permeability and physicochemical properties of OATD-01; CYPs and transporters inhibition data; superimposition of the active site residues in hCHIT1 complexed to OATD-01 and OAT-177; PK profiles of compounds 11 and 15–17; experimental procedures for compounds 5, 7, 8, 15–17; <sup>1</sup>H NMR spectra of compounds 5–17; HPLC profile of compounds 3–17 (PDF)

## Accession Codes

Atomic coordinates and structure factors for the reported crystal structure have been deposited in the Protein Data Bank (PDB code 6ZE8) and will be released upon publication.

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

Adam Golebiowski – OncoArendi Therapeutics SA, 02-089 Warsaw, Poland; [orcid.org/0000-0001-5960-2995](https://orcid.org/0000-0001-5960-2995); Phone: +48 (22) 552 67 24; Email: [a.golebiowski@oncoarendi.com](mailto:a.golebiowski@oncoarendi.com)

### Authors

Robert Koralewski – OncoArendi Therapeutics SA, 02-089 Warsaw, Poland  
Barbara Dymek – OncoArendi Therapeutics SA, 02-089 Warsaw, Poland  
Marzena Mazur – OncoArendi Therapeutics SA, 02-089 Warsaw, Poland  
Piotr Sklepkiwicz – OncoArendi Therapeutics SA, 02-089 Warsaw, Poland  
Sylwia Olejniczak – OncoArendi Therapeutics SA, 02-089 Warsaw, Poland  
Wojciech Czestkowski – OncoArendi Therapeutics SA, 02-089 Warsaw, Poland  
Krzysztof Matyszewski – OncoArendi Therapeutics SA, 02-089 Warsaw, Poland  
Gleb Andryianau – OncoArendi Therapeutics SA, 02-089 Warsaw, Poland  
Piotr Niedziejko – OncoArendi Therapeutics SA, 02-089 Warsaw, Poland  
Michal Kowalski – OncoArendi Therapeutics SA, 02-089 Warsaw, Poland  
Mariusz Gruza – OncoArendi Therapeutics SA, 02-089 Warsaw, Poland  
Bartłomiej Borek – OncoArendi Therapeutics SA, 02-089 Warsaw, Poland  
Karol Jedrzejczak – OncoArendi Therapeutics SA, 02-089 Warsaw, Poland  
Agnieszka Bartoszewicz – OncoArendi Therapeutics SA, 02-089 Warsaw, Poland  
Elżbieta Pluta – OncoArendi Therapeutics SA, 02-089 Warsaw, Poland  
Aleksandra Rymaszewska – OncoArendi Therapeutics SA, 02-089 Warsaw, Poland



- Magdalena Kania** – OncoArendi Therapeutics SA, 02-089 Warsaw, Poland
- Tomasz Rejczak** – OncoArendi Therapeutics SA, 02-089 Warsaw, Poland
- Sylvia Piasecka** – OncoArendi Therapeutics SA, 02-089 Warsaw, Poland
- Michał Mlacki** – OncoArendi Therapeutics SA, 02-089 Warsaw, Poland
- Marcin Mazurkiewicz** – OncoArendi Therapeutics SA, 02-089 Warsaw, Poland
- Michał Piotrowicz** – OncoArendi Therapeutics SA, 02-089 Warsaw, Poland; [orcid.org/0000-0001-7214-858X](https://orcid.org/0000-0001-7214-858X)
- Magdalena Salamon** – OncoArendi Therapeutics SA, 02-089 Warsaw, Poland
- Agnieszka Zagodzón** – OncoArendi Therapeutics SA, 02-089 Warsaw, Poland
- Agnieszka Napiorkowska-Gromadzka** – Structural Biology Center, International Institute of Molecular and Cell Biology, 02-109 Warsaw, Poland
- Aneta Bartłomiejczak** – Structural Biology Center, International Institute of Molecular and Cell Biology, 02-109 Warsaw, Poland
- Witold Mozga** – OncoArendi Therapeutics SA, 02-089 Warsaw, Poland
- Paweł Dobrzański** – OncoArendi Therapeutics SA, 02-089 Warsaw, Poland
- Karolina Dzwonek** – OncoArendi Therapeutics SA, 02-089 Warsaw, Poland
- Jakub Golab** – OncoArendi Therapeutics SA, 02-089 Warsaw, Poland; Department of Immunology, Medical University of Warsaw, 02-097 Warsaw, Poland
- Marcin Nowotny** – Structural Biology Center, International Institute of Molecular and Cell Biology, 02-109 Warsaw, Poland; [orcid.org/0000-0001-8632-0977](https://orcid.org/0000-0001-8632-0977)
- Jacek Olczak** – OncoArendi Therapeutics SA, 02-089 Warsaw, Poland; [orcid.org/0000-0001-9932-2373](https://orcid.org/0000-0001-9932-2373)

Complete contact information is available at:  
<https://pubs.acs.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01179>

### Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

### Notes

The authors declare the following competing financial interest(s): Some of the authors are current employees of OncoArendi Therapeutics SA and own company stocks.

### ACKNOWLEDGMENTS

Studies were supported by two projects: (1) “Development of a first-in-class small molecule drug candidate for treatment of idiopathic pulmonary fibrosis through chitotriosidase inhibition” (Grant POIR.01.01.01-00-0551/15), acronym IPF, and (2) “Preclinical research and clinical trials of a first-in class development candidate in therapy of asthma and inflammatory bowel disease” (Grant POIR.01.01.01-00-0168/15), acronym IBD. Both were cofunded by the National Centre for Research and Development in the framework of European Funds Smart Growth.

### ABBREVIATIONS USED

AMCase, acidic mammalian chitinase; hAMCase, human acidic mammalian chitinase; mAMCase, mouse acidic mammalian chitinase; CHIT1, chitotriosidase; hCHIT1, human chitotriosidase; mCHIT1, mouse chitotriosidase; IL-13, interleukin 13; Th2, type 2 helper T cell; TBTU, *N,N,N',N'*-tetramethyl-*O*-(benzotriazol-1-yl)uronium tetrafluoroborate; DIPEA, *N,N*-diisopropylethylamine;  $V_{ss}$ , steady-state volume of distribution; CL, clearance;  $AUC_{0-inf}$ , area under the curve;  $C_{max}$ , peak plasma concentration of a drug after administration;  $T_{max}$ , time to reach  $C_{max}$ ; BAL, bronchoalveolar lavage

### REFERENCES

- Lee, C. G.; Da Silva, C. A.; Dela Cruz, C. S.; Ahangari, F.; Ma, B.; Kang, M. J.; He, C. H.; Takyar, S.; Elias, J. A. Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury. *Annu. Rev. Physiol.* **2011**, *73*, 479–501.
- Mack, I.; Hector, A.; Ballbach, M.; Kohlhaufl, J.; Fuchs, K. J.; Weber, A.; Mall, M. A.; Hartl, D. The role of chitin, chitinases, and chitinase-like proteins in pediatric lung diseases. *Mol. Cell Pediatr.* **2015**, *2*, 3.
- van Eijk, M.; van Roomen, C. P.; Renkema, G. H.; Bussink, A. P.; Andrews, L.; Blommaart, E. F.; Sugar, A.; Verhoeven, A. J.; Boot, R. G.; Aerts, J. M. Characterization of human phagocyte-derived chitotriosidase, a component of innate immunity. *Int. Immunol.* **2005**, *17*, 1505–1512.
- Boot, R. G.; Blommaart, E. F.; Swart, E.; Ghauharali-Van der Vlugt, K.; Bijl, N.; Moe, C.; Place, A.; Aerts, J. M. Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 6770–6778.
- Fadel, F.; Zhao, Y.; Cousido-Siah, A.; Ruiz, F. X.; Mitschler, A.; Podjarny, A. X-ray crystal structure of the full length human chitotriosidase (CHIT1) reveals features of its chitin binding domain. *PLoS One* **2016**, *11*, No. e0154190.
- Garth, J. M.; Mackel, J. J.; Reeder, K. M.; Blackburn, J. P.; Dunaway, C. W.; Yu, Z.; Matalon, S.; Fitz, L.; Steele, C. Acidic mammalian chitinase negatively affects immune responses during acute and chronic *Aspergillus fumigatus* exposure. *Infect. Immun.* **2018**, *86*, e00944-17.
- Yang, C. J.; Liu, Y. K.; Liu, C. L.; Shen, C. N.; Kuo, M. L.; Su, C. C.; Tseng, C. P.; Yen, T. C.; Shen, C. R. Inhibition of acidic mammalian chitinase by RNA interference suppresses ovalbumin-sensitized allergic asthma. *Hum. Gene Ther.* **2009**, *20*, 1597–1606.
- Zhu, Z.; Zheng, T.; Homer, R. J.; Kim, Y. K.; Chen, N. Y.; Cohn, L.; Hamid, Q.; Elias, J. A. Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. *Science* **2004**, *304*, 1678–1682.
- Agapov, E.; Battaile, J. T.; Tidwell, R.; Hachem, R.; Patterson, G. A.; Pierce, R. A.; Atkinson, J. J.; Holtzman, M. J. Macrophage chitinase 1 stratifies chronic obstructive lung disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2009**, *41*, 379–384.
- Cho, S. J.; Weiden, M. D.; Lee, C. G. Chitotriosidase in the pathogenesis of inflammation, interstitial lung diseases and COPD. *Allergy, Asthma Immunol. Res.* **2015**, *7*, 14–21.
- Di Rosa, M.; De Gregorio, C.; Malaguarnera, G.; Tuttobene, M.; Biazzo, F.; Malaguarnera, L. Evaluation of AMCase and CHIT-1 expression in monocyte macrophages lineage. *Mol. Cell. Biochem.* **2013**, *374*, 73–80.
- Seibold, M. A.; Donnelly, S.; Solon, M.; Innes, A.; Woodruff, P. G.; Boot, R. G.; Burchard, E. G.; Fahy, J. V. Chitotriosidase is the primary active chitinase in the human lung and is modulated by genotype and smoking habit. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2008**, *122*, 944–950.
- Li, X.; Zhu, L.; Wang, B.; Yuan, M.; Zhu, R. Drugs and targets in fibrosis. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 855.
- Malaguarnera, L.; Di Rosa, M.; Zambito, A. M.; dell’Ombra, N.; Di Marco, R.; Malaguarnera, M. Potential role of chitotriosidase gene

in nonalcoholic fatty liver disease evolution. *Am. J. Gastroenterol.* **2006**, *101*, 2060–2069.

(15) Malaguarnera, L.; Di Rosa, M.; Zambito, A. M.; dell'Ombra, N.; Nicoletti, F.; Malaguarnera, M. Chitotriosidase gene expression in Kupffer cells from patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* **2006**, *55*, 1313–1320.

(16) Lee, C. G.; Herzog, E. L.; Ahangari, F.; Zhou, Y.; Gulati, M.; Lee, C. M.; Peng, X.; Feghali-Bostwick, C.; Jimenez, S. A.; Varga, J.; Elias, J. A. Chitinase 1 is a biomarker for and therapeutic target in scleroderma-associated interstitial lung disease that augments TGF- $\beta$ 1 signaling. *J. Immunol.* **2012**, *189*, 2635–2644.

(17) Ramanathan, R.; Kohli, A.; Ingaramo, M. C.; Jain, A.; Leng, S. X.; Punjabi, N. M.; Walston, J. D.; Fedarko, N. S. Serum chitotriosidase, a putative marker of chronically activated macrophages, increases with normal aging. *J. Gerontol., Ser. A* **2013**, *68*, 1303–1309.

(18) James, A. J.; Reinius, L. E.; Verhoek, M.; Gomes, A.; Kupczyk, M.; Hammar, U.; Ono, J.; Ohta, S.; Izuhara, K.; Bel, E.; Kere, J.; Soderhall, C.; Dahlen, B.; Boot, R. G.; Dahlen, S. E. Increased YKL-40 and chitotriosidase in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2016**, *193*, 131–142.

(19) Kim, L. K.; Morita, R.; Kobayashi, Y.; Eisenbarth, S. C.; Lee, C. G.; Elias, J.; Eynon, E. E.; Flavell, R. A. AMCase is a crucial regulator of type 2 immune responses to inhaled house dust mites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112*, E2891–2899.

(20) Mazur, M.; Olczak, J.; Olejniczak, S.; Koralewski, R.; Czestkowski, W.; Jedrzejczak, A.; Golab, J.; Dzwonek, K.; Dymek, B.; Sklepkiwicz, P. L.; Zagodzdzon, A.; Noonan, T.; Mahboubi, K.; Conway, B.; Sheeler, R.; Beckett, P.; Hungerford, W. M.; Podjarny, A.; Mitschler, A.; Cousido-Siah, A.; Fadel, F.; Golebiowski, A. Targeting acidic mammalian chitinase is effective in animal model of asthma. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 695–710.

(21) Bargagli, E.; Margollicci, M.; Luddi, A.; Nikiforakis, N.; Perari, M. G.; Grosso, S.; Perrone, A.; Rottoli, P. Chitotriosidase activity in patients with interstitial lung diseases. *Respir. Med.* **2007**, *101*, 2176–2181.

(22) Bargagli, E.; Bennett, D.; Maggiorelli, C.; Di Sipio, P.; Margollicci, M.; Bianchi, N.; Rottoli, P. Human chitotriosidase: a sensitive biomarker of sarcoidosis. *J. Clin. Immunol.* **2013**, *33*, 264–270.

(23) Bargagli, E.; Margollicci, M.; Nikiforakis, N.; Luddi, A.; Perrone, A.; Grosso, S.; Rottoli, P. Chitotriosidase activity in the serum of patients with sarcoidosis and pulmonary tuberculosis. *Respiration* **2007**, *74*, 548–552.

(24) Aminuddin, F.; Akhbar, L.; Stefanowicz, D.; Pare, P. D.; Connett, J. E.; Anthonisen, N. R.; Fahy, J. V.; Seibold, M. A.; Burchard, E. G.; Eng, C.; Gulsvik, A.; Bakke, P.; Cho, M. H.; Litonjua, A.; Lomas, D. A.; Anderson, W. H.; Beaty, T. H.; Crapo, J. D.; Silverman, E. K.; Sandford, A. J. Genetic association between human chitinases and lung function in COPD. *Hum. Genet.* **2012**, *131*, 1105–1114.

(25) Byrne, A. J.; Maher, T. M.; Lloyd, C. M. Pulmonary macrophages: a new therapeutic pathway in fibrosing lung disease? *Trends Mol. Med.* **2016**, *22*, 303–316.

(26) King, T. E., Jr.; Pardo, A.; Selman, M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* **2011**, *378*, 1949–1961.

(27) Martinez, F. J.; Safrin, S.; Weycker, D.; Starko, K. M.; Bradford, W. Z.; King, T. E., Jr.; Flaherty, K. R.; Schwartz, D. A.; Noble, P. W.; Raghu, G.; Brown, K. K. The clinical course of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Ann. Intern. Med.* **2005**, *142*, 963–967.

(28) Murray, L. A. Commonalities between the pro-fibrotic mechanisms in COPD and IPF. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **2012**, *25*, 276–280.

(29) Reyfman, P. A.; Walter, J. M.; Joshi, N.; Anekalla, K. R.; McQuattie-Pimentel, A. C.; Chiu, S.; Fernandez, R.; Akbarpour, M.; Chen, C. I.; Ren, Z.; Verma, R.; Abdala-Valencia, H.; Nam, K.; Chi, M.; Han, S.; Gonzalez-Gonzalez, F. J.; Soberanes, S.; Watanabe, S.; Williams, K. J. N.; Flozak, A. S.; Nicholson, T. T.; Morgan, V. K.; Winter, D. R.; Hinchcliff, M.; Hrusch, C. L.; Guzy, R. D.; Bonham, C.

A.; Sperling, A. I.; Bag, R.; Hamanaka, R. B.; Mutlu, G. M.; Yeldandi, A. V.; Marshall, S. A.; Shilatifard, A.; Amaral, L. A. N.; Perlman, H.; Sznajder, J. L.; Argento, A. C.; Gillespie, C. T.; Dematte, J.; Jain, M.; Singer, B. D.; Ridge, K. M.; Lam, A. P.; Bharat, A.; Bhorade, S. M.; Gottardi, C. J.; Budinger, G. R. S.; Misharin, A. V. Single-cell transcriptomic analysis of human lung provides insights into the pathobiology of pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2019**, *199*, 1517–1536.

(30) Chang; Sharma, L.; Dela Cruz, C. S. Chitotriosidase: a marker and modulator of lung disease. *Eur. Respir. Rev.* **2020**, *29*, 190143.

(31) Przysucha, N.; Gorska, K.; Krenke, R. Chitinases and chitinase-like proteins in obstructive lung diseases - current concepts and potential applications. *Int. J. Chronic Obstruct. Pulm. Dis.* **2020**, *15*, 885–899.

(32) Di Rosa, M.; Mangano, K.; De Gregorio, C.; Nicoletti, F.; Malaguarnera, L. Association of chitotriosidase genotype with the development of non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol. Res.* **2013**, *43*, 267–275.

(33) Wandrer, F.; Han, B.; Liebig, S.; Schlue, J.; Manns, M. P.; Schulze-Osthoff, K.; Bantel, H. Senescence mirrors the extent of liver fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2018**, *48*, 270–280.

(34) Mueller, U.; Darowski, N.; Fuchs, M. R.; Forster, R.; Hellmig, M.; Paithankar, K. S.; Puhlinger, S.; Steffien, M.; Zocher, G.; Weiss, M. S. Facilities for macromolecular crystallography at the Helmholtz-Zentrum Berlin. *J. Synchrotron Radiat.* **2012**, *19*, 442–449.

(35) Hirose, T.; Sunazuka, T.; Omura, S. Recent development of two chitinase inhibitors, Argifin and Argadin, produced by soil microorganisms. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* **2010**, *86*, 85–102.

(36) Cole, D. C.; Olland, A. M.; Jacob, J.; Brooks, J.; Bursavich, M. G.; Czerwinski, R.; DeClercq, C.; Johnson, M.; Joseph-McCarthy, D.; Ellingboe, J. W.; Lin, L.; Nowak, P.; Presman, E.; Strand, J.; Tam, A.; Williams, C. M. M.; Yao, S.; Tsao, D. H. H.; Fitz, L. J. Identification and characterization of acidic mammalian chitinase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6122–6128.

(37) Andryianau, G.; Kowalski, M.; Piotrowicz, M. C.; Rajkiewicz, A. A.; Dymek, B.; Sklepkiwicz, P. L.; Pluta, E.; Stefaniak, F.; Czestkowski, W.; Olejniczak, S.; Mazur, M.; Niedziejko, P.; Koralewski, R.; Matyszewski, K.; Gruza, M.; Zagodzdzon, A.; Salamon, M.; Rymaszewska, A.; Welzer, M.; Dzwonek, K.; Golab, J.; Olczak, J.; Bartoszewicz, A.; Golebiowski, A. Benzoxazepine-derived selective, orally bioavailable inhibitor of human acidic mammalian chitinase. *ACS Med. Chem. Lett.* **2020**, *11*, 1228–1235.

(38) Mazur, M.; Bartoszewicz, A.; Dymek, B.; Salamon, M.; Andryianau, G.; Kowalski, M.; Olejniczak, S.; Matyszewski, K.; Pluta, E.; Borek, B.; Stefaniak, F.; Zagodzdzon, A.; Mazurkiewicz, M.; Koralewski, R.; Czestkowski, W.; Piotrowicz, M.; Niedziejko, P.; Gruza, M. M.; Dzwonek, K.; Golebiowski, A.; Golab, J.; Olczak, J. Discovery of selective, orally bioavailable inhibitor of mouse chitotriosidase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*, 310–314.

(39) Mazur, M.; Dymek, B.; Koralewski, R.; Sklepkiwicz, P.; Olejniczak, S.; Mazurkiewicz, M.; Piotrowicz, M.; Salamon, M.; Jedrzejczak, K.; Zagodzdzon, A.; Czestkowski, W.; Matyszewski, K.; Borek, B.; Bartoszewicz, A.; Pluta, E.; Rymaszewska, A.; Mozga, W.; Stefaniak, F.; Dobrzanski, P.; Dzwonek, K.; Golab, J.; Golebiowski, A.; Olczak, J. Development of dual chitinase inhibitors as potential new treatment for respiratory system diseases. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 7126–7145.

(40) Jiang, X.; Kumar, A.; Motomura, Y.; Liu, T.; Zhou, Y.; Moro, K.; Zhang, K. Y. J.; Yang, Q. A Series of compounds bearing a dipyrro-pyrimidine scaffold acting as novel human and insect pest chitinase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 987–1001.

(41) Piper, D. R.; Duff, S. R.; Eliason, H. C.; Frazee, W. J.; Frey, E. A.; Fuerstenau-Sharp, M.; Jachec, C.; Marks, B. D.; Pollok, B. A.; Shekhani, M. S.; Thompson, D. V.; Whitney, P.; Vogel, K. W.; Hess, S. D. Development of the predictor HERG fluorescence polarization assay using a membrane protein enrichment approach. *Assay Drug Dev. Technol.* **2008**, *6*, 213–223.

(42) Commercially available assay. <https://www.eurofinsdiscoveryservices.com/catalogmanagement/viewitem/DATRat-Dopamine-Transporter-Functional-Antagonist-Uptake-Assay-Cerep/394> (accessed Mar 19, 2019).

(43) Kuntz, K. W.; Campbell, J. E.; Keilhack, H.; Pollock, R. M.; Knutson, S. K.; Porter-Scott, M.; Richon, V. M.; Sneeringer, C. J.; Wigle, T. J.; Allain, C. J.; Majer, C. R.; Moyer, M. P.; Copeland, R. A.; Chesworth, R. The Importance of being Me: magic methyls, methyltransferase inhibitors, and the discovery of tazemetostat. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 1556–1564.

(44) Leung, C. S.; Leung, S. S.; Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W. L. Methyl effects on protein-ligand binding. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4489–4500.

(45) Stumpfe, D.; Hu, Y.; Dimova, D.; Bajorath, J. Recent progress in understanding activity cliffs and their utility in medicinal chemistry. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 18–28.

(46) Sammons, M.; Jennings, S. M.; Herr, M.; Hulford, C. A.; Wei, L.; Hallissey, J. F.; Kiser, E. J.; Wright, S. W.; Piotrowski, D. W. Synthesis of a cis 2,5-disubstituted morpholine by de-epimerization: application to the multigram scale synthesis of a mineralocorticoid antagonist. *Org. Process Res. Dev.* **2013**, *17*, 934–939.

(47) Ashcroft, T.; Simpson, J. M.; Timbrell, V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J. Clin. Pathol.* **1988**, *41*, 467–470.

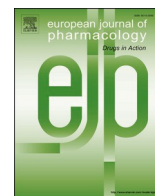
(48) Hubner, R. H.; Gitter, W.; El Mokhtari, N. E.; Mathiak, M.; Both, M.; Bolte, H.; Freitag-Wolf, S.; Bewig, B. Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples. *BioTechniques* **2008**, *44*, 507–517.

(49) Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 125–132.

(50) Adams, P. D.; Afonine, P. V.; Bunkoczi, G.; Chen, V. B.; Davis, I. W.; Echols, N.; Headd, J. J.; Hung, L. W.; Kapral, G. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; McCoy, A. J.; Moriarty, N. W.; Oeffner, R.; Read, R. J.; Richardson, D. C.; Richardson, J. S.; Terwilliger, T. C.; Zwart, P. H. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 213–221.

(51) Emsley, P.; Lohkamp, B.; Scott, W. G.; Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 486–501.

### 7.3 *Inhibition of CHIT1 as a novel therapeutic approach in idiopathic pulmonary fibrosis*



## Inhibition of CHIT1 as a novel therapeutic approach in idiopathic pulmonary fibrosis

Piotr Sklepkiewicz<sup>a,1</sup>, Barbara A. Dymek<sup>a,e,\*</sup>, Michal Mlacki<sup>a</sup>, Robert Koralewski<sup>a</sup>, Marzena Mazur<sup>a</sup>, Patrycja Nejman-Gryz<sup>b</sup>, Serdar Korur<sup>a</sup>, Agnieszka Zagodzón<sup>a</sup>, Aleksandra Rymaszewska<sup>a</sup>, Jan H. von der Thüsen<sup>c</sup>, Anna M. Siwińska<sup>a</sup>, Nazan Cemre Güner<sup>a</sup>, Łukasz Cheda<sup>a</sup>, Magdalena Paplinska-Goryca<sup>b</sup>, Małgorzata Proboszcz<sup>b</sup>, Thierry P. P. van den Bosch<sup>c</sup>, Katarzyna Górka<sup>b</sup>, Jakub Golab<sup>d</sup>, Rafał M. Kamiński<sup>a</sup>, Rafał Krenke<sup>b</sup>, Adam Golebiowski<sup>a</sup>, Karolina Dzwonek<sup>a</sup>, Pawel Dobrzanski<sup>a</sup>

<sup>a</sup> OncoArendi Therapeutics SA, 02-089, Warsaw, Poland

<sup>b</sup> Department of Internal Medicine, Pulmonary Diseases and Allergy, Medical University of Warsaw, 02-097, Warsaw, Poland

<sup>c</sup> Department of Pathology, Erasmus Medical Center, 3015 GD, Rotterdam, the Netherlands

<sup>d</sup> Department of Immunology, Medical University of Warsaw, 02-097, Warsaw, Poland

<sup>e</sup> Postgraduate School of Molecular Medicine, Medical University of Warsaw, 02-097, Warsaw, Poland

### ARTICLE INFO

#### Chemical compounds studied in this article:

OATD-01 (PubChem ID 126642132)

Pirfenidone (PubChem ID 40632)

#### Keywords:

IPF

CHIT1

OATD-01

Pulmonary fibrosis

Anti-fibrotics

### ABSTRACT

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a progressive and eventually fatal lung disease with a complex etiology. Approved drugs, nintedanib and pirfenidone, modify disease progression, but IPF remains incurable and there is an urgent need for new therapies. We identified chitotriosidase (CHIT1) as new driver of fibrosis in IPF and a novel therapeutic target. We demonstrate that CHIT1 activity and expression are significantly increased in serum (3-fold) and induced sputum (4-fold) from IPF patients. In the lungs *CHIT1* is expressed in a distinct subpopulation of profibrotic, disease-specific macrophages, which are only present in patients with ILDs and *CHIT1* is one of the defining markers of this fibrosis-associated gene cluster. To define CHIT1 role in fibrosis, we used the therapeutic protocol of the bleomycin-induced pulmonary fibrosis mouse model. We demonstrate that in the context of chitinase induction and the macrophage-specific expression of CHIT1, this model recapitulates lung fibrosis in ILDs. Genetic inactivation of *Chit1* attenuated bleomycin-induced fibrosis (decreasing the Ashcroft scoring by 28%) and decreased expression of profibrotic factors in lung tissues. Pharmacological inhibition of chitinases by OATD-01 reduced fibrosis and soluble collagen concentration. OATD-01 exhibited anti-fibrotic activity comparable to pirfenidone resulting in the reduction of the Ashcroft score by 32% and 31%, respectively. These studies provide a preclinical proof-of-concept for the antifibrotic effects of OATD-01 and establish CHIT1 as a potential new therapeutic target for IPF.

### 1. Introduction

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a progressive and eventually fatal lung disease with a complex and not fully understood etiology. The abnormal wound healing responses to a repetitive lung injury are the key mechanism initiating development of fibrosis (Richeldi et al., 2017). The common feature of IPF is the disordered accumulation of extracellular matrix (ECM) proteins within the interstitium and alveolar spaces

that leads to chronic fibrosis with progressive destruction of lung architecture and a loss of function. The pathogenesis of IPF has not been fully elucidated, but the genetic complexity, variable pathology and heterogeneity of progression patterns suggest existence of multiple triggers and numerous pathogenic pathways. The intricate interplay between genetic, environmental, and ageing-associated factors in IPF has contributed to the limited availability of therapeutic options (Mora et al., 2017). Although two approved drugs, pirfenidone and nintedanib,

\* Corresponding author. OncoArendi Therapeutics SA, Zwirki i Wigury 101, 01-089, Warsaw, Poland.

E-mail address: [b.dymek@oncoarendi.com](mailto:b.dymek@oncoarendi.com) (B.A. Dymek).

<sup>1</sup> these authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.174792>

Received 2 September 2021; Received in revised form 25 January 2022; Accepted 26 January 2022

Available online 2 February 2022

0014-2999/© 2022 The Authors.

Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



have been shown to slow down lung function decline in IPF patients, the condition remains incurable. Thus, there is an urgent need for new therapies (Somogyi et al., 2019).

Chitinases, enzymes that hydrolyze chitin, have been implicated in pathology of interstitial lung diseases (ILDs) and other pulmonary diseases (Lee et al., 2011). Although mammals do not synthesize chitin, they express two enzymatically active chitinases, chitotriosidase (CHIT1) and acidic mammalian chitinase (AMCase) (Di Rosa et al., 2016). In most mammals chitinases are thought to confer protection against chitin-containing pathogens. However, in humans chitinases evolved to play different roles, often associated with pathological inflammatory and fibrotic responses (Chang et al., 2020; Di Rosa et al., 2016; Przysucha et al., 2020). Expression of chitinases is highly induced in various fibrotic and inflammatory lung diseases, including IPF, chronic obstructive pulmonary disease, sarcoidosis and asthma (Bennett et al., 2020; Chang et al., 2020; Cho et al., 2015; James et al., 2016; Lee et al., 2012; Logue et al., 2019; Przysucha et al., 2020). Moreover, increased chitinolytic activity and chitinase expression have been correlated with disease stage and clinical prognosis (Agapov et al., 2009; Bennett et al., 2020; Popevic et al., 2016; Steinacker et al., 2018), implicating the contribution of chitinases in their pathogenesis. Several reports demonstrated that CHIT1 might be a dominant chitinase in human pulmonary diseases (Bargagli et al., 2007; Chang et al., 2020; Seibold et al., 2008). Furthermore, studies in animal models indicated a functional role of CHIT1 in ILDs. In *Chit1*<sup>-/-</sup> mice, lung fibrosis induced by either bleomycin or over-expression of IL-13 was markedly reduced compared to control animals (Lee et al., 2012). Additionally, enhanced lung fibrosis was observed in CHIT1 over-expressing transgenic mice after bleomycin administration. Together, data from clinical studies and preclinical models have implicated CHIT1 in pulmonary fibrosis.

Here, we report a comprehensive analysis of CHIT1 expression and activity in IPF patients. Furthermore, we demonstrate that pharmacological inactivation of CHIT1 results in attenuated lung fibrosis induced by bleomycin in mice, which is consistent with the effects of genetic deletion of *Chit1*. Collectively, the translational and preclinical data establish CHIT1 as a promising new therapeutic target for IPF.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Human samples collection

Newly diagnosed and treatment-naïve IPF patients (11 male, 4 female) were recruited for the study in the Department of Internal Medicine, Pulmonary Diseases and Allergy of the Medical University of Warsaw, Poland between January 2016 and June 2018. The characteristics of healthy individuals and IPF patients is provided in Table 1. All included patients met the IPF diagnostic criteria according to the 2013 ERS/ATS guidelines for the diagnosis and management of IPF (Wells, 2013). The study was approved by the Local Bioethics Committee at the Medical University of Warsaw, Poland, No. of approval: KB/236/2015. Sputum induction, bronchoalveolar lavage fluid (BALF) collection and subsequent sample processing were performed as previously described (Paplinska-Goryca et al., 2020; Proboszcz et al., 2017). The BALF cells were evaluated and counted in May-Grünwald-Giemsa-stained smears (n = 19). IPF lung biopsy samples used for immunohistochemical (IHC)

**Table 1**  
Characteristics of IPF and control populations.

	Healthy control	IPF
Number	29	15
Sex (female, male)	18, 11	4, 11
Age (year) median (minimum, maximum)	32 (22, 68)	73 (62, 84)
BMI median (minimum, maximum)	24.9 (17.6, 44.1)	27.3 (22.2, 33.6)
Race	29 Caucasian	15 Caucasian

staining were obtained from the Pathology Research and Trial Support (PARTS) and the Erasmus MC Tissue Bank (normal lungs n = 4, IPF lungs n = 6). Procedures followed the local regulations that apply for using human biomaterials and data for medical scientific research.

### 2.2. Human CHIT1 concentration

The CHIT1 concentration in human serum samples was measured using CircuLex Human Chitotriosidase ELISA Kit (CycLex) according to the manufacturer's protocol.

### 2.3. Human BALF cells preparation and immunohistochemical CHIT1 staining

Smears were fixed in 10% neutral buffered formalin (NBF) and endogenous peroxidases were inactivated by a 3% hydrogen peroxide solution. Smears blocked in 1% bovine serum albumin (BSA)/10% normal goat serum (NGS) in TBST buffer were incubated with a primary antibody for CHIT1 followed by the secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase (HRP) and visualized with the 3,3'-diaminobenzidine (DAB) reagent. Cells were counterstained with hematoxylin, dehydrated, cleared with xylene, and mounted with resin-based medium. CHIT1-positive cells were counted and the percentage of eosinophils, neutrophils, macrophages and lymphocytes in BALF was determined based on a microscopic examination of the morphology (the size of the cell and the ratio of the nucleus of the cell to the cytoplasm) of 300 cells from various fields. Antibodies: anti-CHIT1 (Biorbyt, orb377995; lot# CQ2228) used at 1:200; donkey anti-rabbit-HRP (Jackson ImmunoResearch, 711-035-152, lot# 126333), used at 1:500.

### 2.4. Expression of chitinases in IPF lungs

Gene expression analysis of *CHIT1* and *CHIA* in the human lungs of IPF patients as compared to control healthy lungs was performed using the IPF gene explorer software (montgomerylab.stanford.edu/resources.html) from the GSE32537 study (Idiopathic Interstitial Pneumonias n = 119; Control n = 50).

### 2.5. Web-based analysis of chitinases expression profile in lungs after single cell RNA sequencing

Single cell RNA sequencing (scRNAseq) analysis of chitinases expression profile in fibrotic vs. donor lungs was done retrospectively using the web-based tool: <https://www.nupulmonary.org/resources>, based on the published study (Reyffman et al., 2019).

### 2.6. Animal studies

All *in vivo* experiments were performed in accordance with protocols approved by the Institute for Animal Care and Use Committee and Local Ethics Committee for Animal Experimentation, Warsaw, Poland. The animal studies were approved by the First Local Ethics Committee for Animal Experimentation, Warsaw, Poland, No. of approval: 452/2017. C57BL/6 female mice were purchased from Charles River Laboratory (Germany), *Chit1*<sup>-/-</sup> and *Chia*<sup>-/-</sup> mice were from Taconic and the KOMP Repository of University of California, Davis (USA), respectively.

### 2.7. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis mouse model

Lung fibrosis was induced by triple intranasal instillations of bleomycin (Sigma Aldrich) in saline to 8-week-old female C57BL/6 mice (Charles River Laboratories). OATD-01 and pirfenidone (Molekula SRL) prepared in 0.5% carboxymethylcellulose were administered twice a day, PO in the therapeutic regimen (day 7 to day 21) at a dose of 30 mg/kg and 250 mg/kg for OATD-01 and pirfenidone, respectively.

## 2.8. Enzymatic assays

IC<sub>50</sub> determination for human and mouse AMCCase and CHIT1 was performed as previously published by Mazur M et al. (Mazur et al., 2018).

## 2.9. Chitinolytic activity in human and murine samples

The chitinolytic activity in murine samples was measured as follows: 1 µl of plasma or appropriate volume of lung homogenate corresponding to 2 µg of protein and 196 µM 4-methylumbelliferyl B-D-N,N' diacetylchitobioside hydrate (Sigma Aldrich) in the assay buffer (0.1 M citrate, 0.2 M dibasic phosphate, 1 mg/ml BSA pH 6.0) were incubated in the dark, at 37 °C for 60 min. Following addition of the stop solution (0.3 M glycine/NaOH Buffer, pH 10.5), the fluorescent reaction product, 4-methylumbelliferone, was measured (excitation 355 nm/emission 460 nm). The chitinase activity was calculated using a standard curve of 4-methylumbelliferone. For human samples, 5 µl of serum or 20 µl of induced sputum and 46 µM 4-methylumbelliferyl B-D-N,N' diacetylchitobioside hydrate in the assay buffer (0.1 M citrate, 0.2 M dibasic phosphate, 1 mg/ml BSA pH 2.0 or pH 6.0) were used. The reaction was run as described for murine samples. The assay was run at pH 2 to determine the AMCCase-specific activity.

## 2.10. Murine BALF collection and analysis

Briefly, lungs were washed via trachea with 1 ml of PBS. Average recovery of BALF was 0.8 ml. The BALF was centrifuged (10 min, 2000 rpm, 4 °C). The cell pellet was resuspended in 300 µl of PBS and used for FACS analysis. Total BALF cells were counted by flow cytometry (Guava, Merck Millipore) and analyzed using specific antibodies to discriminate leukocyte (CD45 positive: CD45.2-PercP-Cy5, eBioscience, cat. No. 45-0454-82) myeloid cells population.

## 2.11. Semi-quantitative scoring of fibrosis and inflammation in the bleomycin-induced mouse model

Fibrosis was assessed by a blinded pathologist on sections stained with picrosirius red (PSR) according to the modified Ashcroft scoring system adapted to laboratory rodents (Hubner et al., 2008). For each animal, the analysis was performed on 3 sections (every containing 3 cross-sectioned lobes from right lung) separated by 200 µm of tissue. Fibrosis was scored for every lobe and the average score per animal was calculated and used for statistical analysis.

## 2.12. Murine lung histology

Lungs were perfused with PBS via the right ventricle and fixed in situ using standard procedures. Briefly, lungs were instilled via catheter in trachea with 10% NBF under constant pressure of 25 cm of liquid for 1h. Lungs were then dissected, processed to paraffin blocks, cut into 5 µm sections and stained with hematoxylin and eosin (HE), PSR, Masson's trichrome or IHC. After staining, slides were dehydrated, cleared and mounted with synthetic resin-based medium. Analyses were performed under light microscope (PrimoStar, Zeiss) equipped with digital camera (Axiocam ERc5s, Zeiss).

## 2.13. Immunohistochemistry of CHIT1 and AMCCase on murine and human FFPE slides

For mouse samples, after dewaxing, antigens were retrieved with HIER at 98 °C in citrate buffer pH 6 with 0.1% Tween 20 (for CHIT1 antibodies) or in Tris-EDTA pH 9 with 0.1% Tween 20 (for AMCCase antibody). Endogenous tissue peroxidases were inactivated by 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O and non-specific binding was blocked with 1% BSA/10% NGS in TBST buffer. Chitinases were detected by specific antibodies and

visualized with secondary antibody conjugated to HRP and by DAB (DAKO kit, K3468, Lot#10111394). Sections were counterstained with hematoxylin. Immunohistochemistry on human material was performed with an automated, validated and accredited staining system (Ventana Benchmark ULTRA) using ultraView Universal DAB Detection Kit (Ventana Medical Systems, 760–500) and counterstaining with hematoxylin. Antibodies: anti-CHIT1 (Cloud Clone, PAJ374Mu01; lot# A20140410988, used at 1:50; anti-AMCCase [clone EPR19984] (Abcam, ab207169; lot# GR284785-2, used at 1:5000; anti-CHIT1 (Biorbyt, orb377995; lot# CQ2228) used at 1:400; donkey anti-rabbit-HRP (Jackson ImmunoResearch, 711-035-152, lot# 126333), used at 1:500.

## 2.14. Soluble collagen levels

The levels of the soluble collagen in murine lungs were evaluated using Sicroll assay (Biocolor, S1000) according to the manufacturer's protocol.

## 2.15. OATD-01 pharmacokinetics/pharmacodynamics evaluation in mice

PK/PD profile of OATD-01 was evaluated in C57BL/6 female mice at the end of the bleomycin-induced pulmonary fibrosis model. OATD-01 was administered at day 21 in two doses separated by 8 h interval (30 mg/kg, PO, b.i.d.). Lungs were collected after 30 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 20 h and 32 h post the first dose and chitinolytic activity was analyzed as described. OATD-01 concentrations in lung homogenates were determined by liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS) technique.

## 2.16. Real-time PCR

Lungs collected from mice were stored in RNALater buffer (Invitrogen). Total RNA was isolated using RNeasy MiniKit (Qiagen). RT PCR was done with High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) according to manufacturer's protocol. Gene-specific TaqMan Assays and TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) were used for gene expression analysis.

## 2.17. Statistical analysis

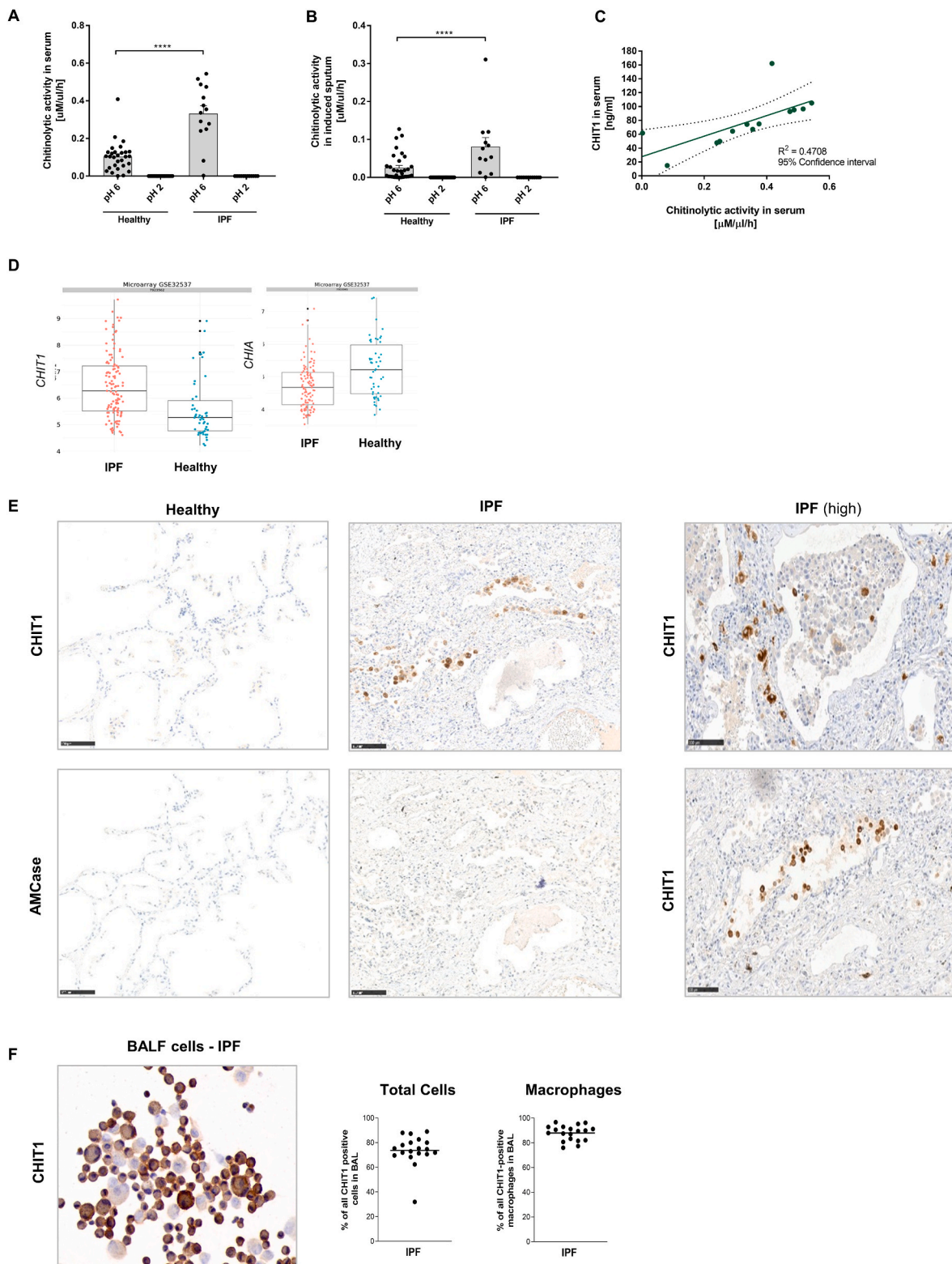
Data was analyzed using GraphPad Prism v. 7.0. Parametric one-way ANOVA with the Dunnett's test for multiple comparisons was used to evaluate the differences between the groups with Gaussian distribution of results (verified with D'Agostino & Pearson omnibus normality test and Shapiro-Wilk normality test). In case of non-Gaussian distribution a non-parametric Kruskal-Wallis test was utilized with Dunn's multiple comparison test to evaluate the differences between the groups to determine p-values. P-values <0.05 were considered significant and noted with asterisks (\* for P < 0.05, \*\* for P < 0.01, \*\*\* for P < 0.001, \*\*\*\* for P < 0.0001).

## 3. Results

### 3.1. CHIT1 is the dominant chitinase in IPF

Multiple reports demonstrated increased chitinolytic activity in the serum of patients with chronic lung diseases. However, as the expression and cellular localization of chitinases in lungs of patients with IPF remained to be elucidated, we first confirmed a significantly elevated chitinolytic activity at pH 6 and not at pH 2 in serum (Fig. 1A) and induced sputum (Fig. 1B), confirming CHIT1 and not AMCCase as the dominant chitinase in IPF. The total chitinolytic activity in serum from IPF patients correlated with CHIT1 concentrations further supporting this conclusion (Fig. 1C). The characteristic of healthy control and IPF patients was presented in Table 1.

These results were further corroborated by a web-based analysis of



**Fig. 1. Induction of chitinolytic activity and CHIT1 expression in IPF patients.** (A) Chitinolytic activity in serum (A) and induced sputum (B) from healthy donors and IPF patients: total chitinolytic activity was determined at pH 6, and AMCase activity was determined at pH 2. (C) Correlation between CHIT1 concentration and the chitinolytic activity in serum of patients with IPF. (D) Gene expression analysis of *CHIT1* and *CH1A* in the lungs of IPF patients and healthy controls. Data were generated from the study GSE32537 (Idiopathic Interstitial Pneumonias  $n = 119$ ; Control  $n = 50$ ) using the IPF gene explorer software. (E) Representative images of immunohistochemical staining of CHIT1 and AMCase in explants from lungs of IPF patients ( $n = 6$ ) and healthy controls ( $n = 4$ ). Two images at higher magnification show CHIT1 staining in interstitial and alveolar macrophages (F) Immunohistochemical analysis of CHIT1 in BALF smears from IPF patients ( $n = 19$ ); representative IHC for CHIT1 in BALF cells and quantitative analysis of CHIT1 positive total cells and macrophages in BALF of IPF patients. Data presented as mean  $\pm$  s.e.m. \*\*\*\* $P < 0.0001$ .



the relative gene expression of *CHIT1* and *CHIA* (AMCase coding gene) in lungs of patients with IPF. This analysis revealed a significant induction of *CHIT1* expression and downregulation of *CHIA* in patients with interstitial pneumonias (GSE32537) as compared to healthy individuals (Fig. 1D). These results demonstrated that CHIT1 is the main chitinase induced in fibrotic lungs of IPF patients.

Moreover, histological analysis of lung biopsies revealed highly upregulated, macrophage-specific CHIT1 expression localized to fibrotic areas (Fig. 1E). In contrast, we did not detect any AMCase expression in lungs of IPF patients (Fig. 1E). This result was further confirmed by the immunocytochemical staining of BALF cell smears from IPF patients demonstrating 70–90% CHIT1-positive cells, in particular macrophages (Fig. 1F).

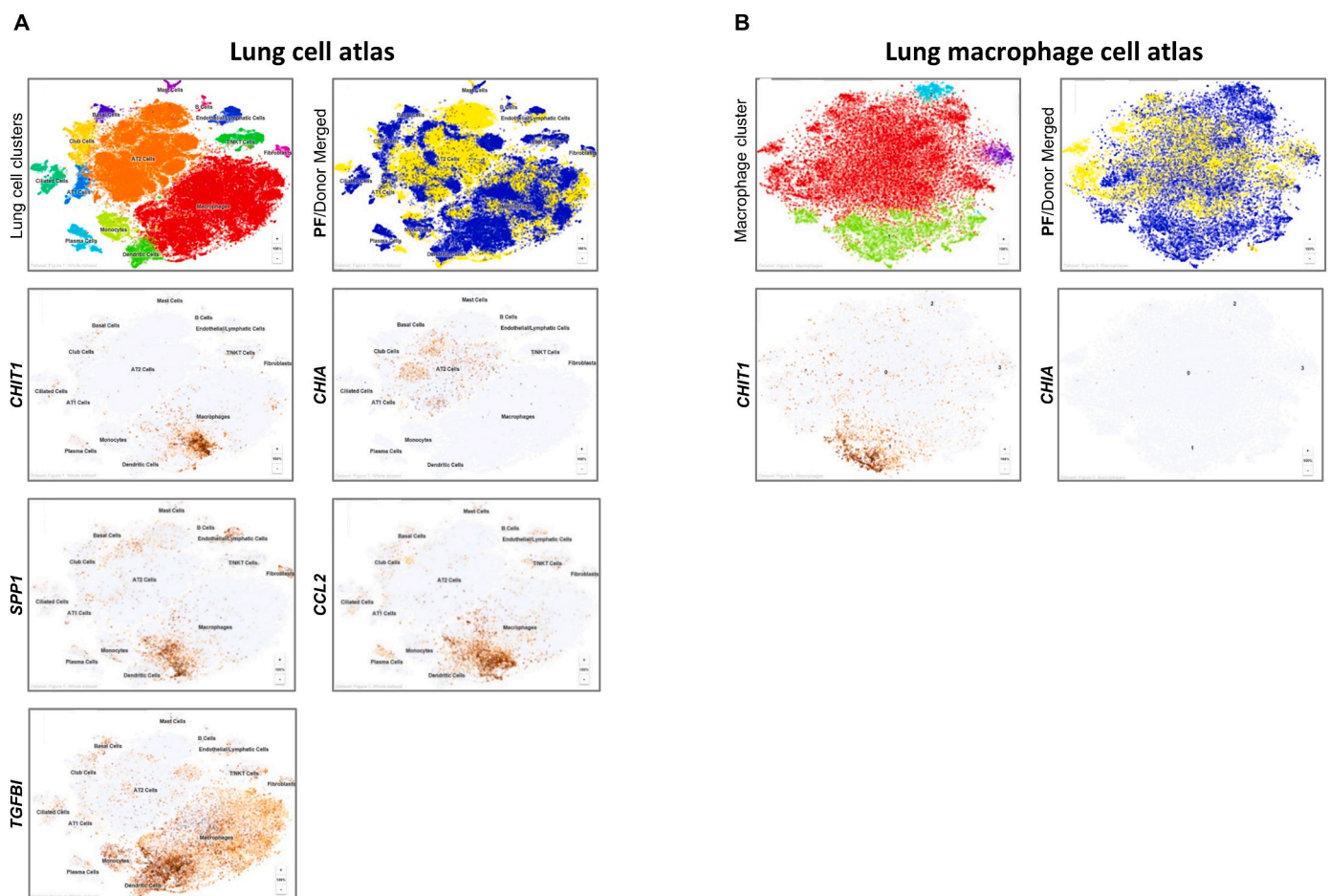
To better understand macrophage expression profile of CHIT1 in fibrotic lungs, we interrogated a cell atlas of pulmonary fibrosis created by a single-cell RNA sequencing (scRNAseq) of fibrotic lungs from patients with ILDs and from healthy lungs (Reyffman et al., 2019). Our analysis revealed a strong expression of *CHIT1* in lungs of ILD patients, which was restricted to a subset of the macrophage cluster specific for fibrotic lungs and not present in the healthy tissue (Fig. 2AB). To further characterize this subset of macrophages, we analyzed expression of multiple profibrotic factors. While *TGFBI* was expressed in most macrophages, expression of *SPP1* and *CCL2* expression was most prominent in the sub-cluster of macrophages expressing *CHIT1* (Fig. 2). The strong

association of *CHIT1* expression and activity with IPF suggests that it might play a pathological role in lung fibrosis. In contrast, we found that *CHIA* was moderately expressed in lungs, mostly in epithelial cells (Fig. 2A) and not in any type of macrophages (Fig. 2B), and with no correlation to fibrosis, further underscoring the disease-specific association of CHIT1 and pathologically activated macrophages. Together, our results indicate that macrophages are the primary source of CHIT1, which is the dominant chitinase induced in fibrotic lungs.

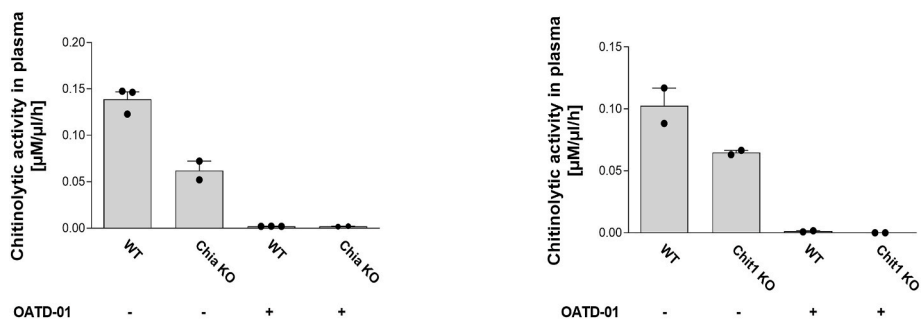
### 3.2. Bleomycin-induced model of lung fibrosis recapitulates CHIT1 induction in IPF

To evaluate contributions of chitinases to the development of pulmonary fibrosis in mice, we analyzed expression of CHIT1 and AMCase in the bleomycin-induced model, which recapitulates some features of IPF and is commonly used in preclinical studies (Mouratis and Aidinis, 2011). Firstly, we assessed activity of individual chitinases, AMCase and CHIT, in non-diseased mice. Study on knockout animals showed that in C57BL/6 mice about 60% of the chitinolytic activity in plasma was derived from AMCase and about 40% from CHIT1 confirming that in mice both chitinases are active (Fig. 3).

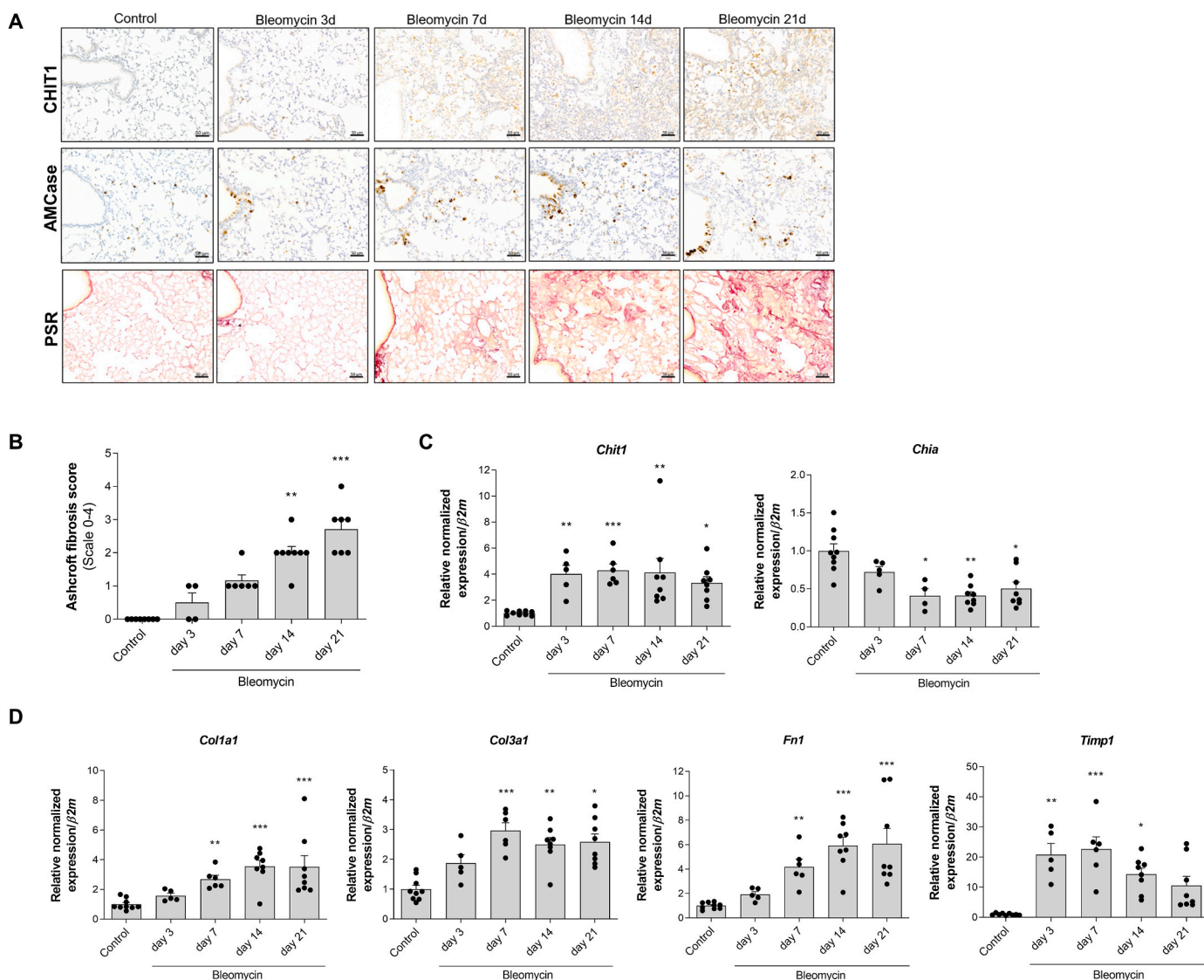
Immunohistochemical analysis of the fibrotic lung tissues demonstrated that CHIT1 was localized predominantly to macrophages present in fibrotic areas, with a strong induction observed from day 7 that



**Fig. 2.** CHIT1 is expressed exclusively in a subset of emerging fibrosis-specific macrophages the lungs of IPF patients. ScRNAseq lung atlas was used to analyze chitinases expression profile within all cellular populations identified in healthy and fibrotic lungs (A) and within a population of alveolar macrophages emerging during pulmonary fibrosis (B). (A) All major cell types identified in lungs are indicated. Cell populations derived from healthy donors (yellow) and fibrotic lungs (blue) are shown. ScRNAseq analysis of expression of *CHIT1* and *CHIA* in lungs and of expression of profibrotic markers *SPP1*, *CCL2* and *TGFBI*. AT1 and AT2; alveolar type 1 and type 2 cells; T/NKT: T and natural killer T cells. (B) Analysis of macrophages in lungs identifies 4 major clusters. Macrophages derived from healthy donors (yellow) and fibrotic lungs (blue) are shown. Expression of *CHIT1* and *CHIA* in pulmonary macrophages. Expression of *CHIT1* is restricted to a fibrosis-specific cluster of macrophages.



**Fig. 3. Chitinolytic activity in mouse is derived from CHIT1 and AMCase.** Total chitinolytic activity was measured in plasma of *Chia*<sup>-/-</sup> mice and *Chit1*<sup>-/-</sup> mice, and their corresponding WT control animals (n = 2 or 3 per group). AMCase- and CHIT1-specific chitinolytic activity in plasma was suppressed by a chitinase inhibitor OATD-01 *ex vivo* at the concentration 1  $\mu\text{M}$ .



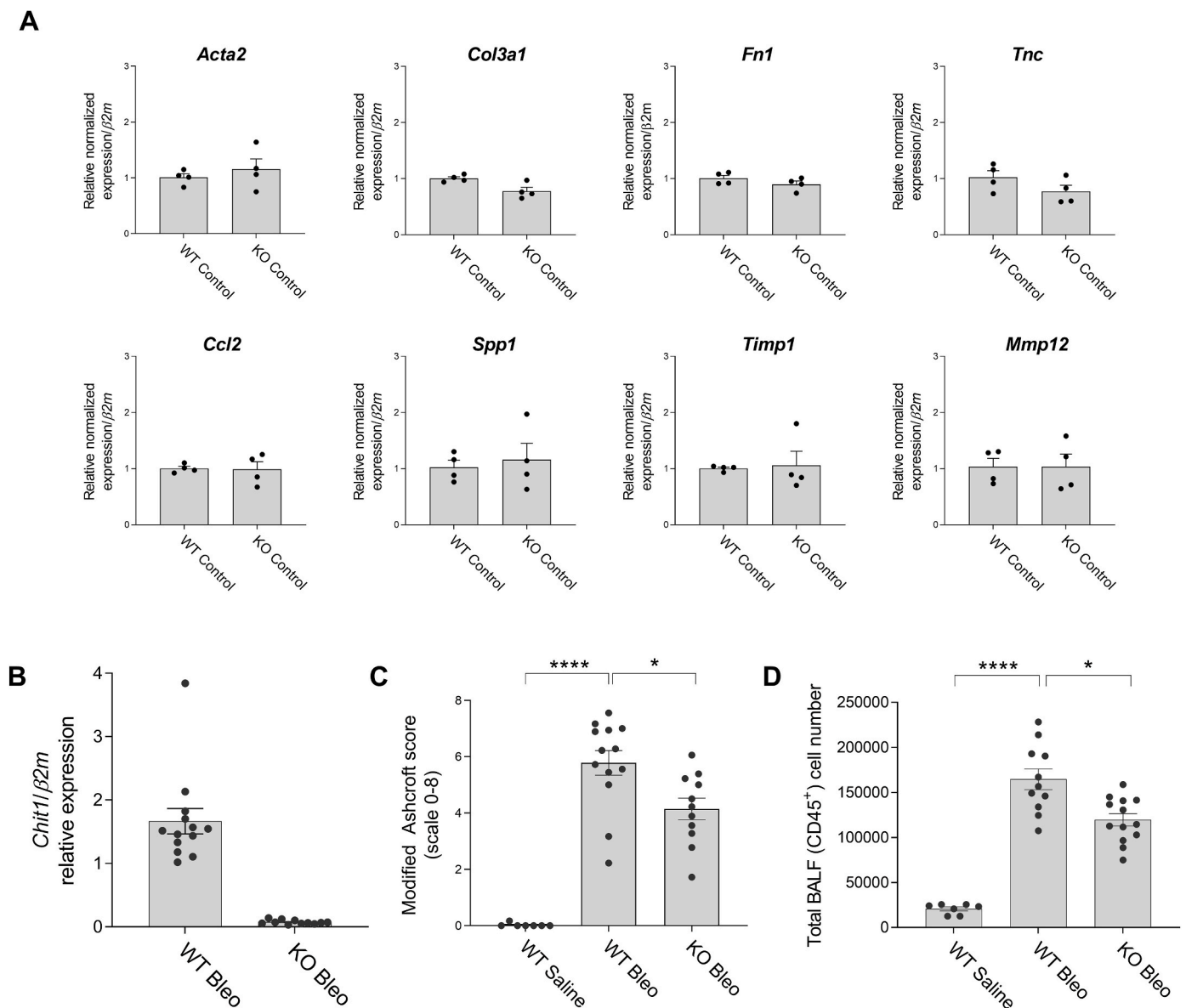
**Fig. 4. Induction and localization of CHIT1 and AMCase during bleomycin-induced lung fibrosis in mice.** The kinetics of expression of chitinases and markers of pulmonary fibrosis in the bleomycin-induced model of lung fibrosis was evaluated in lungs at day 3, 7, 14 and 21 post bleomycin administration (number of animals n = 8 per timepoint per group). (A) Representative images of immunohistochemical staining of CHIT1 and AMCase in sections from murine lungs (one section per animal, n = 5 per timepoint per group) during progression of bleomycin-induced pulmonary fibrosis as determined by a picosirius red staining (PSR) of fibrotic lesions. (B) Analysis of pulmonary fibrosis by Ashcroft scoring (C) Kinetics of mRNA expression of *Chit1* and *Chia* in lungs during fibrosis development (D) Kinetics of mRNA expression of profibrotic genes: *Col1a1*, *Col3a1*, *Fn1* and *Timp1* in lungs as compared to vehicle (saline) treated controls. Data presented as mean  $\pm$  s.e.m. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001.

correlated with the onset and duration of the fibrotic phase (Fig. 4A). AMCase expression was continuous throughout the study and was limited to bronchial epithelial cells (Fig. 4A). Downregulation of AMCase mRNA and robust upregulation of CHIT1 mRNA in the lungs of mice with bleomycin-induced pulmonary fibrosis was observed (Fig. 4C) recapitulating the gene expression data obtained from lungs of IPF patients (Fig. 1B). Moreover, upregulation of *Chit1* correlated with the expression of fibrosis-associated genes (Fig. 4D): *Col1a1*, *Col3a1*, *Fn1* and *Timp1*. Together, these results demonstrate that in the context of chitinase induction and macrophage-specific expression of CHIT1, the bleomycin-induced model recapitulates lung fibrosis in patients with fibrosing ILDs, indicating that it represents a rational approach to evaluate therapeutic efficacy of chitinase inhibitors.

### 3.3. Genetic inactivation of *Chit1* ameliorates pulmonary fibrosis in the bleomycin-induced model

The effects of genetic inactivation of CHIT1 on pulmonary fibrosis development were evaluated in the bleomycin-induced murine model. *Chit1*<sup>-/-</sup> mice did not show any overt phenotype, no visual lung pathologies and no effects on expression of pro-fibrotic markers in non-diseased lungs (Fig. 5A). The lack of *Chit1* expression in knockout animals instilled with bleomycin correlated with significant attenuation of the pulmonary fibrosis score in the model (Fig. 5BC). *Chit1*<sup>-/-</sup> mice also exhibited significantly reduced pulmonary inflammation as measured by the total number of CD45<sup>+</sup> leukocytes in BALF (Fig. 5D).

To gain more insight into molecular mechanisms of fibrosis driven by CHIT1, expression of a wide array of fibrosis markers in lungs was analyzed by qPCR. Expression of *Col1a1*, *Col3a1*, *Fn1*, *Tnc* and *Acta2*



**Fig. 5. Genetic CHIT1 inactivation reduces bleomycin-induced pulmonary fibrosis and inflammation.** The expression of markers of fibrosis in non-challenged WT and *Chit1*<sup>-/-</sup> mice (number of animals n = 4 per group). The pulmonary fibrosis and inflammation in WT and *Chit1*<sup>-/-</sup> mice in the bleomycin-induced model of lung fibrosis were evaluated at day 21 post bleomycin administration (number of animals: n = 7 in control group and n = 13 in bleomycin-challenged groups). (A) mRNA expression of selected fibrosis markers: *Col3a1*, *Fn1*, *Tnc*, *Timp1*, *Mmp12*, *Spp1* and *Ccl2* in normal lungs of WT and *Chit1*<sup>-/-</sup> mice. Expression was normalized to *B2m* gene expression. (B) *Chit1* expression in lungs of WT and *Chit1*<sup>-/-</sup> mice (C) Analysis of pulmonary fibrosis by the Ashcroft scoring in WT and *Chit1*<sup>-/-</sup> mice 21 days after bleomycin administration. (D) Analysis of CD45<sup>+</sup> leukocytes in BALF from WT and *Chit1*<sup>-/-</sup> mice 21 days after bleomycin administration. Gene expression was evaluated by qPCR. Data shows means  $\pm$  s.e.m. \*P < 0.05, \*\*\*\*P < 0.0001.



was consistently and significantly reduced in knockout compared to the wild-type animals (Fig. 6A). Additionally, expression of genes coding for fibrosis-associated proteins MMP12 and TIMP1 and profibrotic mediators CCL2 and SPP1 was strongly suppressed in *Chit1*<sup>-/-</sup> mice compared to wild-type (WT) animals (Fig. 6BC). Together, these data demonstrate that genetic ablation of CHIT1 attenuates development of fibrosis in the bleomycin-induced model, indicating a pathologic role of CHIT1.

### 3.4. OATD-01: a potent chitinase inhibitor

The results of translational and preclinical studies prompted us to develop a chitinase inhibitor to evaluate the therapeutic potential of inhibition of chitinolytic activity in murine models of pulmonary fibrosis. In this context, we developed OATD-01, a potent inhibitor of CHIT1 with a low nanomolar activity against human and murine chitinases (Fig. 7A). The chemical properties, pharmacokinetics in rodents and dogs and preclinical safety of OATD-01 were previously established by our group (Koralewski et al., 2020). Further evaluation of pharmacokinetic and pharmacodynamic properties demonstrated that PO administration of OATD-01 at 30 mg/kg b.i.d. fully suppressed the chitinolytic activity in fibrotic lungs (Fig. 7B).

Importantly, *in vivo* studies with human samples, OATD-01 fully inhibited the highly elevated chitinolytic activity in serum, BALF and induced sputum from patients with IPF with  $IC_{50} < 20$  nM (Fig. 7C), suggesting its therapeutic potential in humans. Moreover, OATD-01 also reduced the levels of IL-1 receptor antagonist, IL-15 and  $IFN\gamma$  - modulators of immune and inflammatory responses, secreted by BALF

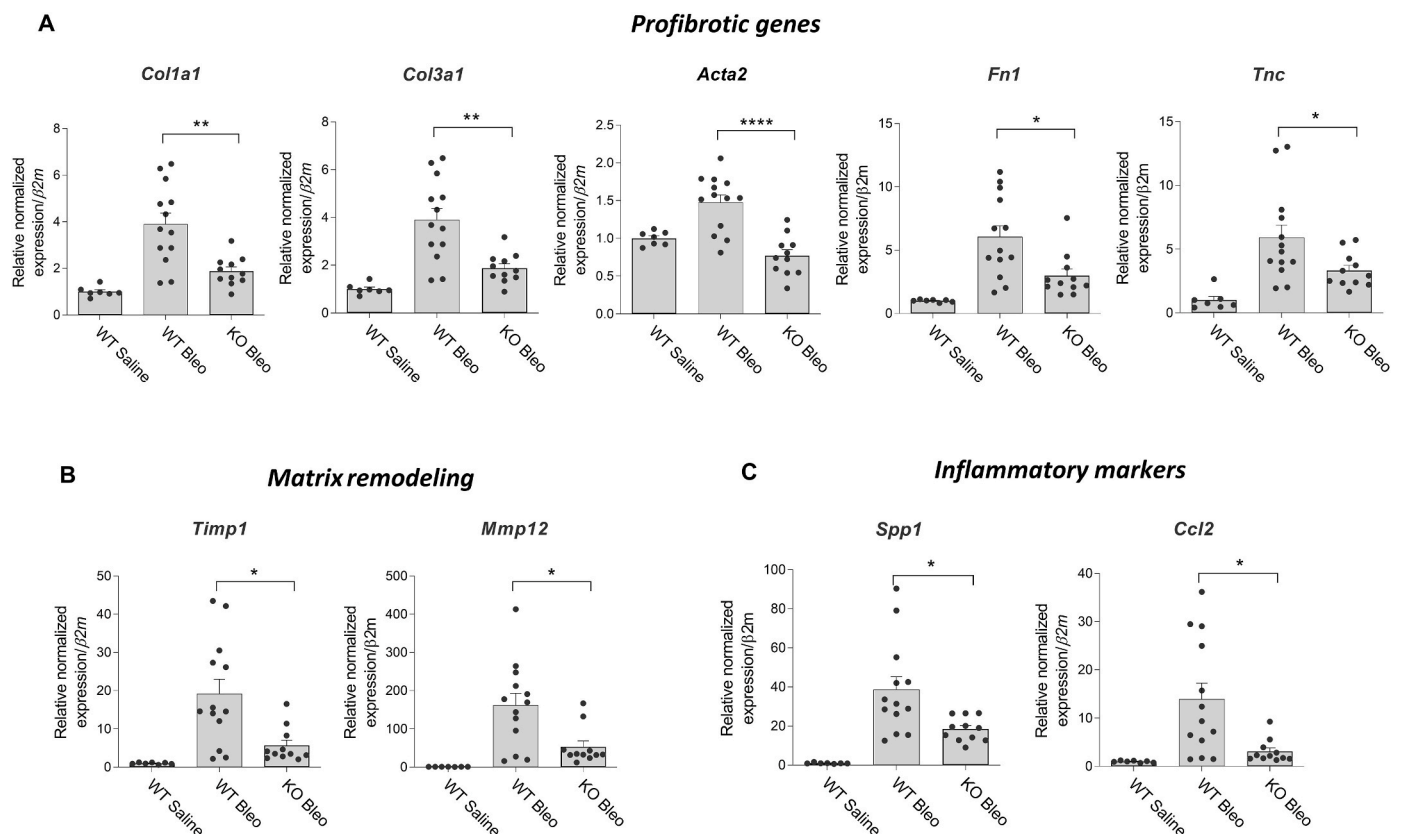
macrophages isolated from IPF patients (Fig. 7D). Thus, OATD-01 demonstrated a potent inhibition of chitinolytic activity in both, patient-derived samples and in murine lungs *in vivo* and showed direct effects on the expression of immune response modulators by IPF macrophages.

### 3.5. OATD-01 attenuated bleomycin-induced pulmonary fibrosis

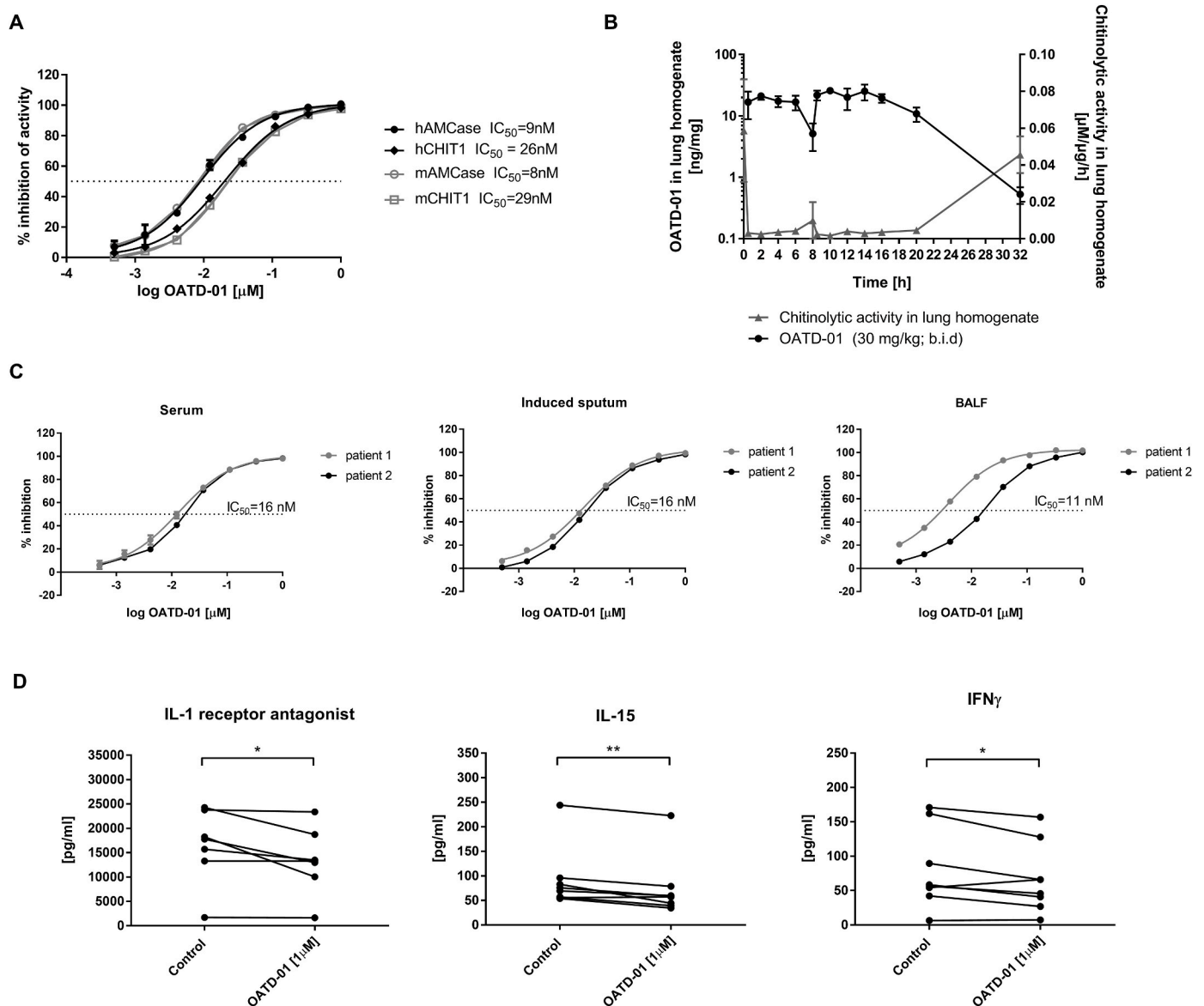
Having established that the bleomycin-induced model recapitulates disease-associated induction of chitinases, we evaluated the anti-fibrotic efficacy of OATD-01 in a head-to-head comparison with pirfenidone applying therapeutic treatment scheme. Histological analysis of lung slices using the Ashcroft scoring scheme (Hubner et al., 2008) confirmed a significant suppression of fibrosis by OATD-01 (30 mg/kg; PO; b.i.d.), with anti-fibrotic efficacy comparable to pirfenidone (250 mg/kg; PO; b.i.d.) (Fig. 8AB). Moreover, the soluble collagen concentration in lungs was reduced by OATD-01, comparably to pirfenidone (Fig. 8C). A decrease of the lung/body weight ratio, a measure of lung injury, further confirmed therapeutic efficacy of OATD-01 (Fig. 8D). The antifibrotic efficacy of the compound was associated with a full suppression of the chitinolytic activity in plasma (Fig. 8E), confirming OATD-01 target engagement. These data provide a pharmacological proof-of-concept for the profibrotic function of CHIT1 and demonstrate the therapeutic potential of OATD-01.

## 4. Discussion

Chitinases have been implicated in multiple ILDs (Chang et al., 2020;



**Fig. 6.** CHIT1 deficiency attenuates profibrotic gene signature in the lungs in the bleomycin-induced model of pulmonary fibrosis. The expression of markers of pulmonary fibrosis in WT and *Chit1*<sup>-/-</sup> mice in the bleomycin-induced model of lung fibrosis was evaluated in lungs 21 days post bleomycin administration (number of animals number of animals: n = 7 in control group and n = 13 in bleomycin-challenged groups). The expression was evaluated by qPCR and normalized to *B2m* gene expression. (A) Relative expression of fibrotic genes: *Col1a1*, *Col3a1*, *Acta2*, *Fn1* and *Tnc* (B) Relative expression of fibrosis-associated matrix remodeling genes: *Timp1* and *Mmp12*. (C) Relative expression of fibrosis-associated inflammatory genes: *Spp1* and *Ccl2*. Data shows means  $\pm$  s.e.m. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ .



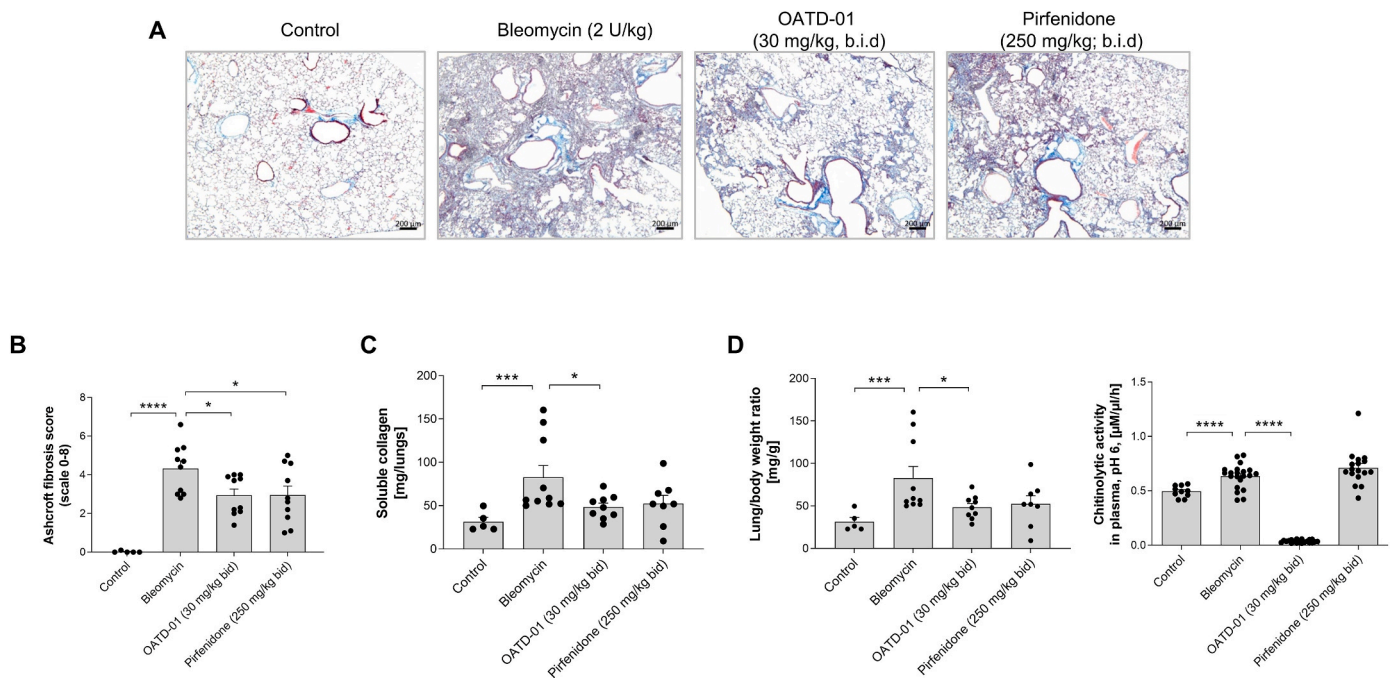
**Fig. 7.** OATD-01, a potent chitinase inhibitor, suppressed chitinolytic activity in fibrotic lungs in mice, and in serum, BALF and induced sputum from patients with IPF. (A) IC<sub>50</sub> determination of OATD-01 against human and mouse AMCCase and CHIT1 by the enzymatic assay (B) PK/PD profile of OATD-01 in fibrotic lungs from mice 21 days post bleomycin administration (3x intranasally, 1 U/kg). OATD-01 was administered on day 21 in two doses (30 mg/kg, PO, b.i.d.) at 0 h and 8 h. PK/PD was determined at indicated time points. (C) Inhibition of the chitinolytic activity in serum, BALF and induced sputum from patients with IPF (n = 2) by OATD-01 determined by the *ex vivo* enzymatic assay. (D) The levels of modulators of immune and inflammatory responses (IL-1 receptor antagonist, IL-15, IFN $\gamma$ ) in IPF macrophages supernatants (n = 7) following OATD-01 treatment (at 1  $\mu$ M concentration for 24 h). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01.

Cho et al., 2015; Przysucha et al., 2020), including IPF and might represent a novel therapeutic target. While series of contradictory data have been reported on expression and pathological role of AMCCase in pulmonary diseases (Fitz et al., 2012; Mackinnon et al., 2012; Mazur et al., 2018, 2019; Van Dyken et al., 2017; Vannella et al., 2016; Zhu et al., 2004), CHIT1 has been consistently described in the literature as the primary active chitinase in humans with profibrotic potential *in vitro* and *in vivo* (Bargagli et al., 2007; Lee et al., 2012, 2019; Reyfman et al., 2019). Therefore, to evaluate the role of CHIT1 in lung fibrosis, it was critical to establish expression and activity profiles for chitinases in lungs of IPF patients and further to assess the therapeutic potential of CHIT1 inactivation applying mouse model of lung fibrosis.

In the current study we report a comprehensive analysis of both chitinases in patients with IPF. We demonstrated a significantly elevated serum chitinolytic activity in > 90% patients with IPF suggesting that it represents a common and early event in IPF pathology. In accordance,

CHIT1 concentration in serum correlated with total chitinolytic activity. The major limitation of the obtained data is the lack of age-matching of the IPF and healthy individual groups. Importantly, the conclusion concerning CHIT1 expression in IPF was further corroborated by the immunocytochemical analysis, which demonstrated a robust, mostly macrophage-derived expression of CHIT1 in lungs and BALF cells from IPF patients. In contrast, we were not able to obtain any evidence of AMCCase expression in these studies. Our results are in accordance with several reports, which indicated that CHIT1 is the main source of the elevated chitinolytic activity (Bargagli et al., 2007; Chang et al., 2020; Seibold et al., 2008). In accordance with these results, the analysis of a single cell lung atlas (Reyfman et al., 2019) generated by scRNAseq of fibrotic and healthy lungs revealed a strong induction of *CHIT1* in the lungs of patients with pulmonary fibrosis, which was restricted to a macrophage cluster specific to fibrotic lungs and not present in healthy lungs. In contrast, *CHIA* showed modest expression in the epithelial cell





**Fig. 8.** Chitinase inhibitor OATD-01 attenuates fibrosis in bleomycin-induced lung fibrosis model with anti-fibrotic efficacy comparable to pirfenidone.

Head-to-head comparison of anti-fibrotic activity of OATD-01 (30 mg/kg, b.i.d.) vs. pirfenidone (250 mg/kg, b.i.d.) in the bleomycin-induced model of pulmonary fibrosis in mice ( $n = 10$  in control group and  $n = 20$  in bleomycin-challenged groups; each group was randomly divided into two at day 21 for analysis of lung fibrosis by Ashcroft scoring ( $n = 11$ ) and analysis of collagen levels in the lungs ( $n = 10$ ). Both compounds were administered by oral gavage from day 7 until day 21. (A) Representative images of lung fibrosis detected by the trichrome staining in control animals, and mice administered bleomycin alone, and after treatment with OATD-01 and pirfenidone. (B) Analysis of pulmonary fibrosis by the modified Ashcroft scoring system in the lung sections ( $n = 3$  per animal) in animals after OATD-01 and pirfenidone as compared to the vehicle treated controls. (C) Soluble collagen levels (Sircol assay) in lungs at day 21 post bleomycin administration (D) Lung weight to body weight ratio analysis at day 21 post bleomycin administration (E) Chitinolytic activity in plasma after OATD-01 and pirfenidone treatments as compared to the vehicle treated controls. Data are representative for three independent experiments. Data presented as mean  $\pm$  s.e.m. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

cluster with no correlation to fibrosis. In summary, the published reports and our own comprehensive studies demonstrate that CHIT1 is the predominant chitinase in patients with pulmonary fibrosis, of which expression is limited to disease-associated macrophages and strongly correlates with pulmonary fibrosis. Together, these data suggest that CHIT1 might be a novel therapeutic target for IPF.

To confirm this notion, we evaluated the expression profile of chitinases in the bleomycin-induced model of pulmonary fibrosis, which is the most commonly used murine model with an established translational value. While induction of CHIT1 in the model has been reported (Lee et al., 2012), our study provides a detailed analysis of kinetics and localization of CHIT1 and AMCase expression following bleomycin instillation. We confirmed macrophage specific CHIT1 induction in bleomycin-injured lungs. In addition, we observed that early on in development of fibrosis, *Chia* expression is downregulated while *Chit1* expression correlates with fibrotic markers, indicating and further confirming that CHIT1 represents a rational approach to evaluate therapeutic efficacy of chitinase inhibitors.

To better understand the pathological role of CHIT1, which is the dominant chitinase in human IPF, the effects of a genetic inactivation of CHIT1 on fibrosis development were evaluated in the bleomycin-induced model. In the model, knock-out of *Chit1* strongly attenuated pulmonary fibrosis and inflammation. This conclusion was further supported by the observation that CHIT1 deficiency strongly suppressed bleomycin-mediated induction of a wide array of fibrosis-associated genes, as well as inflammatory mediators *Ccl2* (Kolahian et al., 2016) and *Spp1* (Lenga et al., 2008; Morse et al., 2019) with a documented profibrotic activity in pulmonary fibrosis. Our results expand the published data demonstrating a profibrotic activity of CHIT1 (Lee et al., 2012), and provide a detailed analysis of the fibrosis-attenuating phenotype of *Chit1*<sup>-/-</sup> mice.

Having established the fibrogenic activity of CHIT1, we developed OATD-01, a highly potent and selective chitinase inhibitor, and confirmed its ability to suppress the chitinolytic activity in fibrotic lungs of mice after oral administration. OATD-01 resulted in attenuation of fibrosis induced by bleomycin, with anti-fibrotic efficacy comparable to pirfenidone that did not alter chitinolytic activity, indicating a novel mechanism of action of CHIT1 inhibitor. IPF is a heterogenous, multifactorial disease and our data indicate that CHIT1 may be one of several drivers of pulmonary fibrosis.

Our study has demonstrated that CHIT1 is a primary chitinase in human lung and AMCase does not play a role in IPF. While in the lungs of human IPF subjects AMCase activity and expression was not detected, in a mouse bleomycin-induced pulmonary fibrosis model AMCase expression was present, but decreased after fibrosis induction. OATD-01 is a dual AMCase/CHIT1 inhibitor with pharmacodynamic effect on both chitinases, therefore we cannot rule out the role of AMCase in the bleomycin-induced lung injury model. However, studies with genetic inactivation of CHIT1 demonstrated a similar phenotype and comparable level of the antifibrotic effect to the pharmacological inhibition of this enzyme. Taken together we conclude that inhibition of CHIT1 has antifibrotic effects in murine fibrosis model and an increased CHIT1 activity may be one of the drives of fibrosis in IPF.

Since CHIT1 is predominantly expressed in pulmonary macrophages, both in patients with pulmonary fibrosis and in murine models of IPF, it is relevant to consider its expression in the broader context of the role of macrophages in development of lung fibrosis. Although there is ample evidence implicating inflammation in the pathogenesis of lung fibrosis (Heukels et al., 2019; Wynn, 2011), the role of excessive inflammation as an important driver of IPF pathology remains controversial, mostly based on the failed clinical trials of anti-inflammatory drugs like steroids in IPF patients. However, since then the role of macrophages in the

pathogenesis of pulmonary fibrosis has been redefined (Byrne et al., 2016; Wynn and Vannella, 2016). New data revealed a remarkable plasticity of macrophages, which can acquire a wide spectrum of distinct phenotypes with different effects on fibroproliferative responses to the injury (Wynn and Vannella et al., 2016). Lineage tracing and scRNAseq facilitated identification of several specific subsets of macrophages with a profibrotic phenotype in murine models of pulmonary fibrosis (Aran et al., 2019; McCubbrey et al., 2018; Misharin et al., 2017; pJoshi et al., 2020; Satoh et al., 2017; Ucerro et al., 2019). These macrophages expressed multiple factors associated with fibrosis, like TGFβ1, CCL2 and MMPs. While various approaches were used, subtype-specific deletions and adaptive transfers of fibrotic macrophages confirmed their ability to drive pulmonary fibrosis. This concept has been further supported by scRNAseq studies, which confirmed existence of distinct populations of macrophages associated with pulmonary fibrosis in ILD patients (Morse et al., 2019; Reyfman et al., 2019). In this context, our retrospective analysis demonstrating that CHIT1 is highly and exclusively expressed by a distinct subset of macrophages specific to fibrotic lungs and co-expressing fibrotic factors like TGFβ1, SPP1 and CCL2, directly links CHIT1 to pulmonary fibrosis. CHIT1 was one of the most abundantly expressed genes in this macrophage cluster and part of the subtype-defining genetic signature. Decreased expression of Spp1, Ccl2 and other profibrotic factors induced by bleomycin in *Chit1*<sup>-/-</sup> mice suggests that CHIT1 might promote acquisition and/or maintenance of the profibrotic phenotype by macrophages.

It is noteworthy that in the preclinical models, pirfenidone and nintedanib demonstrated anti-fibrotic and anti-inflammatory activity similar to CHIT1 inhibition, including reduction of collagen deposition, decreased infiltration of inflammatory cells to the lungs, inhibition of expression of metalloproteases and TIMPs, as well as CCL2 and other proinflammatory cytokines and chemokines (Kolb et al., 2017; Wollin et al., 2015). In particular, nintedanib has been shown to exert anti-inflammatory properties via modulation of the activation state and the function of macrophages (Bellamri et al., 2019). Both approved drugs were reported to inhibit TGFβ-mediated proliferation of lung fibroblasts, their differentiation to myofibroblasts and collagen synthesis (Conte et al., 2014; Wollin et al., 2015). In this context, several studies demonstrated that CHIT1 enhanced TGFβ1-induced fibrosis by various mechanisms, including stimulation of fibroblast proliferation, myofibroblast transformation (Lee et al., 2019), and TGFβ1 signaling by increasing expression of its receptors (Lee et al., 2012) and by suppressing induction of TGFβ feedback inhibitor SMAD7 through interaction with TGFBRAP1 and FOXO3 (Lee et al., 2019). Increased CHIT1 levels correlated inversely with SMAD7 expression in patients with IPF. Thus, inhibition of CHIT1 by OATD-01 might lead to the antifibrotic responses, which overlap with those induced by pirfenidone and nintedanib, further indicating a clinical potential of CHIT1 inhibition.

Together, this report demonstrates a strong clinical association of CHIT1 with pulmonary fibrosis and provides a preclinical proof-of-concept for its fibrogenic activity. Results of the pharmacological inhibition and genetic inactivation in animal models combined with translational data clearly establish CHIT1 as a promising novel therapeutic target for IPF. This provides a robust rationale for developing OATD-01, a potent chitinase inhibitor as a novel therapy for IPF.

#### Sources of funding

Studies were supported by two projects: (1) "Development of a first-in-class small molecule drug candidate for treatment of idiopathic pulmonary fibrosis through chitotriosidase inhibition" (POIR.01.01.01-00-0551/15), acronym IPF and (2) "Preclinical research and clinical trials of a first-in class development candidate in therapy of asthma and inflammatory bowel disease" (POIR.01.01.01-00-0168/15), acronym IBD – both co-funded by the National Center for Research and Development, Poland in the framework of European Funds Smart Growth. BAD was supported by the Ministry of Science and Higher Education, Poland

(50//DW/2017/01/1).

#### Declaration of competing interests

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: At the time of the study PS, BAD, MM, AMS, RoK, MiM, SK, NCG, AZ, AR, RMK, AG, KD, and PD were employees and shareholders of OncoArendi Therapeutics SA, which develops inhibitors of CHIT1. AG, MM and RoK are co-inventors on the patent application related to this work (US Patent No. US 9,944,624 B<sup>2</sup> Substituted amino triazoles useful as human chitinase inhibitors). JG is a shareholder and consultant for OncoArendi Therapeutics. JvdT received research funding from OncoArendi Therapeutics, BMS and Roche, and consulting fees from MSD, Boehringer, and Roche. RKr received fees for lectures and/or travel expenses from Boehringer Ingelheim, AstraZeneca, Roche, Chiesi and Polpharma. KG received fees for lectures and travel expenses from Boehringer Ingelheim and Roche. PN-G, MP, MP-G, ŁC declare no conflicts of interests.

#### CRediT authorship contribution statement

**Piotr Sklepkiewicz:** Investigation, Formal analysis, Methodology, Writing – original draft. **Barbara A. Dymek:** Investigation, Formal analysis, Methodology, Writing – original draft. **Michał Mlcki:** Investigation, Formal analysis. **Robert Koralewski:** Resources. **Marzena Mazur:** Resources. **Patrycja Nejman-Gryz:** Investigation, Resources. **Serdar Korur:** Investigation, Formal analysis. **Agnieszka Zagodzón:** Investigation. **Aleksandra Rymaszczyńska:** Investigation. **Jan H. von der Thüsen:** Investigation, Resources. **Anna M. Siwińska:** Investigation. **Nazan Cemre Güner:** Investigation. **Łukasz Cheda:** Investigation. **Magdalena Paplinska-Goryca:** Investigation, Resources. **Małgorzata Proboszcz:** Investigation, Resources. **Thierry P.P. van den Bosch:** Investigation, Resources. **Katarzyna Górka:** Resources. **Jakub Golab:** Conceptualization. **Rafał M. Kamiński:** Conceptualization, Writing – review & editing. **Rafał Krenke:** Resources, Supervision, Writing – review & editing. **Adam Golebiowski:** Supervision. **Karolina Dzwonek:** Conceptualization, Supervision. **Paweł Dobrzanski:** Conceptualization, Supervision, Writing – original draft.

#### References

- Agapov, E., Battaile, J.T., Tidwell, R., Hachem, R., Patterson, G.A., Pierce, R.A., Atkinson, J.J., Holtzman, M.J., 2009. Macrophage chitinase 1 stratifies chronic obstructive lung disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 41, 379–384. <https://doi.org/10.1165/2009-0122RC>.
- Aran, D., Looney, A.P., Liu, L., Wu, E., Fong, V., Hsu, A., Chak, S., Naikawadi, R.P., Wolters, P.J., Abate, A.R., Butte, A.J., Bhattacharya, M., 2019. Reference-based analysis of lung single-cell sequencing reveals a transitional profibrotic macrophage. *Nat. Immunol.* 20, 163–172. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0276-y>.
- Bargagli, E., Margollicci, M., Luddi, A., Nikiforakis, N., Perari, M.G., Grosso, S., Perrone, A., Rottoli, P., 2007. Chitotriosidase activity in patients with interstitial lung diseases. *Respir. Med.* 101, 2176–2181. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2007.05.008>.
- Bellamri, N., Morzadec, C., Joannes, A., Lecureur, V., Wollin, L., Jouneau, S., Vernhet, L., 2019. Alteration of human macrophage phenotypes by the anti-fibrotic drug nintedanib. *Int. Immunopharmacol.* 72, 112–123. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.03.061>.
- Bennett, D., Cameli, P., Lanzarone, N., Carobene, L., Bianchi, N., Fui, A., Rizzi, L., Bergantini, L., Cillis, G., d'Alessandro, M., Mazzei, M.A., Refini, R.M., Sestini, P., Bargagli, E., Rottoli, P., 2020. Chitotriosidase: a biomarker of activity and severity in patients with sarcoidosis. *Respir. Res.* 21, 6. <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1263-z>.
- Byrne, A.J., Maher, T.M., Lloyd, C.M., 2016. Pulmonary macrophages: a new therapeutic pathway in fibrosing lung disease? *Trends Mol. Med.* 22, 303–316. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.02.004>.
- Chang, Sharma, L., Dela Cruz, C.S., 2020. Chitotriosidase: a marker and modulator of lung disease. *Eur. Respir. Rev. : Off. J. Eur. Respir. Soc.* 29 <https://doi.org/10.1183/16000617.0143-2019>.
- Cho, S.J., Weiden, M.D., Lee, C.G., 2015. Chitotriosidase in the pathogenesis of inflammation, interstitial lung diseases and COPD. *Allergy, Asthma Immunol. Res.* 7, 14–21. <https://doi.org/10.4168/aaair.2015.7.1.14>.
- Conte, E., Gili, E., Fagone, E., Fruciano, M., Iemmolo, M., Vancheri, C., 2014. Effect of pirfenidone on proliferation, TGF-beta-induced myofibroblast differentiation and







- fibrogenic activity of primary human lung fibroblasts. *Eur. J. Pharmaceut. Sci. : Off. J. Eur. Federation Pharmaceut. Sci.* 58, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.02.014>.
- Di Rosa, M., Distefano, G., Zorena, K., Malaguarnera, L., 2016. Chitinases and immunity: ancestral molecules with new functions. *Immunobiology* 221, 399–411. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2015.11.014>.
- Fitz, L.J., DeClercq, C., Brooks, J., Kuang, W., Bates, B., Demers, D., Winkler, A., Nocka, K., Jiao, A., Greco, R.M., Mason, L.E., Fleming, M., Quazi, A., Wright, J., Goldman, S., Hubeau, C., Williams, C.M., 2012. Acidic mammalian chitinase is not a critical target for allergic airway disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 46, 71–79. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2011-0095OC>.
- Heukels, P., Moor, C.C., von der Thusen, J.H., Wijzenbeek, M.S., Kool, M., 2019. Inflammation and immunity in IPF pathogenesis and treatment. *Respir. Med.* 147, 79–91. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2018.12.015>.
- Hubner, R.H., Gitter, W., El Mokhtari, N.E., Mathiak, M., Both, M., Bolte, H., Freitag-Wolf, S., Bewig, B., 2008. Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples. *Biotechniques* 44, 507–511. <https://doi.org/10.2144/000112729>, 514–507.
- James, A.J., Reinius, L.E., Verhoek, M., Gomes, A., Kupczyk, M., Hammar, U., Ono, J., Ohta, S., Izuhara, K., Bel, E., Kere, J., Soderhall, C., Dahlen, B., Boot, R.G., Dahlen, S. E., Consortium, B., 2016. Increased YKL-40 and chitotriosidase in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 193, 131–142. <https://doi.org/10.1164/rccm.201504-0760OC>.
- Kolahian, S., Fernandez, I.E., Eickelberg, O., Hartl, D., 2016. Immune mechanisms in pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 55, 309–322. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2016-0121TR>.
- Kolb, M., Bonella, F., Wollin, L., 2017. Therapeutic targets in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir. Med.* 131, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2017.07.062>.
- Koralowski, R., Dymek, B., Mazur, M., Sklepkiwicz, P., Olejniczak, S., Czestkowski, W., Matyszewski, K., Andryianau, G., Niedziejko, P., Kowalski, M., Gruba, M., Borek, B., Jedrzejczak, K., Bartoszewicz, A., Pluta, E., Rymaszewska, A., Kania, M., Rejczak, T., Piasecka, S., Mlacki, M., Mazurkiewicz, M., Piotrowicz, M., Salamon, M., Zagodzina, A., Napiorkowska-Gromadzka, A., Bartlomiejczak, A., Mozga, W., Dobrzanski, P., Dzwonek, K., Golab, J., Nowotny, M., Olczak, J., Golebiowski, A., 2020. Discovery of OATD-01, a first-in-class chitinase inhibitor as potential new therapeutics for idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Med. Chem.* <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01179>.
- Lee, C.G., Da Silva, C.A., Dela Cruz, C.S., Ahangari, F., Ma, B., Kang, M.J., He, C.H., Takyar, S., Elias, J.A., 2011. Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury. *Annu. Rev. Physiol.* 73, 479–501. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142250>.
- Lee, C.G., Herzog, E.L., Ahangari, F., Zhou, Y., Gulati, M., Lee, C.M., Peng, X., Feghali-Bostwick, C., Jimenez, S.A., Varga, J., Elias, J.A., 2012. Chitinase 1 is a biomarker for and therapeutic target in scleroderma-associated interstitial lung disease that augments TGF-beta1 signaling. *J. Immunol.* 189, 2635–2644. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201115>.
- Lee, C.M., He, C.H., Park, J.W., Lee, J.H., Kamle, S., Ma, B., Akosman, B., Cotez, R., Chen, E., Zhou, Y., Herzog, E.L., Ryu, C., Peng, X., Rosas, I.O., Poli, S., Bostwick, C.F., Choi, A.M., Elias, J.A., Lee, C.G., 2019. Chitinase 1 regulates pulmonary fibrosis by modulating TGF-beta/SMAD7 pathway via TGFBRAP1 and FOXO3. *Life Sci. Alliance* 2. <https://doi.org/10.26508/lsa.201900350>.
- Lenga, Y., Koh, A., Perera, A.S., McCulloch, C.A., Sodek, J., Zohar, R., 2008. Osteopontin expression is required for myofibroblast differentiation. *Circ. Res.* 102, 319–327. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.160408>.
- Logue, E.C., Neff, C.P., Mack, D.G., Martin, A.K., Fiorillo, S., Lavelle, J., Vandivier, R.W., Campbell, T.B., Palmer, B.E., Fontenot, A.P., 2019. Upregulation of chitinase 1 in alveolar macrophages of HIV-infected smokers. *J. Immunol.* 202, 1363–1372. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801105>.
- Mackinnon, A.C., Gibbons, M.A., Farnworth, S.L., Leffler, H., Nilsson, U.J., Delaine, T., Simpson, A.J., Forbes, S.J., Hirani, N., Gaudie, J., Sethi, T., 2012. Regulation of transforming growth factor-beta1-driven lung fibrosis by galectin-3. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 185, 537–546. <https://doi.org/10.1164/rccm.201106-0965OC>.
- Mazur, M., Dymek, B., Koralowski, R., Sklepkiwicz, P., Olejniczak, S., Mazurkiewicz, M., Piotrowicz, M., Salamon, M., Jedrzejczak, K., Zagodzina, A., Czestkowski, W., Matyszewski, K., Borek, B., Bartoszewicz, A., Pluta, E., Rymaszewska, A., Mozga, W., Stefaniak, F., Dobrzanski, P., Dzwonek, K., Golab, J., Golebiowski, A., Olczak, J., 2019. Development of dual chitinase inhibitors as potential new treatment for respiratory system diseases. *J. Med. Chem.* 62, 7126–7145. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00681>.
- Mazur, M., Olczak, J., Olejniczak, S., Koralowski, R., Czestkowski, W., Jedrzejczak, A., Golab, J., Dzwonek, K., Dymek, B., Sklepkiwicz, P.L., Zagodzina, A., Noonan, T., Mahboubi, K., Conway, B., Sheeler, R., Beckett, P., Hungerford, W.M., Podjany, A., Mitschler, A., Cousido-Siah, A., Fadel, F., Golebiowski, A., 2018. Targeting acidic mammalian chitinase is effective in animal model of asthma. *J. Med. Chem.* 61, 695–710. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01051>.
- McCubrey, A.L., Barthel, L., Mohning, M.P., Redente, E.F., Mould, K.J., Thomas, S.M., Leach, S.M., Danhorn, T., Gibbings, S.L., Jakubick, C.V., Henson, P.M., Janssen, W. J., 2018. Deletion of c-FLIP from CD11b(hi) macrophages prevents development of bleomycin-induced lung fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 58, 66–78. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0154OC>.
- Misharin, A.V., Morales-Nebreda, L., Reyfman, P.A., Cuda, C.M., Walter, J.M., McQuattie-Pimentel, A.C., Chen, C.I., Anekalla, K.R., Joshi, N., Williams, K.J.N., Abdala-Valencia, H., Yacoub, T.J., Chi, M., Chiu, S., Gonzalez-Gonzalez, F.J., Gates, K., Lam, A.P., Nicholson, T.T., Homan, P.J., Soberanes, S., Dominguez, S., Morgan, V.K., Saber, R., Shaffer, A., Hinchcliff, M., Marshall, S.A., Bharat, A., Berdnikovs, S., Bhorade, S.M., Bartom, E.T., Morimoto, R.I., Balch, W.E., Sznajder, J. I., Chandel, N.S., Mutlu, G.M., Jain, M., Gottardi, C.J., Singer, B.D., Ridge, K.M., Bagheri, N., Shilatifard, A., Budinger, G.R.S., Perlman, H., 2017. Monocyte-derived alveolar macrophages drive lung fibrosis and persist in the lung over the life span. *J. Exp. Med.* 214, 2387–2404. <https://doi.org/10.1084/jem.201612152>.
- Mora, A.L., Rojas, M., Pardo, A., Selman, M., 2017. Emerging therapies for idiopathic pulmonary fibrosis, a progressive age-related disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 810. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.225>.
- Morse, C., Tabib, T., Sembrat, J., Buschur, K.L., Bittar, H.T., Valenzi, E., Jiang, Y., Kass, D.J., Gibson, K., Chen, W., Mora, A., Benos, P.V., Rojas, M., Lafyatis, R., 2019. Proliferating SPPI/MERTK-expressing macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.* 54. <https://doi.org/10.1183/13993003.02441-2018>.
- Mouratis, M.A., Aidinis, V., 2011. Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 17, 355–361. <https://doi.org/10.1097/MCP.0b013e328349ac2b>.
- Papilinska-Goryca, M., Nejman-Gryz, P., Proboszcz, M., Kwiciecien, I., Hermanowicz-Salamon, J., Grabczak, E.M., Krenke, R., 2020. Expression of TSLP and IL-33 receptors on sputum macrophages of asthma patients and healthy subjects. *J. Asthma : Off. J. Assoc. Care Asthma* 57, 1–10. <https://doi.org/10.1080/02770903.2018.1543435>.
- pJoshi, N., Watanabe, S., Verma, R., Jablonski, R.P., Chen, C.I., Chereshe, P., Markov, N. S., Reyfman, P.A., McQuattie-Pimentel, A.C., Sichizya, L., Lu, Z., Piseaux-Aillon, R., Kirchenbuechler, D., Flozak, A.S., Gottardi, C.J., Cuda, C.M., Perlman, H., Jain, M., Kamp, D.W., Budinger, G.R.S., Misharin, A.V., 2020. A spatially restricted fibrotic niche in pulmonary fibrosis is sustained by M-CSF/M-CSFR signalling in monocyte-derived alveolar macrophages. *Eur. Respir. J.* 55. <https://doi.org/10.1183/13993003.00646-2019>.
- Popevic, S., Sumarac, Z., Jovanovic, D., Babic, D., Stjepanovic, M., Jovicic, S., Sobic-Saranovic, D., Filipovic, S., Gvozdenovic, B., Omcikic, M., Milovanovic, A., Videnovic-Ivanov, J., Radovic, A., Zucig, V., Mihailovic-Vucinic, V., 2016. Verifying sarcoidosis activity: chitotriosidase versus ACE in sarcoidosis - a case-control study. *J. Med. Biochem.* 35, 390–400. <https://doi.org/10.1515/jomb-2016-0017>.
- Proboszcz, M., Papilinska-Goryca, M., Nejman-Gryz, P., Gorycka, K., Krenke, R., 2017. A comparative study of sTREM-1, IL-6 and IL-13 concentration in bronchoalveolar lavage fluid in asthma and COPD: a preliminary study. *Adv. Clin. Exp. Med. : Off. Organ Wrocław Med. Univ.* 26, 231–236. <https://doi.org/10.17219/acem/64875>.
- Przysocka, N., Gorska, K., Krenke, R., 2020. Chitinases and chitinase-like proteins in obstructive lung diseases - current concepts and potential applications. *Int. J. Chronic Obstr. Pulm. Dis.* 15, 885–899. <https://doi.org/10.2147/COPD.S236640>.
- Reyfman, P.A., Walter, J.M., Joshi, N., Anekalla, K.R., McQuattie-Pimentel, A.C., Chiu, S., Fernandez, R., Akbarpour, M., Chen, C.I., Ren, Z., Verma, R., Abdala-Valencia, H., Nam, K., Chi, M., Han, S., Gonzalez-Gonzalez, F.J., Soberanes, S., Watanabe, S., Williams, K.J.N., Flozak, A.S., Nicholson, T.T., Morgan, V.K., Winter, D.R., Hinchcliff, M., Hrusch, C.L., Guzy, R.D., Bonham, C.A., Sperling, A.I., Bag, R., Hamanaka, R.B., Mutlu, G.M., Yeldandi, A.V., Marshall, S.A., Shilatifard, A., Amaral, L.A.N., Perlman, H., Sznajder, J.I., Argento, A.C., Gillespie, C.T., Dematte, J., Jain, M., Singer, B.D., Ridge, K.M., Lam, A.P., Bharat, A., Bhorade, S.M., Gottardi, C.J., Budinger, G.R.S., Misharin, A.V., 2019. Single-cell transcriptomic analysis of human lung provides insights into the pathobiology of pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 199, 1517–1536. <https://doi.org/10.1164/rccm.201712-2410OC>.
- Richeldi, L., Collard, H.R., Jones, M.G., 2017. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* 389, 1941–1952. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30866-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30866-8).
- Satoh, T., Nakagawa, K., Sugihara, F., Kuwahara, R., Ashihara, M., Yamane, F., Minowa, Y., Fukushima, K., Ebina, I., Yoshioka, Y., Kumanogoh, A., Akira, S., 2017. Identification of an atypical monocyte and committed progenitor involved in fibrosis. *Nature* 541, 96–101. <https://doi.org/10.1038/nature20611>.
- Seibold, M.A., Donnelly, S., Solon, M., Innes, A., Woodruff, P.G., Boot, R.G., Burchard, E. G., Fahy, J.V., 2008. Chitotriosidase is the primary active chitinase in the human lung and is modulated by genotype and smoking habit. *J. Allergy Clin. Immunol.* 122, 944–950 e143. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.08.023>.
- Somogyi, V., Chaudhuri, N., Torrisi, S.E., Kahn, N., Muller, V., Kreuter, M., 2019. The therapy of idiopathic pulmonary fibrosis: what is next? *Eur. Respir. Rev. : Off. J. Eur. Respir. Soc.* 28. <https://doi.org/10.1183/16000617.0021-2019>.
- Steinacker, P., Verde, F., Fang, L., Feneberg, E., Oeckl, P., Roeber, S., Anderl-Straub, S., Daneke, A., Diehl-Schmid, J., Fassbender, K., Fließbach, K., Foerstl, H., Giese, A., Jahn, H., Kassubek, J., Kornhuber, J., Landwehrmeyer, G.B., Lauer, M., Pinkhardt, E. H., Prudlo, J., Rosenbohm, A., Schneider, A., Schroeter, M.L., Tumani, H., von Arnim, C.A.F., Weishaupt, J., Weydt, P., Ludolph, A.C., Yilmazer Hanke, D., Otto, M., group, F.T.s., 2018. Chitotriosidase (CHIT1) is increased in microglia and macrophages in spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis and cerebrosplinal fluid levels correlate with disease severity and progression. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 89, 239–247. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2017-317138>.
- Ucero, A.C., Bakiri, L., Roediger, B., Suzuki, M., Jimenez, M., Mandal, P., Braghetta, P., Bonaldo, P., Paz-Ares, L., Fustero-Torre, C., Ximenez-Embun, P., Hernandez, A.I., Megias, D., Wagner, E.F., 2019. Fra-2-expressing macrophages promote lung fibrosis in mice. *J. Clin. Invest.* 129, 3293–3309. <https://doi.org/10.1172/JCI125366>.
- Van Dyken, S.J., Liang, H.E., Naikawadi, R.P., Woodruff, P.G., Wolters, P.J., Erle, D.J., Locksley, R.M., 2017. Spontaneous chitin accumulation in airways and age-related fibrotic lung disease. *Cell* 169, 497–509 e413. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.044>.
- Vannella, K.M., Ramalingam, T.R., Hart, K.M., de Queiroz Prado, R., Sciarba, J., Barron, L., Borthwick, L.A., Smith, A.D., Mentink-Kane, M., White, S., Thompson, R. W., Cheever, A.W., Bock, K., Moore, I., Fitz, L.J., Urban Jr., J.F., Wynn, T.A., 2016. Acidic chitinase primes the protective immune response to gastrointestinal nematodes. *Nat. Immunol.* 17, 538–544. <https://doi.org/10.1038/ni.3417>.

- Wells, A.U., 2013. The revised ATS/ERS/JRS/ALAT diagnostic criteria for idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)—practical implications. *Respir. Res.* 14 (1), S2. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-14-S1-S2>.
- Wollin, L., Wex, E., Pautsch, A., Schnapp, G., Hostettler, K.E., Stowasser, S., Kolb, M., 2015. Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.* 45, 1434–1445. <https://doi.org/10.1183/09031936.00174914>.
- Wynn, T.A., 2011. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *J. Exp. Med.* 208, 1339–1350. <https://doi.org/10.1084/jem.20110551>.
- Wynn, T.A., Vannella, K.M., 2016. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. *Immunity* 44, 450–462. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.015>.
- Zhu, Z., Zheng, T., Homer, R.J., Kim, Y.K., Chen, N.Y., Cohn, L., Hamid, Q., Elias, J.A., 2004. Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. *Science* 304, 1678–1682. <https://doi.org/10.1126/science.1095336>.

7.5 *Pharmacological inhibition of chitotriosidase (CHIT1) as a novel therapeutic approach for sarcoidosis*



# Pharmacological Inhibition of Chitotriosidase (CHIT1) as a Novel Therapeutic Approach for Sarcoidosis

Barbara Dymek <sup>1,2</sup>, Piotr Sklepkiewicz<sup>1</sup>, Michal Mlacki <sup>1</sup>, Nazan Cemre Güner<sup>1</sup>, Patrycja Nejman-Gryz<sup>3</sup>, Katarzyna Drzewicka<sup>1</sup>, Natalia Przysucha<sup>3</sup>, Aleksandra Rymaszewska<sup>1</sup>, Magdalena Paplinska-Goryca <sup>3</sup>, Agnieszka Zagodzón<sup>1</sup>, Małgorzata Proboszcz <sup>3</sup>, Łukasz Krzemiński<sup>1</sup>, Jan H von der Thüsen <sup>4</sup>, Katarzyna Górka<sup>3</sup>, Karolina Dzwonek<sup>1</sup>, Zbigniew Zasłona<sup>1</sup>, Pawel Dobrzanski<sup>1</sup>, Rafał Krenke <sup>3</sup>

<sup>1</sup>Molecure SA, Warsaw, 02-089, Poland; <sup>2</sup>Postgraduate School of Molecular Medicine, Medical University of Warsaw, Warsaw, 02-097, Poland; <sup>3</sup>Department of Internal Medicine, Pulmonary Diseases and Allergy, Medical University of Warsaw, Warsaw, 02-097, Poland; <sup>4</sup>Department of Pathology, Erasmus Medical Center, Rotterdam, 3015 GD, the Netherlands

Correspondence: Barbara Dymek, Żwirki i Wigury 101, Warsaw, 02-089, Poland, Tel +48 22 552 67 24, Email b.dymek@molecure.com

**Introduction:** Sarcoidosis is a systemic disease of unknown etiology characterized by granuloma formation in the affected tissues. The pathologically activated macrophages are causatively implicated in disease pathogenesis and play important role in granuloma formation. Chitotriosidase (CHIT1), macrophage-derived protein, is upregulated in sarcoidosis and its levels correlate with disease severity implicating CHIT1 in pathology.

**Methods:** CHIT1 was evaluated in serum and bronchial mucosa and mediastinal lymph nodes specimens from sarcoidosis patients. The therapeutic efficacy of OATD-01 was assessed ex vivo on human bronchoalveolar lavage fluid (BALF) macrophages and in vivo in the murine models of granulomatous inflammation.

**Results:** CHIT1 activity was significantly upregulated in serum from sarcoidosis patients. CHIT1 expression was restricted to granulomas and localized in macrophages. Ex vivo OATD-01 inhibited pro-inflammatory mediators' production (CCL4, IL-15) by lung macrophages. In the acute model of granulomatous inflammation in mice, OATD-01 showed anti-inflammatory effects reducing the percentage of neutrophils and CCL4 concentration in BALF. In the chronic model, inhibition of CHIT1 led to a decrease in the number of organized lung granulomas and the expression of sarcoidosis-associated genes.

**Conclusion:** In summary, CHIT1 activity was increased in sarcoidosis patients and OATD-01, a first-in-class CHIT1 inhibitor, demonstrated efficacy in murine models of granulomatous inflammation providing a proof-of-concept for its clinical evaluation in sarcoidosis.

**Keywords:** chitinase, OATD-01, granuloma, macrophages, interstitial lung disease

## Introduction

Sarcoidosis is a complex, multisystem granulomatous disease of unknown etiology that affects individuals worldwide.<sup>1</sup> More than 90% of sarcoidosis patients develop intrathoracic disease with lymph node or lung involvement. A histological hallmark of sarcoidosis is the accumulation of macrophages and CD4+ T cells forming non-caseating granulomas.<sup>2,3</sup> The immune cells accumulation strongly suggests that the inflammatory response is induced by specific auto- or exogenous antigens.<sup>4</sup> Several antigens of microbial and non-microbial origin together with some self-antigens have been linked to sarcoidosis immunopathogenesis.<sup>4</sup> These antigens are believed to stimulate an abnormal response of antigen-presenting cells.<sup>4</sup> The pathologically activated macrophages release proinflammatory mediators which promote T cell activation and initiation of granuloma formation, depending on genetic background and environmental factors.<sup>5,6</sup> Macrophages can further transform into epithelioid cells, which fuse forming multinucleated giant cells within granulomatous structures. Mature granulomas are composed of a central cluster containing macrophages and macrophage-derived giant cells

surrounded by lymphocytic infiltrate.<sup>6</sup> The dynamic interplay between macrophages and T lymphocytes is believed to determine the outcome of disease: from mild and self-resolving to progressive and recurrent, leading to lung fibrosis.<sup>7</sup>

There is no specific targeted treatment for sarcoidosis and current therapeutic approaches aim at the reduction of the burden of granulomatous inflammation in symptomatic patients. Systemic corticosteroids (CS) remain the standard of treatment. Although short-term benefits of CS have been documented, this class of drugs is known from a significant potential for serious side effects.<sup>3,8</sup> Clearly, there is a strong unmet medical need to develop new therapies for sarcoidosis with improved clinical benefit and safety profile compared to the currently available therapeutic options.

Since studies in patients with sarcoidosis demonstrated highly elevated (>5 fold) serum activity of chitotriosidase (CHIT1) and correlation between CHIT1 serum activity and disease severity, progression and clinical prognosis,<sup>9,10</sup> inhibition of this enzyme seems to be a novel and promising therapeutic approach in sarcoidosis. CHIT1 is a myeloid cell-specific protein and one of the two enzymatically active members of the chitinase family, which have been implicated in the pathology of several lung diseases.<sup>11–13</sup> Literature evidence implicates CHIT1, rather than the other active chitinase-acidic mammalian chitinase (AMCase), as the primary active chitinase in human lungs.<sup>14</sup> Additionally, it has been demonstrated that peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) isolated from sarcoidosis patients specifically form granuloma-like multi-cellular aggregates, when incubated with purified protein derivative (PPD)-coated beads and CHIT1 is one of the most highly upregulated genes in *ex vivo* granulomas, but also in the lung tissue from patients with sarcoidosis.<sup>15</sup>

In our earlier paper, we reported development of OATD-01, which is a small-molecule chitinase inhibitor, and presented its pharmacokinetic and pharmacodynamic features.<sup>16</sup> Recently, we have shown that OATD-01 is effective in the bleomycin-induced pulmonary fibrosis model in mice and that its activity is mediated by suppression of the profibrotic macrophages.<sup>17</sup> The general objective of the current study was to comprehensively evaluate CHIT1 as a novel therapeutic target in sarcoidosis. The specific aims were to measure CHIT1 activity and expression in sarcoidosis patients as well to evaluate the effects of the pharmacological inhibition of CHIT1 with small-molecule inhibitor OATD-01 *ex vivo* on sarcoidosis macrophages and *in vivo* in the murine models of granulomatous inflammation in mice.

## Materials and Methods

### General Study Design

The study was designed as a translational research and included the analysis of material collected from sarcoidosis patients and control subjects followed by the application of murine models of granulomatous inflammation. A scope of human involvement included a collection of biological samples, ie serum, bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and specimens of the bronchial mucosa and mediastinal lymph nodes. Additionally, BALF macrophages isolated from sarcoidosis patient were used to study effects of chitinase inhibitor OATD-01 *in vitro*. Murine models of granulomatous inflammation induced by multiwall carbon nanotubes (MWCNT) and ESAT-6 peptide instillation were used to study the therapeutic efficacy of OATD-01 *in vivo*.

### Human Material Collection

A cohort of newly diagnosed sarcoidosis patients who had not been treated previously (n = 60) as well as control group (n = 29) were recruited in the Department of Internal Medicine, Pulmonary Diseases and Allergy of the Medical University of Warsaw, Poland between 2016 and 2018. The following criteria based on ATS guidelines<sup>18</sup> had to be met to be included in the sarcoidosis group: 1) diagnosis of sarcoidosis supported by the results of histopathological examination of lymph nodes or lung biopsies showing non-caseating granulomas, 2) exclusion of other granulomatous pulmonary diseases, mainly tuberculosis. None of the sarcoidosis patients presented with any acute condition or exacerbation of concomitant diseases. Patients did not present signs of respiratory tract infection in the preceding 6 weeks. The control group comprised volunteers with no history of chronic lung diseases and without any symptoms of respiratory tract infection in the preceding 6 weeks. Normal lung function tests were a mandatory inclusion criterion in this group. Those volunteers were responding to a request for study participation provided via public notice. The characteristics of control and sarcoidosis groups is provided in Table 1. Our study presented in the manuscript has been approved by the Local

**Table 1** Characteristics of Sarcoidosis Patients and Control Subjects

	Control	Sarcoidosis	P value
<b>Number</b>	29	60	NA
<b>Sex (male, female)</b>	11, 18	32, 28	0.1847
<b>Age (in years) median (min, max)</b>	32 (22, 68)	41 (22, 68)	0.0020
<b>BMI median (min, max)</b>	24.9 (17.6, 44.1)	28 (20.5, 39.4)	0.0011
<b>Race</b>	29 Caucasian	60 Caucasian	NA
<b>Smoker (n%):</b>			0.0831
<b>No</b>	15 (52%)	40 (67%)	
<b>Yes</b>	9 (31%)	7 (12%)	
<b>Ex</b>	5 (17%)	13 (22%)	
<b>Smoking (packs per year):</b>			0.3791
<b>0</b>	15	40	
<b>0–10</b>	7	9	
<b>&gt;10</b>	7	11	
<b>Scadding sarcoidosis stage (1–4)</b>	NA		NA
<b>1</b>		19	
<b>2</b>		38	
<b>3</b>		3	
<b>4</b>		0	
<b>DLCO (% predicted) mean (standard deviation)</b>	NA	96.0% (17.3)	NA

Abbreviation: NA, not applicable.

Bioethics Committee at the Medical University of Warsaw, Poland (No. of approval: KB/236/2015) and was in full compliance with the Declaration of Helsinki. The consent was obtained from the study participants prior to study commencement. Blood, bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and the specimens of bronchial mucosa and mediastinal lymph nodes were collected and processed as previously described.<sup>19,20</sup>

## Human Samples Analyses

### Human CHIT1 Protein

The CHIT1 protein concentration in human serum samples was evaluated using Human Chitotriosidase ELISA Kit (CycLex) and the measurements were performed according to the protocol. The range and the sensitivity of the applied kit were 56.25–3600 pg/mL and 48.3 pg/mL, respectively.

### Chitinolytic Activity in Human Serum

The enzymatic activity of chitinases in human serum was measured as previously described.<sup>16</sup>

### CHIT1 Immunohistochemical Staining of BALF Cells

The immunocytochemical staining of BALF cell smears was performed as previously.<sup>17</sup> In brief, anti-CHIT1 antibodies (Biorbyt, orb377995; Lot# CQ2228) were used followed by donkey anti-rabbit-horseradish peroxidase (HRP) secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch, 711–035-152, Lot# 126333). The percentage of CHIT1-positive macrophages was determined based on a microscopic examination of the cell morphology (300 cells from various fields).

### BALF Macrophages Culture and Treatment

Macrophages from BALF of sarcoidosis patients (n = 6) were isolated by adhesion to plastic as described previously.<sup>17</sup> The cells were treated with OATD-01 at 1  $\mu$ M or vehicle (0, 1% dimethyl sulfoxide [DMSO]) for 24h and cell supernatants were collected for multiplex analysis of cytokines and chemokines (Bio-plex assay, Bio-rad).



## Animal Studies

All in vivo experiments were approved by the Local Ethics Committee for Animal Experimentation, Warsaw, Poland (No. of approval: WAW1/798/2018) and followed the regulations of the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care. C57BL/6 mice were purchased from Charles River Laboratory (Germany). There were two animal models applied for studying OATD-01 efficacy in vivo: a 10-day-long acute model and a 40-day-long model of persistent granulomatous inflammation.

### Animal Models of Granulomatous Inflammation Induced by Multiwall Carbon Nanotubes (MWCNT) and ESAT-6 Peptide Instillation

Granulomatous inflammation in murine lungs was induced by a triple oropharyngeal administration of MWCNT and ESAT-6 peptide to 8-week-old C57Bl/6 female mice. MWCNT with outer diameter of 10–30 nm and length of 5–15  $\mu$ m (SES Research; Catalog# 900–1201; Lot GS-1815) at the dose of 0.1 mg/mouse and ESAT-6 peptide (Innovagen; NNALQNLARTISEAG; Acetate) at the dose of 20  $\mu$ g/mouse was administered in a volume of 50  $\mu$ L/mouse in a vehicle (Dipalmitoylphosphatidylcholine [DPPC] 0.1 mg/mL; mouse serum albumin 0.2 mg/mL in phosphate buffered saline [PBS]) at 3 consecutive days under 5% isoflurane anesthesia. OATD-01 in 0.5% carboxymethylcellulose was administered orally at 100 mg/kg dose from day 0 to 10 in the 10-day-long model of acute granulomatous inflammation and from day 10 to 40 in the therapeutics scheme of treatment in the 40-day-long chronic model. In acute model mice were sacrificed on day 10 after the initial MWCNT/ESAT-6 administration and the BALF was collected for subsequent analyses with flow cytometry and biochemical methods. In the chronic model, mice were sacrificed on day 40 and lungs were collected from each mouse for histopathological evaluation (left lung), gene expression analysis and chemokine concentrations (right lung).

### Bronchoalveolar Lavage Fluid Collection

At the end of the study, murine lungs were washed with 1 mL of PBS via trachea and then the collected BALF was centrifuged (10 min, 2000 rpm, 4°C). Supernatant was collected for further analysis and cells pellet was used for flow cytometry analysis.

### Chitinolytic Activity in Murine BALF

The enzymatic activity of chitinases in murine BALF was measured as described previously.<sup>17</sup>

### BALF Cells Preparation and Flow Cytometry Analysis

The pellet of BALF cells was resuspended in 300  $\mu$ L of PBS with bovine serum albumin (BSA) and used for flow cytometry analysis. The cells were pipetted through cell strainer cap directly to the well of 96-well plate and were centrifuged (5 min, 1500 rpm, 4°C). Then supernatant was discarded and cells were resuspended in 54  $\mu$ L of 5% normal rat plasma in PBS with BSA and blocked for 15 minutes on ice. Then, the cells were divided into two parts and to each 3  $\mu$ L of antibody cocktail was added (according to Table 2). The cells were stained on ice for 30 minutes in dark, washed twice in PBS with BSA and resuspended in PBS with BSA and NaN<sub>3</sub> for the flow cytometry analysis (Guava, Merck).

**Table 2** Antibodies Used for Flow Cytometry Analysis

Antibody	Cat. No.
Anti-CD11b-AF488 (clone M1/70)	Biolegend, 101217
Anti-CD45.2-PE (clone 104)	eBiosciences, 12-0454
Anti-Ly6G-PerCP-Cy5.5 (clone 1A8)	Biolegend, 127616
Anti-CD11c-APC (clone N418)	eBiosciences, 17-0114-82

## Lung Collection and Histological Evaluation

Firstly, the lungs were perfused with PBS via the right ventricle and then right upper airway was closed and the right lung was dissected for further RNA and protein analysis. The left lung was instilled with 10% neutral buffered formalin (NBF) via a catheter in trachea and infused with 1 mL of NBF. Then left lung was removed *en block* with heart, thymus and trachea and kept in NBF for 48h. Lung was sliced sagittally. To facilitate handling in the next steps, halves of lobes were pre-embedded in melted agarose solution (2% in PBS). The blocks were processed according to a standard protocol, embedded in paraffin, cut into 5  $\mu$ m sections and mounted on glass slides. Slides were then stained with hematoxylin–eosin (HE) using a standard protocol. Histological analysis of granulomatous inflammation on day 40 was assessed on 3 sets of sections per animal separated by 100  $\mu$ m. Lung granulomatous inflammation was evaluated in a blinded fashion using the established scoring system (0–5, where 0 – no MWCNT particles, 1 – free uninvolved MWCNT particles, 2 – MWCNT particle accompanied with few cells, 3 – 1 layer of cells around MWCNT particle, 4 – 2–3 layers of cells around MWCNT particle, 5 – small organized granulomatous structure).

## Real-Time PCR

One lobe from the right lung of each mouse was stored in RNALater buffer (Invitrogen). Total RNA was isolated using RNeasy MiniKit (Qiagen) applying the manufacturer's protocol. An equal amount of RNA was used for reverse transcription reaction (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems) according to the manufacturer's protocol. For real-time PCR the murine gene specific TaqMan Assays together with TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) and Real-time PCR Detection System CFX-384 (BIO-RAD) were used. The relative gene expression was calculated based on the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method.<sup>21</sup>

## Lung Homogenates Preparation for ELISA

The snap-frozen lobes of the right lung were thawed, weighed and transferred to ice-cold tubes with PBS with protease inhibitor cocktail (Sigma). The lung tissue was homogenized and centrifuged at 10,000 g for 10 minutes at 4°C. Collected supernatants were then used for ELISA assays.

## CCL2 and CCL4 Protein Concentration

CCL2 and CCL4 in BALF and lung homogenates were quantified by ELISA as per the manufacturer's protocol (R&D System). The range and the sensitivity of the CCL2 detecting kit were 7.8–500 pg/mL and 0.666 pg/mL, respectively. The range and the sensitivity of the CCL4 detecting kit were 7.8–500 pg/mL and 3 pg/mL, respectively.

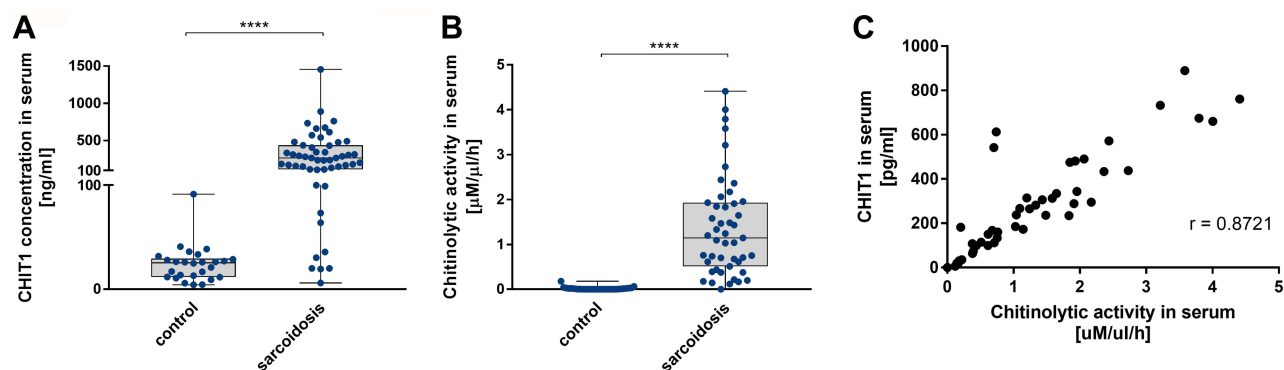
## Statistical Analysis

Data are shown as means  $\pm$  standard error of mean (SEM). GraphPad Prism v. 8.0 was used to perform statistical analyses. For statistical analyses of two groups paired two-tailed *t*-test was used. To evaluate the differences between the groups with normal distribution (verified with D'Agostino & Pearson omnibus normality test) parametric one-way ANOVA with the Dunnett's test for multiple comparisons was utilized. In the case of non-normal distribution, a non-parametric Kruskal–Wallis test with Dunn's multiple comparison test was used to evaluate the differences between the groups. The differences between groups were tested using Pearson's chi-squared test or Fisher's test (for categorical variables) and Mann–Whitney *U*-test (for comparisons between two independent groups). P-values <0.05 were considered statistically significant.

## Results

### CHIT1 is Highly Upregulated in Sarcoidosis and Activated Macrophages in the Human Lung of Sarcoidosis Patients are a Main Source of CHIT1

We first analyzed the chitinolytic activity and CHIT1 concentration in serum from patients with sarcoidosis and control subjects. Results confirmed the highly elevated chitinolytic activity (>75-fold) and CHIT1 concentration (>13-fold) in sarcoidosis serum compared to control samples. (Figure 1A and B). Moreover, no AMCase enzymatic activity was detected in those samples (the activity below level of detection), and chitinolytic activity highly correlated with CHIT1



**Figure 1** CHIT1 activity and concentration in sarcoidosis patients' serum is highly upregulated. **(A)** Chitinolytic activity in serum and **(B)** CHIT1 concentration from control donors and sarcoidosis patients. Data presented as box and whiskers plot \*\*\*\* $P < 0.0001$ . **(C)** The correlation of the chitinolytic activity and CHIT1 concentration in serum of patients with sarcoidosis. Correlation coefficient  $r = 0.8721$ ,  $p < 0.000001$ .

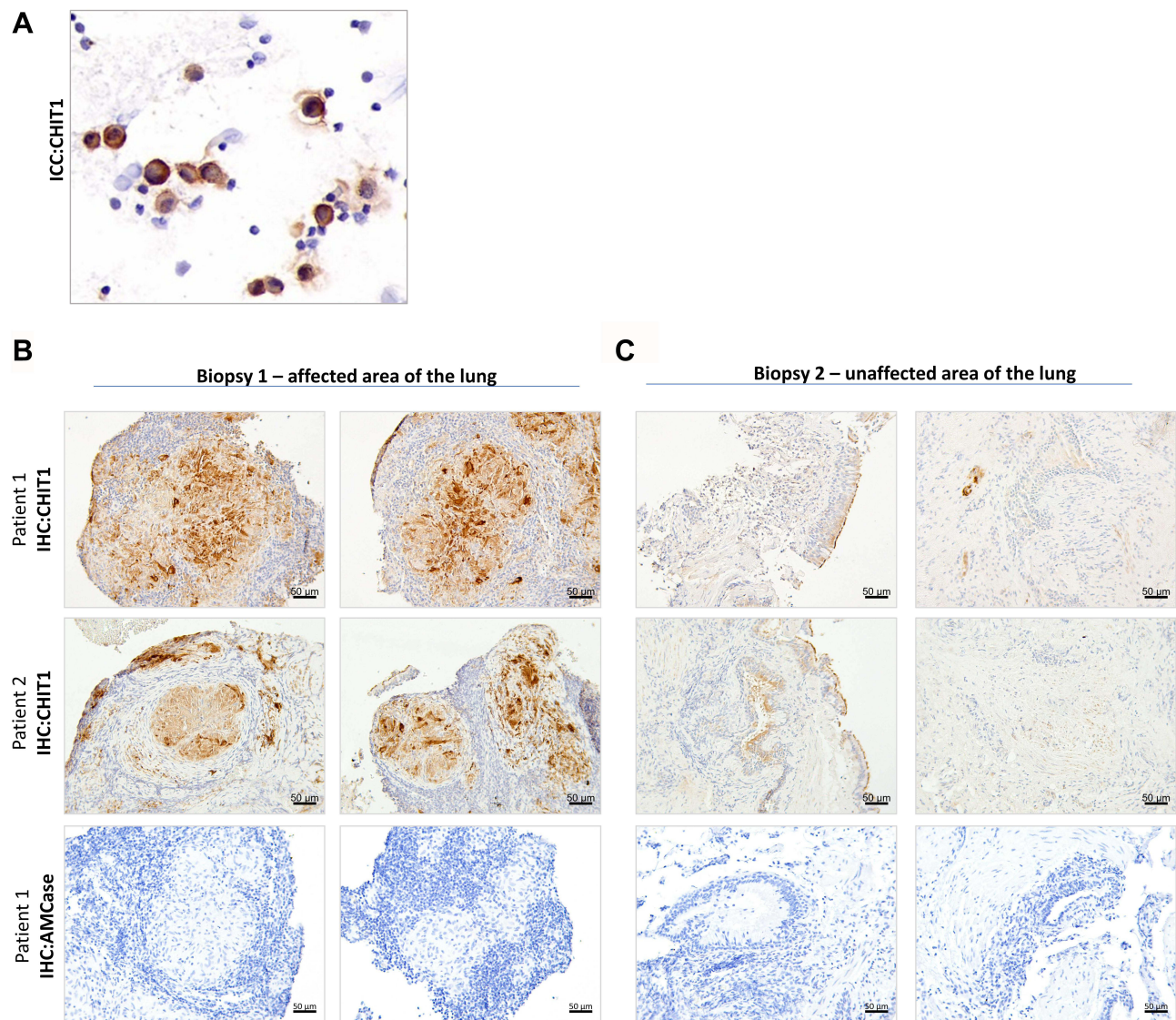
levels in serum indicating that CHIT1 comprises the main source of chitinolytic activity in sera of sarcoidosis patients (Figure 1C). These results were expanded by the immunocytochemistry of BALF cell smears from sarcoidosis patients which demonstrated abundant CHIT1-positive cells, mostly macrophages, while no AMCCase signal was detected (Figure 2A). Moreover, the immunohistochemical evaluation demonstrated robust expression of CHIT1, but not AMCCase, in the bronchial mucosa and mediastinal lymph nodes from the same sarcoidosis patients. CHIT1 expression was restricted to the tissue affected by the granulomatous disease (Figure 2B), with no expression in the granuloma-unaffected areas (Figure 2C). The most significant CHIT1 expression was detected in activated macrophages and granuloma-specific macrophage-derived cells like epithelioid and giant cells. Of note, neither AMCCase expression in diseased tissue (Figure 2B and C) nor its activity in samples was detectable, confirming that CHIT1 is the dominant chitinase in human lungs.

## OATD-01 Inhibits Upregulated Chitinolytic Activity in Sarcoidosis Patients' Serum and Has a Direct Effect on Patients' BALF Macrophages

To confirm the activity of OATD-01, we have evaluated its *ex vivo* ability to inhibit chitinolytic activity in BALF and serum samples of sarcoid patients. The analysis revealed that OATD-01 inhibited chitinolytic activity with  $IC_{50}$  values within a nanomolar range (Figure 3A and B). Furthermore, we conducted experiments to establish a functional link between CHIT1 and sarcoidosis pathology. The Bio-plex analysis of the levels of inflammatory mediators in the supernatants from sarcoidosis patients' BALF macrophages and treated with OATD-01 revealed that OATD-01 reduced levels of several pro-inflammatory chemokines and cytokines implicated in the development of granulomatous inflammation, including CCL4, IL-15 and IL-1 antagonist receptor (Figure 3C–H). Interestingly, no inhibitory effects on the expression of other inflammatory cytokines (IL-6, IL-17) were observed. These results demonstrated the ability of OATD-01 to potently suppress the inflammatory phenotype of sarcoidosis-activated macrophages.

## OATD-01 Demonstrates Anti-Inflammatory Activity in an Acute, 10-Day-Long MWCNT + ESAT-6 Murine Model of Granulomatous Inflammation

In order to evaluate the therapeutic potential of inhibition of chitinases with OATD-01, the acute, 10-day-long murine model of granulomatous inflammation (Figure 4A) was applied that was shown to be driven by either innate or adaptive immune response following MWCNT and ESAT-6 instillation. OATD-01 treatment at 100 mg/kg/dose in a preventive treatment approach for 10 consecutive days resulted in the suppression of inflammatory response as determined by a decreased efflux of pathogenic neutrophils to lungs and increased number of protective resident alveolar macrophages (Figure 4B–D). We have identified sarcoidosis-associated CCL4 chemokine as one of the pro-inflammatory mediators that was reduced in murine BALF following OATD-01 treatment suggesting that the anti-inflammatory effects of CHIT1 inhibition are exerted via modulation of lung macrophages. Specifically, as evidenced in this experiment, inhibition of the



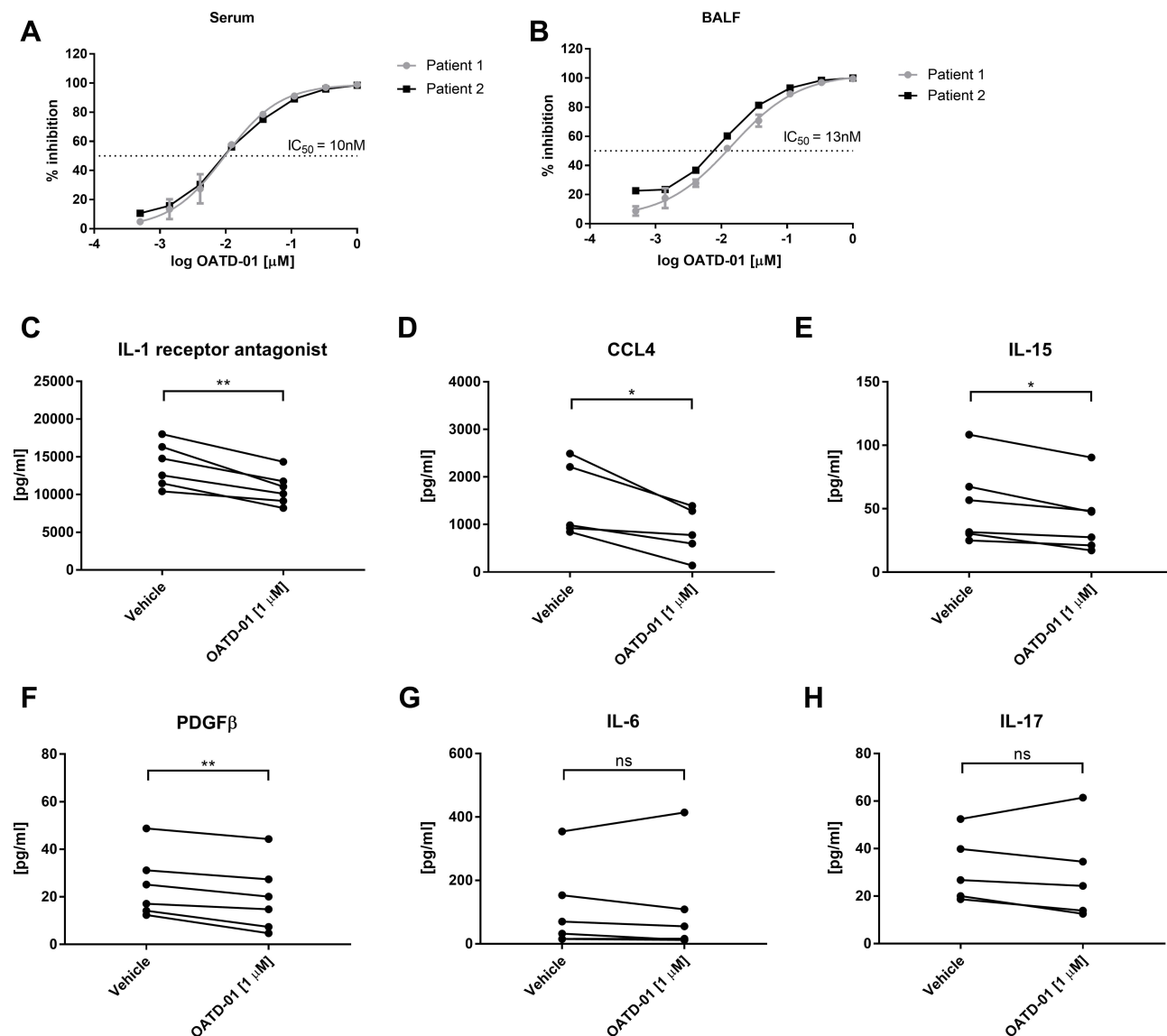
**Figure 2** Pathological macrophages are a source of CHIT1 in sarcoidosis. **(A)** Representative immunocytochemistry for CHIT1 in BALF cells smears from sarcoidosis patients (n = 12); **(B and C)** Representative images for CHIT1 and AMCase immunohistochemistry of the bronchial mucosa and mediastinal lymph nodes specimens of sarcoidosis patients (n = 15).

critical pro-inflammatory chemokine (Figure 4E and F) leads to the inhibited recruitment of pro-inflammatory cells. Concurrently, we have confirmed target engagement in the lungs by showing a significant reduction of the MWCNT-induced chitinolytic activity in murine BALF after OATD-01 treatment (Figure 4G).

## OATD-01 Shows Therapeutic Efficacy in a Chronic 40-Day-Long MWCNT + ESAT-6 Murine Model of Sarcoidosis

To further evaluate the therapeutic potential of OATD-01, we have utilized the chronic 40-day-long model of persistent granulomatous inflammation in mice induced by MWCNT and ESAT-6 peptide (Figure 5A) with confirmed expression of CHIT1 in the murine lungs (Supplemental Figure S1). OATD-01, administered at 100 mg/kg dose in the therapeutic scheme of treatment starting from day 10 when the presence of granulomatous inflammation was confirmed, significantly affected the granulomatous inflammation. The histological assessment of murine lungs after 40 days post MWCNT + ESAT6 administration revealed that OATD-01 treatment decreased the number of organized granulomatous lesions (Score 3–4) compared to the vehicle-treated group without altering total MWCNT incidence in the lungs (Figure 5B–H).



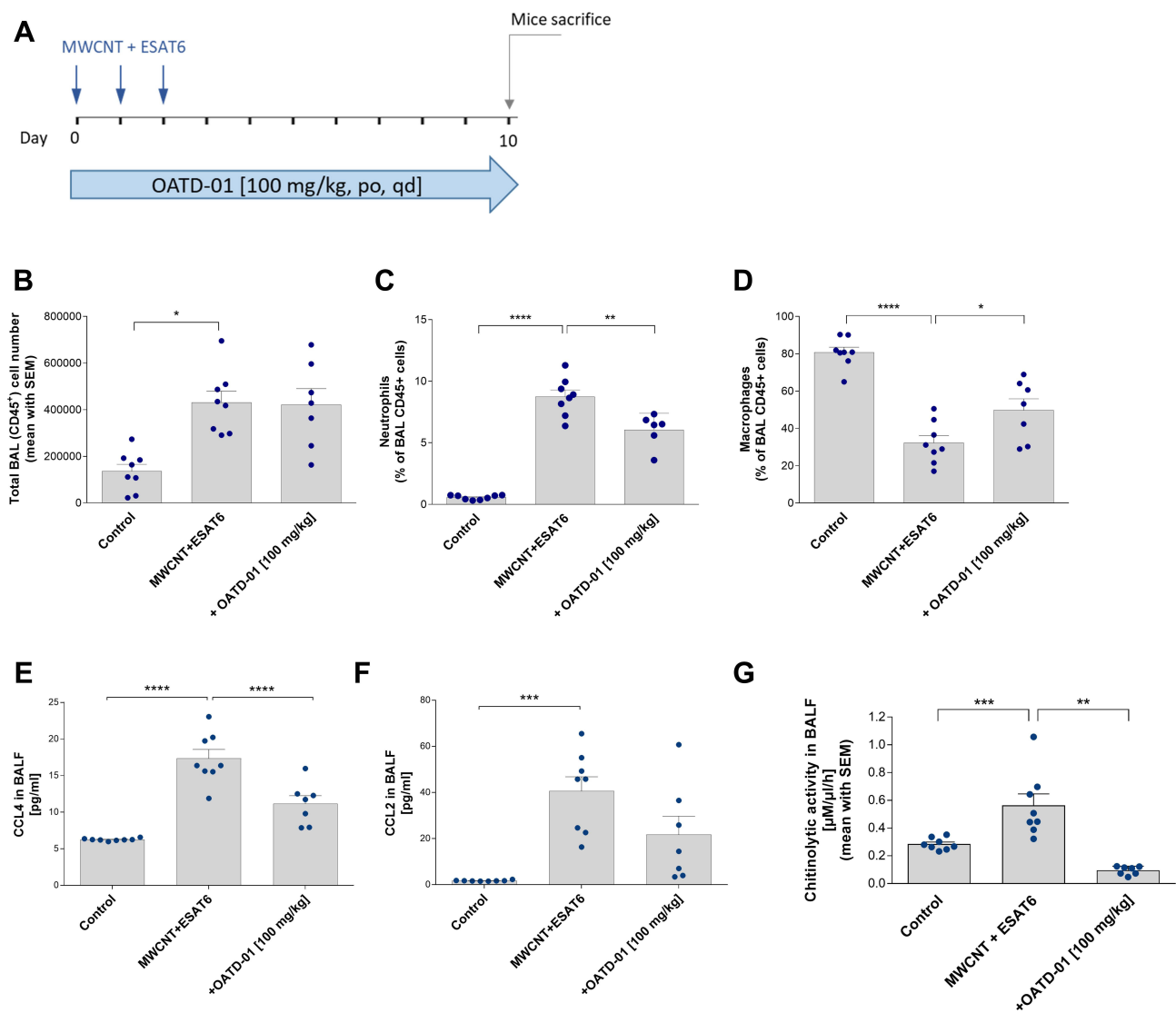


**Figure 3** OATD-01 inhibits upregulated chitinolytic activity in serum from sarcoidosis patients and has a direct effect on patients' BALF macrophages. **(A)** Ex vivo inhibition of the chitinolytic activity in sarcoidosis patients serum samples ( $n = 2$ ) by OATD-01. **(B)** Ex vivo inhibition of the chitinolytic activity in sarcoidosis patients BALF samples ( $n = 2$ ) by OATD-01. **(C–H)** The levels of immune responses' modulators (CCL4, IL-15, PDGF $\beta$ , IL-6, IL-17) in sarcoidosis BALF macrophages supernatants ( $n = 6$ ) after OATD-01 treatment. The concentration of analytes in supernatants from untreated and OATD-01-treated macrophages were compared using two-tailed paired  $t$ -test. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

Moreover, gene expression analysis in the lungs demonstrated that OATD-01 downregulated the expression of genes associated with macrophage activation (*Chi3l1*, *Ccl2*, *Spp1*) (Figure 5I–L). On the protein level, OATD-01 treatment significantly reduced CCL4 expression in lung homogenates (Figure 5M). Increased levels of CCL4 have been associated with pulmonary sarcoidosis suggesting its role in disease pathology and granuloma formation and persistence. These results are in accordance with the data obtained in BALF macrophages from sarcoidosis patients. In summary, OATD-01 administered in the therapeutic regimen demonstrated therapeutic efficacy in the chronic MWCNT + ESAT-6-induced mouse model of granulomatous inflammation suggesting its potential as a novel, CS-sparing therapy for sarcoidosis.

## Discussion

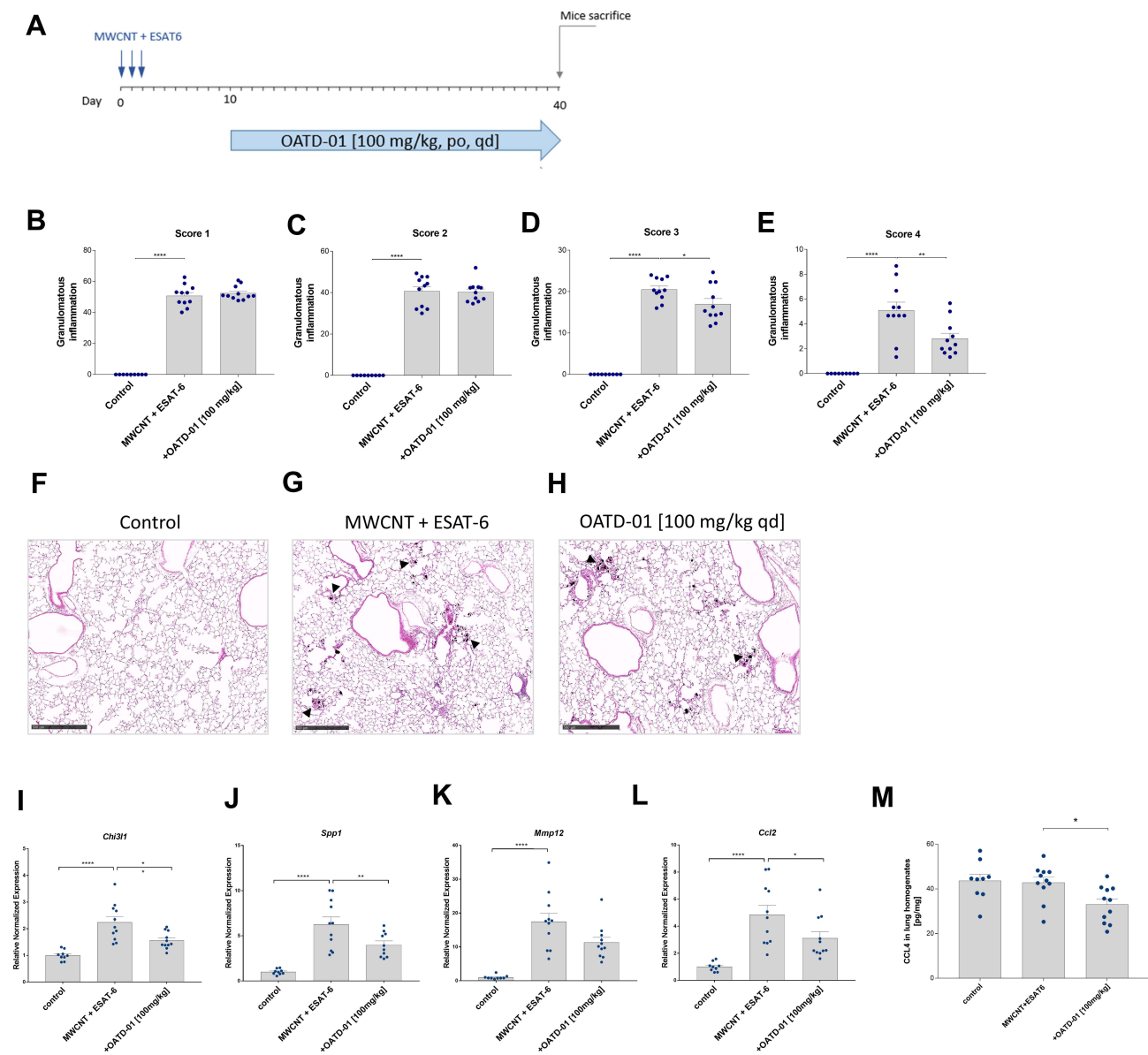
In the current study, we have reported a comprehensive analysis of activity and expression of CHIT1 in sarcoidosis patients showing that pathological macrophages are the main source of CHIT1. Importantly, AMCcase expression is limited in sarcoidosis patients. Moreover, we have demonstrated that pharmacological inhibition of CHIT1 with OATD-



**Figure 4** OATD-01 shows the anti-inflammatory effects in 10-day-long MWCNT + ESAT-6 model of granulomatous inflammation in mice. **(A)** A scheme of the in vivo experiment. MWCNT + ESAT-6 was administered oropharyngeally on 3 consecutive days and OATD-01 was administered orally, once a day for 10 days at 100 mg/kg dose. **(B)** Analysis of CCL2 levels in murine BALF following OATD-01 administration in comparison to the vehicle-treated animals. **(C)** Analysis of CCL4 levels in murine BALF following OATD-01 administration in comparison to the vehicle-treated animals. **(D)** Chitinolytic activity in BALF following OATD-01 administration as compared to the vehicle-treated animals. **(E–G)** Flow cytometry analysis of BALF leukocyte subpopulations such as alveolar macrophages and neutrophils following 10-day treatment with OATD-01 as compared to the vehicle-treated mice. Data presented as mean  $\pm$  SEM; \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001, \*\*\*\* $p$ <0.0001.

OATD-01 resulted in the attenuated inflammatory response in the MWCNT + ESAT-6 induced model when administered in both acute and chronic scheme. In an acute 10-day long model, OATD-01 changed the ratio of immune cell subpopulations, namely decreasing the percentage of pro-inflammatory neutrophils while increasing the percentage of anti-inflammatory alveolar macrophages. In the chronic, 40-day-long murine model of granulomatous inflammation, the suppression of the chitinolytic activity by OATD-01 resulted in the significant attenuation of pathological granulomas in the mouse lungs. Additionally, ex vivo OATD-01 reduced the production of the pro-inflammatory mediators, such as CCL4, IL-15 and IL-1 receptor antagonist by BALF macrophages obtained from sarcoidosis patients. To our knowledge, our study is the first one providing the preclinical proof-of-concept data showing that inhibition of CHIT1 may represent a novel therapeutic approach in sarcoidosis acting via inhibition of alveolar macrophage responses, which leads to a decreased inflammation and subsequently reduced granuloma formation in the lungs.

We have shown elevated chitinolytic activity in serum of more than 85% of sarcoidosis patients presenting it as a common event in sarcoidosis pathology both systemically and locally in the diseased lungs. Interestingly, no



**Figure 5** OATD-01 demonstrates therapeutic effects in 40-day-long MWCNT + ESAT-6 murine model of granulomatous inflammation affecting granuloma maturation and pro-inflammatory mediators expression. **(A)** A scheme of the in vivo experiment. MWCNT + ESAT-6 was administered oropharyngeally on 3 consecutive days and OATD-01 was dosed in a therapeutic treatment regimen, once a day, for 30 days at 100 mg/kg dose. **(B–E)** Analysis of pulmonary granulomatous inflammation by histological assessment in the lung sections ( $n = 3$  per animal) in animals following OATD-01 administration in comparison to the vehicle-treated control group. **(F–H)** Representative images of lung granulomatous changes visualized by the HE staining in control animals, mice instilled with MWCNT + ESAT-6 only or dosed also with OATD-01. The arrows indicate granuloma-like changes. **(I–L)** The relative expression of pro-inflammatory mediators (*Chi3l1*, *Spp1*, *Mmp12*, *Ccl2*) in the lungs in vehicle- and OATD-01-treated animals evaluated by qPCR. **(M)** Analysis of CCL4 levels in lung homogenate following OATD-01 treatment in comparison to the vehicle-treated animals. Data presented as mean  $\pm$  SEM; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

chitinolytic activity at pH 2 was detected, proving that CHIT1 and not AMCcase is the active chitinase in sarcoidosis. CHIT1 protein and activity was detected in all tested serum samples (either control or sarcoidosis group), suggesting that among the individuals in the study there were no carriers of inactivating *CHIT1* gene duplication, although no genetic study was applied to confirm that. Expression profile of chitinases in sarcoidosis was verified by the immunohistochemical analysis of bronchial mucosa and mediastinal lymph nodes specimens. Robust CHIT1 expression was limited to the granulomas, sparing the disease-unaffected tissue. In contrast, we were not able to demonstrate AMCcase expression in the sarcoidosis patients' lungs. The most significant CHIT1 expression was detected in activated macrophages and macrophage-derived epithelioid and giant cells. This observation validates immunocytochemical analysis of BALF cells



smears which demonstrated macrophage-specific CHIT1 staining. Our data expands on the previous reports, which show elevated CHIT1 expression and activity in sarcoidosis.<sup>9,10</sup> We have specified previous findings regarding the CHIT1 localization and limited AMCCase expression in sarcoidosis. Overall, we demonstrate that CHIT1 is the pathological, predominant chitinase in sarcoidosis with expression limited to macrophages in sarcoid lung granulomas.

Recently, we have shown that OATD-01 selectively inhibits chitinases with no significant interactions with off-targets and it has a favorable pharmacokinetic profile in rodents and higher species proving its excellent druglike properties.<sup>16</sup> OATD-01 administered once daily orally in doses between 30 and 100 mg/kg demonstrated significant antifibrotic efficacy in a preclinical murine model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis.<sup>17</sup>

Having identified alveolar macrophages as the main source of CHIT1 in sarcoid lungs, we evaluated the effects of OATD-01, a highly potent and selective chitinase inhibitor, on the BALF macrophages from sarcoidosis patients *ex vivo*. The inhibitor has affected macrophage secretome, including the reduction of the level of a pro-inflammatory mediator such as CCL4 (MIP-1 $\beta$ ), IL-15 and IL-1 receptor antagonist. CCL4 is a CC chemokine that is involved in the recruitment of T cells, in particular CD4+ T cells, to the site of inflammation.<sup>22</sup> Importantly, it was shown that the concentration of CCL4 in BALF was significantly increased in patients with sarcoidosis, regardless of the stage of the disease.<sup>23</sup> Levels of CCL4 correlated with the number of CD4+ and CD8+ T cells, indicating the role of this mediator in the recruitment of immune cells.<sup>23</sup> This proves an indirect effect of OATD-01 on adaptive immunity as a consequence of modulation of macrophage secretome.

Another important cytokine inhibited by OATD-01 is IL-15 - A pleiotropic, pro-inflammatory signaling protein that has an impact on various immune cells. In particular, it was shown that it promotes the survival of T cells and B cells.<sup>24</sup> It has been reported that IL-15 plays a role in the modulation of Th1-type immune response.<sup>25</sup> Of note, IL-15 has been demonstrated to be highly expressed in the lung tissue<sup>26</sup> and BALF fluid<sup>27</sup> of patients with sarcoidosis. Moreover, it has been also implicated in the formation of multinucleated giant cells,<sup>28</sup> showing even broader therapeutic potential for OATD-01. Finally, we have shown that OATD-01 modulated IL-1 receptor antagonist, which is a member of the IL-1 cytokine family and is secreted by immune and epithelial cells. IL-1 receptor antagonist modulates immune responses related to IL-1 signaling via prevention of binding of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  to IL-1 receptor.<sup>29</sup> Moreover, anakinra - The recombinant IL-1 receptor antagonist, is used for the treatment of inflammatory disorders, eg rheumatoid arthritis.<sup>30</sup> In sarcoidosis, it was proposed that the IL-1 receptor antagonist to IL-1 $\beta$  ratio in BAL fluid macrophage culture supernatants can serve as a prognostic factor in patients with pulmonary sarcoidosis.<sup>31</sup> In the future we propose to further explore CHIT1 inhibition as a therapeutic strategy to modulate macrophage fate in sarcoidosis pathology. Our hypothesis is based on the direct effects of OATD-01 on the expression of pro-inflammatory mediators by BALF macrophages. This suggests that inhibition of CHIT1 may represent a novel therapeutic approach in sarcoidosis acting via modulation of macrophages and affecting the migration of the inflammatory cells to the lung.

The fact that macrophages are at the core of granuloma formation processes, prompted us to evaluate the therapeutic potential of OATD-01 in the murine models of granulomatous inflammation. There is no gold standard preclinical animal model of sarcoidosis and several models have been proposed to mimic granulomatous inflammation observed in humans.<sup>32-34</sup> The mouse model induced by MWCNT and ESAT-6 administration allows for the evaluation of both acute inflammatory response and the chronic persistent granuloma formation processes in murine lungs. OATD-01 treatment resulted in the downregulation of the expression of activated macrophages associated genes: *Chi3l1*, *Ccl2* and *Spp1*. Chitinase-3 like-protein-1 (CHI3L1), which is believed to be an activation marker for macrophages, has been strongly associated with inflammatory and fibrotic lung diseases<sup>35-37</sup> including sarcoidosis, where it serves as a disease biomarker.<sup>38</sup> CCL2 is a pleiotropic, pro-inflammatory chemokine acting via several mechanisms, including the recruitment of immune cells to the site of inflammation and T cells polarization modulation.<sup>39</sup> A body of evidence exists which indicates CCL2 as an important mediator in various inflammatory and fibrotic lung disorders, including sarcoidosis.<sup>40,41</sup> Osteopontin (*Spp1* gene product) is a secreted protein expressed by a variety of different cell types that regulates diverse biological functions.<sup>42</sup> In sarcoidosis patients osteopontin is highly upregulated in plasma<sup>43</sup> and more importantly, it is expressed by epithelioid and multinucleated giant cells in lung granulomas and was implicated in granuloma formation.<sup>44</sup> Additionally, the inhibition of chitinases in either acute or chronic model of granulomatous inflammation in mice led to the decreased levels of CCL4 – the pro-inflammatory chemokine that was also reduced in human BALF macrophages’

supernatant from sarcoidosis patients following OATD-01 treatment *ex vivo*. Taken together OATD-01 inhibited secretion of inflammatory mediators relevant in various lung disorders.

There are some limitations of this study that need to be considered. Firstly, the human material originated from a single-center, cohort study with a limited number of participants. Secondly, although there were attempts to match the sarcoidosis and control groups, in particular based on sex, age and smoking status, the sarcoidosis and control groups were not age-matched, and it cannot be excluded that age has an impact on the activity and expression of CHIT1. Thirdly, because sarcoidosis' triggering factors are not fully defined, there is no widely accepted animal model of this disease that would fully resemble sarcoidosis pathology.<sup>32</sup> Although MWCNT along with ESAT-6 peptide instillation to mice has been shown to evoke persistent granulomatous inflammation in murine lungs with immune cell infiltration,<sup>33,34</sup> the mechanisms by which carbon nanotubes induce inflammatory responses in murine lungs remain unknown. Despite these limitations, we believe that the results of this study present important additions to the current knowledge on CHIT1 being a potential therapeutic target.

## Conclusion

To conclude, the clinical data from patients with sarcoidosis, the effects of OATD-01 on BALF macrophages and the results from animal models of acute and chronic granulomatous inflammation support the role of CHIT1 in sarcoidosis development and progression and provide a rationale for targeting CHIT1 as a novel therapeutic approach.

## Institutional Review Board Statement

The study involving human samples was approved by the Local Bioethics Committee at the Medical University of Warsaw, Poland, No. of approval: KB/236/2015. The animal studies were approved by the First Local Ethics Committee for Animal Experimentation, Warsaw, Poland, No. of approval: WAW1/798/2018.

## Acknowledgments

We thank Adam Golebiowski, Marzena Mazur and Robert Koralewski for their work on OATD-01 discovery and synthesis and for their support.

## Funding

Studies were supported by three projects: (1) "Preclinical research and clinical trials of a first-in-class development candidate in the therapy of asthma and inflammatory bowel disease" (POIR.01.01.01-00-0168/15), acronym IBD, (2) "Development of a 'first-in-class' small molecule drug candidate for treatment of idiopathic pulmonary fibrosis through chitotriosidase inhibition" (POIR.01.01.01-00-0551/15), acronym IPF, both co-financed by European Union through the European Regional Development Fund within the Smart Growth Operational Programme and (3) "Preclinical and clinical development of drug candidate OATD-01, for the treatment of sarcoidosis patients" (MAZOWSZE/0128/19), acronym SARCO, as part of the "Path for Mazovia" competition co-financed by the National Centre for Research and Development from national funds. BAD was supported by the Ministry of Science and Higher Education, Poland (50//DW/2017/01/1).

## Disclosure

At the time of the study BAD, PS, MM, NCG, KD, AR, AZ, ŁK, KDz, ZZ and PD were employees and shareholders of Molecure SA (previously OncoArendi Therapeutics SA), which develops inhibitors of chitinases. JvdT received research funding from BMS, OncoArendi Therapeutics and Roche, and consulting fees from Boehringer Ingelheim, MSD and Roche. RKr received fees for lectures and/or travel expenses from AstraZeneca, Chiesi, Polpharma and Roche. KG received fees for lectures and/or travel expenses from Boehringer Ingelheim and Roche. The authors report no other conflicts of interest in this work.

## References

1. Hunninghake GW, Costabel U, Ando M. Statement on sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160:736–755. doi:10.1164/ajrccm.160.2.ats4-99.
2. Grunewald J, Grutters JC, Arkema EV. Sarcoidosis. *Nat Rev Dis Prim.* 2019. doi:10.1038/s41572-019-0096-x
3. Spagnolo P, Rossi G, Trisolini R, Sverzellati N, Baughman RP, Wells AU. Pulmonary sarcoidosis. *Lancet Respir Med.* 2018;6:389–402. doi:10.1016/S2213-2600(18)30064-X
4. Bennett D, Bargagli E, Refini RM, Rottoli P. New concepts in the pathogenesis of sarcoidosis. *Expert Rev Respir Med.* 2019;13:981–991. doi:10.1080/17476348.2019.1655401
5. Venet A, Hance AJ, Saltini C, Robinson BW, Crystal RG. Enhanced alveolar macrophage-mediated antigen-induced T lymphocyte proliferation in sarcoidosis. *J Clin Invest.* 1985;75:293–301. doi:10.1172/JCI111688
6. Zissel G, Müller-Quernheim J. Cellular players in the immunopathogenesis of sarcoidosis. *Clin Chest Med.* 2015;36:549–560. doi:10.1016/j.ccm.2015.08.016
7. Sakthivel P, Bruder D. Mechanism of granuloma formation in sarcoidosis. *Curr Opin Hematol.* 2017;24:59–65. doi:10.1097/MOH.0000000000000301
8. Nunes H, Jeny F, Bouvry D. Indications for treatment of sarcoidosis. *Curr Opin Pulm Med.* 2019;25:505–518. doi:10.1097/MCP.0000000000000604
9. Boot RG, Hollak CEM, Verhoek M, Alberts C, Jonkers RE, Aerts JM. Plasma chitotriosidase and CCL18 as surrogate markers for granulomatous macrophages in sarcoidosis. *Clin Chim Acta.* 2010;411:31–36. doi:10.1016/j.cca.2009.09.034
10. Bennett D, Cameli P, Lanzarone N. Chitotriosidase: a biomarker of activity and severity in patients with sarcoidosis. *Respir Res.* 2020. doi:10.1186/s12931-019-1263-z
11. Cho SJ, Weiden MD, Lee CG. Chitotriosidase in the pathogenesis of inflammation, interstitial lung diseases and COPD. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2015;7:14–21. doi:10.4168/aaair.2015.7.1.14
12. Przysucha N, Górska K, Krenke R. Chitinases and chitinase-like proteins in obstructive lung diseases – current concepts and potential applications. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2020;15:885–899. doi:10.2147/COPD.S236640
13. Chang D, Sharma L, Dela Cruz CS. Chitotriosidase: a marker and modulator of lung disease. *Eur Respir Rev.* 2020;29:190143. doi:10.1183/16000617.0143-2019
14. Seibold MA, Donnelly S, Solon M. Chitotriosidase is the primary active chitinase in the human lung and is modulated by genotype and smoking habit. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;122:944–950. doi:10.1016/j.jaci.2008.08.023
15. Crouser ED, White P, Caceres EG. A novel in vitro human granuloma model of sarcoidosis and latent tuberculosis infection. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2017;57:487–498. doi:10.1165/rcmb.2016-0321OC
16. Koralewski R, Dymek B, Mazur M. Discovery of OATD-01, a first-in-class chitinase inhibitor as potential new therapeutics for idiopathic pulmonary fibrosis. *J Med Chem.* 2020;63:15527–15540. doi:10.1021/acs.jmedchem.0c01179
17. Sklepkiwicz P, Dymek BA, Mlacki M. Inhibition of CHIT1 as a novel therapeutic approach in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur J Pharmacol.* 2022;919:174792. doi:10.1016/j.ejphar.2022.174792
18. Crouser ED, Maier LA, Baughman RP. Diagnosis and detection of sarcoidosis an official American thoracic society clinical practice guideline. *Am J Respir Crit Care Med.* 2020;201:E26–51. doi:10.1164/rccm.202002-0251ST
19. Proboszcz M, Paplińska-Goryca M, Nejman-Gryz P, Górska K, Krenke R. A comparative study of sTREM-1, IL-6 and IL-13 concentration in bronchoalveolar lavage fluid in asthma and COPD: a preliminary study. *Adv Clin Exp Med.* 2017;26:231–236. doi:10.17219/acem/64875
20. Osinka K, Zielińska-Krawczyk M, Korczyński P. Impact of endobronchial ultrasound guided transbronchial needle aspiration on diagnostic yield of bronchoscopy in patients with mediastinal lymph node enlargement. *Adv Exp Med Biol.* 2016;911:33–43 doi:10.1007/5584\_2016\_222.
21. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* 2001;25:402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
22. Taub DD, Conlon K, Lloyd AR, Oppenheim JJ, Kelvin DJ. Preferential migration of activated CD4 + and CD8 + T cells in response to MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$ . *Science.* 1993;260:355–358. doi:10.1126/science.7682337
23. Capelli A, Stefano ADI, Lusuardi M, Gnemmi I, Donner C. Increased macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  and macrophage inflammatory protein-1 $\beta$  levels in bronchoalveolar lavage fluid of patients affected by different stages of pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:236–241. doi:10.1164/ajrccm.165.2.2106084
24. Bulfone-Paus S, Ungureanu D, Pohl T. Interleukin-15 protects from lethal apoptosis in vivo. *Nat Med.* 1997;3:1124–1128. doi:10.1038/nm1097-1124
25. Seder RA. High-dose IL-2 and IL-15 enhance the in vitro priming of naive CD4+ T cells for IFN- $\gamma$  but have differential effects on priming for IL-4. *J Immunol.* 1996;156:2413–2422.
26. Muro S, Taha R, Tscopoulos A. Expression of IL-15 in inflammatory pulmonary diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;108:970–975. doi:10.1067/mai.2001.119556
27. Minasyan M, Sharma L, Pivarnik T. Elevated IL-15 concentrations in the sarcoidosis lung are independent of granuloma burden and disease phenotypes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2021;320:L1137–46. doi:10.1152/ajplung.00575.2020
28. Wang H, Jiang H, Teles RMB. Cellular, molecular, and immunological characteristics of Langhans multinucleated giant cells programmed by IL-15. *J Invest Dermatol.* 2020;140:1824–1836.e7. doi:10.1016/j.jid.2020.01.026
29. Teufel LU, Arts RJW, Netea MG, Dinarello CA, Joosten LAB. IL-1 family cytokines as drivers and inhibitors of trained immunity. *Cytokine.* 2022;150:155773. doi:10.1016/j.cyto.2021.155773
30. Cavalli G, Dinarello CA. Anakinra therapy for non-cancer inflammatory diseases. *Front Pharmacol.* 2018;9. doi:10.3389/fphar.2018.01157
31. Mikuniya T, Nagai S, Takeuchi M. Significance of the interleukin-1 receptor antagonist/interleukin-1 $\beta$  ratio as a prognostic factor in patients with pulmonary sarcoidosis. *Respiration.* 2000;67:389–396. doi:10.1159/000029536
32. Jeny F, Pacheco Y, Besnard V, Valeyre D, Bernaudin J-F. Experimental models of sarcoidosis. *Curr Opin Pulm Med.* 2016;22:492–499. doi:10.1097/MCP.0000000000000295
33. Huizar I, Malur A, Midgette YA. Novel murine model of chronic granulomatous lung inflammation elicited by carbon nanotubes. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011;45:858–866. doi:10.1165/rcmb.2010-0401OC
34. Malur A, Barna BP. Exposure to a mycobacterial antigen, ESAT-6, exacerbates granulomatous and fibrotic changes in a multiwall carbon nanotube model of chronic pulmonary disease. *J Nanomed Nanotechnol.* 2015;06:777–783. doi:10.4172/2157-7439.1000340

35. James AJ, Reinius LE, Verhoek M. Increased YKL-40 and chitotriosidase in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016;193:131–142. doi:10.1164/rccm.201504-0760OC
36. Tong X, Wang D, Liu S. International journal of COPD dovepress the YKL-40 protein is a potential biomarker for COPD: a meta-analysis and systematic review. *Int J COPD.* 2018;13:409–418. doi:10.2147/COPD.S152655
37. Zhou Y, Peng H, Sun H. Chitinase 3-like 1 suppresses injury and promotes fibroproliferative responses in mammalian lung fibrosis. *Sci Transl Med.* 2014;6:240ra76. doi:10.1126/scitranslmed.3007096
38. Uysal P, Durmus S, Sozer V. YKL-40, soluble IL-2 receptor, angiotensin converting enzyme and C-reactive protein: comparison of markers of sarcoidosis activity. *Biomolecules.* 2018;8:84. doi:10.3390/biom8030084
39. Rose CE, Sung SSSJ, Fu SM. Significant involvement of CCL2 (MCP-1) in inflammatory disorders of the lung. *Microcirculation.* 2003;10:273–288. doi:10.1080/mic.10.3-4.273.288
40. Palchevskiy V, Hashemi N, Weigt SS. Immune response CC chemokines CCL2 and CCL5 are associated with pulmonary sarcoidosis. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2011;4. doi:10.1186/1755-1536-4-10
41. Hamsten C, Wiklundh E, Grönlund H. Elevated levels of FN1 and CCL2 in bronchoalveolar lavage fluid from sarcoidosis patients. *Respir Res.* 2016;17:69. doi:10.1186/s12931-016-0381-0
42. Icer MA, Gezmen-Karadag M. The multiple functions and mechanisms of osteopontin. *Clin Biochem.* 2018;59:17–24. doi:10.1016/j.clinbiochem.2018.07.003
43. Lavi H, Assayag M, Schwartz A. The association between osteopontin gene polymorphisms, osteopontin expression and sarcoidosis. *PLoS One.* 2017;12:e0171945. doi:10.1371/journal.pone.0171945
44. Carlson I, Tognazzi K, Manseau EJ, Dvorak HF, Brown LF. Osteopontin is strongly expressed by histiocytes in granulomas of diverse etiology. *Lab Invest.* 1997;77:103–108.

Journal of Inflammation Research

Dovepress

## Publish your work in this journal

The Journal of Inflammation Research is an international, peer-reviewed open-access journal that welcomes laboratory and clinical findings on the molecular basis, cell biology and pharmacology of inflammation including original research, reviews, symposium reports, hypothesis formation and commentaries on: acute/chronic inflammation; mediators of inflammation; cellular processes; molecular mechanisms; pharmacology and novel anti-inflammatory drugs; clinical conditions involving inflammation. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Submit your manuscript here: <https://www.dovepress.com/journal-of-inflammation-research-journal>

## 8 Podsumowanie wyników

Publikacje stanowiące podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej obejmują cykl badań naukowych poświęconych ekspresji chitynaz w materiale od chorych na sarkoidozę i idiopatyczne włóknienie płuc oraz ukierunkowanych na identyfikację inhibitora CHIT1 mogącego stanowić nową terapię w leczeniu wybranych śródmiąższowych chorób płuc. W odleglejszej perspektywie, zastosowanie celowanej terapii o nowym mechanizmie działania opartym o inhibicję CHIT1 mogłoby skutkować korzystnymi efektami terapeutycznymi u chorych ze śródmiąższowymi chorobami płuc.

Badania zaprezentowane w pracy „*Discovery of OATD-01, a first-in-class chitinase inhibitor as potential new therapeutics for idiopathic pulmonary fibrosis*” pozwoliły na identyfikację oraz charakterystykę pod kątem farmakokinetycznym i farmakologicznym nowego inhibitora CHIT1 OATD-01. W publikacji tej opisany został proces strukturalnych modyfikacji wcześniej odkrytego inhibitora chitynaz, które doprowadziły do otrzymania związku OATD-01 charakteryzującego się doskonałym profilem farmakokinetycznym u różnych gatunków ssaków (gryzoni i psów), a także selektywnością względem panelu białek różnych od CHIT1 (ang. *off-targets*). Inhibitor ten wykazał się znaczącą ekspozycją w mysich płucach, a wysokie stężenie związku w tej tkance korelowało z efektem farmakodynamicznym, czyli z inhibicją aktywności chitynolitycznej. Co więcej, związek OATD-01 wykazał działanie przeciwwłóknieniowe w mysim modelu włóknienia płuc indukowanego bleomycyną po podaniu dożołądkowym w dawkach 30 i 100 mg/kg masy ciała.

W publikacji „*Inhibition of CHIT1 as a novel therapeutic approach in idiopathic pulmonary fibrosis*” wykazaliśmy, że u chorych na idiopatyczne włóknienie płuc aktywność oraz stężenie CHIT1 w surowicy i indukowanej plwocinie jest odpowiednio trzy i czterokrotnie wyższe niż w grupie kontrolnej. Przedstawiona analiza ekspresji genu *CHIT1* wykazała, że gen ten jest jednym z markerów subpopulacji profibrotycznych makrofagów płuc występującej tylko u chorych ze śródmiąższowymi chorobami płuc. Inhibitor OATD-01 efektywnie hamował *ex vivo* aktywność chitynaz w surowicy, indukowanej plwocinie i BALf pobranych od pacjentów z idiopatycznym włóknieniem płuc, jak również *in vitro* wpływał na sekrecję wybranych prozapalnych mediatorów przez makrofagi wyizolowane z BALf od chorych. Równolegle przeprowadzone badania wykorzystujące przedkliniczny myszy model włóknienia płuc wywołany bleomycyną wykazały, że zastosowanie inhibitora OATD-01 w terapeutycznym schemacie leczenia prowadzi do znacznego ograniczenia włóknienia w płucach zwierząt leczonych w porównaniu do grupy kontrolnej, której podawano nośnik. Ograniczenie włóknienia płuc (jak oceniono metodą wykorzystującą zmodyfikowaną punktację Ashcrofta) po podaniu inhibitora CHIT1 było zbliżone do efektu zastosowania związku referencyjnego – pirfenidonu. Podobny efekt przeciwwłóknieniowy (obserwowany zarówno w analizie histologicznej tkanki płuc jak i na poziomie ekspresji genów

profibrotycznych białek w płucach) zademonstrowano także w tym modelu, gdy wykorzystano w nim zwierzęta z wyłączonym genem *Chit1*.

Badania zaprezentowane w publikacji "*Pharmacological inhibition of chitotriosidase (CHIT1) as a novel therapeutic approach for sarcoidosis*" wskazały na znaczące podwyższenie aktywności oraz poziomu CHIT1 u pacjentów z sarkoidozą w porównaniu do grupy kontrolnej. Barwienie immunohistochemiczne preparatów biopsyjnych węzłów chłonnych śródpiersia i błony śluzowej oskrzeli chorych na sarkoidozę wskazało, że zmiany ziarniniakowe obecne w materiale biopsyjnym wykazują silną ekspresję CHIT1 w przeciwieństwie do fragmentów zdrowej tkanki bez zmian patologicznych pochodzących od tych samych chorych. Ocena histopatologiczna pozwoliła określić, że to makrofagi oraz pochodzące z nich komórki nabłonkowe (histiocyty) oraz wielojądrzaste komórki olbrzymie są komórkami, które charakteryzują się najsilniejszym barwieniem przeciwciałami skierowanymi przeciwko CHIT1. Inhibitor OATD-01 w nanomolowych stężeniach hamował *ex vivo* aktywność chitynaz w surowicy oraz BALf pobranych od pacjentów z sarkoidozą. Zaobserwowano również, że inkubacja makrofagów wyizolowanych z BALf chorych ze związkiem OATD-01 w stężeniu 1  $\mu$ M powodowała zmniejszenie stężenia wybranych prozapalnych mediatorów wydzielanych do pożywki hodowlanej. Badania z wykorzystaniem przedklinicznego mysiego modelu chronicznego zapalenia ziarniakowego płuc wywołanego podaniem wielościennych nanorurek węglowych wraz z syntetycznym peptydem ESAT-6 z *Mycobacterium tuberculosis* wykazały, że zastosowanie inhibitora OATD-01 w terapeutycznym schemacie leczenia, w dawce 100 mg/kg, prowadzi do ograniczenia liczby zmian ziarniakowych w płucach w porównaniu do grupy kontrolnej, której podawano nośnik. W mysim modelu ostrego zapalenia ziarniniakowego OATD-01 podany w dawce 100 mg/kg wykazał działanie przeciwzapalne, manifestujące się poprzez zmniejszenie liczby neutrofilów jak i stężenia chemokiny CCL4 (ang. *CC motive chemokine ligand 4*) w BALf.



## 9 Wnioski

Zastosowanie metod badawczych obejmujących analizy biochemiczne i immunohistochemiczne pozwoliło na odpowiednie scharakteryzowanie aktywności i ekspresji chitynaz w materiale klinicznym od pacjentów z wybranymi śródmiąższowymi chorobami płuc, a szereg opracowanych testów enzymatycznych komórkowych oraz przedklinicznych modeli zwierzęcych pozwolił na identyfikację i określenie właściwości farmakologicznych OATD-01 - nowego drobnocząsteczkowego inhibitora CHIT1.

Szczegółowe wnioski przedstawiają się następująco:

1. U pacjentów z idiopatycznym włóknieniem płuc obserwuje się znaczące podwyższenie aktywności i poziomu CHIT1 w surowicy i indukowanej plwocinie, a gen CHIT1 stanowi marker subpopulacji profibrotycznych makrofagów charakterystycznych dla chorych ze śródmiąższowymi chorobami płuc.
2. Sarkoidozę charakteryzuje znacznie podwyższona aktywność chitynolityczna oraz stężenie CHIT1 w surowicy, jak również silna ekspresja CHIT1 w patologicznych zmianach ziarniniakowych obserwowanych w preparatach biopsyjnych węzłów chłonnych śródpiersia i błony śluzowej oskrzeli.
3. OATD-01 jest nowym inhibitorem CHIT1 o pożądanym profilu farmakokinetycznym, farmakodynamicznym i farmakologicznym, o potencjalnym zastosowaniu w leczeniu idiopatycznego włóknienia płuc oraz sarkoidozy.
4. OATD-01 jest efektywny *in vitro* i wpływa na zmniejszenie sekrecji prozapalnych mediatorów przez makrofagi wyizolowane z BALf chorych na idiopatyczne włóknienie płuc i sarkoidozę.
5. Inhibitor OATD-01 wykazuje efektywność terapeutyczną w mysich modelach włóknienia płuc i zapalenia ziarniniakowego w płucach, w których to modelach podanie inhibitora wpłynęło, odpowiednio, na ograniczenie stopnia włóknienia oraz zmniejszenie liczby patologicznych zmian ziarniniakowych w płucach.

## 10 Piśmiennictwo do rozdziałów w języku polskim

Van Aalten, D.M.F., Komander, D., Synstad, B., Gåseidnes, S., Peter, M.G., Eijnsink, V.G.H. (2001) Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **98**(16), 8979–8984.

Adams, T.S., Schupp, J.C., Poli, S., Ayoub, E.A., Neumark, N., Ahangari, F., Chu, S.G., Raby, B.A., Deluliis, G., Januszyk, M., Duan, Q., Arnett, H.A., Siddiqui, A., Washko, G.R., Homer, R., Yan, X., Rosas, I.O., Kaminski, N. (2020) Single-cell RNA-seq reveals ectopic and aberrant lung-resident cell populations in idiopathic pulmonary fibrosis. *Science Advances*. **6**(28).

Adegunsoye, A., Ryerson, C.J. (2021) Diagnostic Classification of Interstitial Lung Disease in Clinical Practice. *Clinics in Chest Medicine*. **42**(2), 251–261.

Adrangi, S., Faramarzi, M.A. (2013) From bacteria to human: A journey into the world of chitinases. *Biotechnology Advances*. **31**(8), 1786–1785.

Aguilera, B., Vlugt, K.G. Der, Helmond, M.T.J., Out, J.M.M., Donker-koopman, W.E., Groener, J.E.M., Boot, R.G., Renkema, G.H., Marel, G.A. Van Der, Boom, J.H. Van, Overkleeft, H.S., Aerts, J.M.F.G. (2003) Transglycosidase Activity of Chitotriosidase. *The Journal of Biological Chemistry*. **278**(42), 40911–40916.

Arai, N., Shiomi, K., Iwai, Y., Omura, S. (2000) Argifin, a New Chitinase Inhibitor, Produced by *Gliocladium* sp. FTD-0668. II. Isolation, Physico-chemical Properties, and Structure Elucidation. *The Journal of Antibiotics*. **53**(6), 609–614.

Arai, N., Shiomi, K., Yamaguchi, Y., Masuma, R., Iwai, Y., Turberg, A., Kolbl, H., Omura, S. (2000) Argadin, a New Chitinase Inhibitor, Produced by *Clonostachys* sp. FO-7314. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **48**(10), 1442–1446.

Arkema, E. V., Grunewald, J., Kullberg, S., Eklund, A., Askling, J. (2016) Sarcoidosis incidence and prevalence: A nationwide register-based assessment in Sweden. *European Respiratory Journal*. **48**(6), 1690–1699.

Bargagli, E., Bennett, D., Maggiorelli, C., Di Sipio, P., Margollicci, M., Bianchi, N., Rottoli, P. (2013) Human chitotriosidase: A sensitive biomarker of sarcoidosis. *Journal of Clinical Immunology*. **33**(1), 264–270.

Bargagli, E., Margollicci, M., Luddi, A., Nikiforakis, N., Grazia Perari, M., Grosso, S., Perrone, A., Rottoli, P. (2007) Chitotriosidase activity in patients with interstitial lung diseases. *Respiratory Medicine*.

101(10), 2176–2181.

Baughman, R.P., Culver, D.A., Judson, M.A. (2011) A concise review of pulmonary sarcoidosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **183**(5), 573–581.

Baughman, R.P., Field, S., Costabel, U., Crystal, R.G., Culver, D.A., Drent, M., Judson, M.A., Wolff, G. (2016) Sarcoidosis in America. Analysis Based on Health Care Use. *Annals of the American Thoracic Society*. **13**(8), 1244–1252.

Baughman, R.P., Grutters, J.C. (2015) New treatment strategies for pulmonary sarcoidosis: Antimetabolites, biological drugs, and other treatment approaches. *The Lancet Respiratory Medicine*. **3**(10), 813–822.

Baughman, R.P., Valeyre, D., Korsten, P., Mathioudakis, A.G., Wuyts, W.A., Wells, A., Rottoli, P., Nunes, H., Lower, E.E., Judson, M.A., Israel-Biet, D., Grutters, J.C., Drent, M., Culver, D.A., Bonella, F., Antoniou, K., Martone, F., Quadder, B., Spitzer, G., Nagavci, B., Tonia, T., Rigau, D., Ouellette, D.R. (2021) ERS clinical practice guidelines on treatment of sarcoidosis. *European Respiratory Journal*. **58**(6).

Bennett, D., Cameli, P., Lanzarone, N., Carobene, L., Bianchi, N., Fui, A., Rizzi, L., Bergantini, L., Cillis, G., Miriana, D.A., Mazzei, M.A., Refini, R.M., Sestini, P., Bargagli, E., Rottoli, P. (2020) Chitotriosidase: A biomarker of activity and severity in patients with sarcoidosis. *Respiratory Research*. **21**(1).

Boot, R.G., Blommaart, E.F.C., Swart, E., Ghauharali-van der Vlugt, K., Bijl, N., Moe, C., Place, A., Aerts, J.M.F.G. (2001) Identification of a Novel Acidic Mammalian Chitinase Distinct from Chitotriosidase. *Journal of Biological Chemistry*. **276**(9), 6770–6778.

Boot, R.G., Hollak, C.E.M., Verhoek, M., Alberts, C., Jonkers, R.E., Aerts, J.M. (2010) Plasma chitotriosidase and CCL18 as surrogate markers for granulomatous macrophages in sarcoidosis. *Clinica Chimica Acta*. **411**(1–2), 31–36.

Boot, R.G., Renkema, G.H., Verhock, M., Strijland, A., Bliet, J., De Meulemeester, T.M.A.M.O., Mannens, M.M.A.M., Aerts, J.M.F.G. (1998) The human chitotriosidase gene - Nature of inherited enzyme deficiency. *Journal of Biological Chemistry*. **273**(40), 25680–25685.

Cole, D.C., Olland, A.M., Jacob, J., Brooks, J., Bursavich, M.G., Czerwinski, R., Declercq, C., Johnson, M., Joseph-Mccarthy, D., Ellingboe, J.W., Lin, L., Nowak, P., Presman, E., Strand, J., Tam, A., Williams, C.M.M., Yao, S., Tsao, D.H.H., Fitz, L.J. (2010) Identification and characterization of acidic mammalian chitinase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*. **53**(16), 6122–6128.

Crouser, E.D., White, P., Caceres, E.G., Julian, M.W., Papp, A.C., Locke, L.W., Sadee, W., Schlesinger, L.S. (2017) A novel in vitro human granuloma model of sarcoidosis and latent tuberculosis infection. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. **57**(4), 487–498.

Duchemann, B., Annesi-Maesano, I., Jacobe de Naurois, C., Sanyal, S., Brillet, P.-Y., Brauner, M., Kambouchner, M., Huynh, S., Naccache, J.M., Borie, R., Piquet, J., Mekinian, A., Virally, J., Uzunhan, Y., Cadranel, J., Crestani, B., Fain, O., Lhote, F., Dhote, R., Saidenberg-Kermanac'h, N., Rosental, P.-A., Valeyre, D., Nunes, H. (2017) Prevalence and incidence of interstitial lung diseases in a multi-ethnic county of Greater Paris. *European Respiratory Journal*. **50**(2), 1602419.

van Eijk, M., van Roomen, C.P. a. a., Renkema, G.H., Bussink, A.P., Andrews, L., Blommaart, E.F.C., Sugar, A., Verhoeven, A.J., Boot, R.G., Aerts, J.M.F.G. (2005) Characterization of human phagocyte-derived chitotriosidase, a component of innate immunity. *International Immunology*. **17**(11), 1505–1512.

Fadel, F., Zhao, Y., Cachau, R., Cousido-Siah, A., Ruiz, F.X., Harlos, K., Howard, E., Mitschler, A., Podjarny, A. (2015) New insights into the enzymatic mechanism of human chitotriosidase (CHIT1) catalytic domain by atomic resolution X-ray diffraction and hybrid QM/MM. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. **71**, 1455–1470.

Fadel, F., Zhao, Y., Cousido-Siah, A., Ruiz, F.X., Mitschler, A., Podjarny, A. (2016) X-Ray crystal structure of the full length human chitotriosidase (CHIT1) reveals features of its chitin binding domain. *PLoS ONE*. **11**(4), 1–15.

Di Francesco, A.M., Verrecchia, E., Sicignano, L.L., Massaro, M.G., Antuzzi, D., Covino, M., Pasciuto, G., Richeldi, L., Manna, R. (2021) The Use of Chitotriosidase as a Marker of Active Sarcoidosis and in the Diagnosis of Fever of Unknown Origin (FUO). *Journal of Clinical Medicine*. **10**(22), 5283.

Gerke, A.K. (2020) Treatment of Sarcoidosis: A Multidisciplinary Approach. *Frontiers in Immunology*. **11**, 545413.

Grunewald, J., Grutters, J.C., Arkema, E. V., Saketkoo, L.A., Moller, D.R., Müller-Quernheim, J. (2019) Sarcoidosis. *Nature Reviews Disease Primers*. **5**(1), 45.

Harlander, M., Salobir, B., Zupančič, M., Dolenshek, M., Bavčar Vodovnik, T., Terčelj, M. (2014) Serial chitotriosidase measurements in sarcoidosis - Two to five year follow-up study. *Respiratory Medicine*. **108**(5), 775–782.

Hopkins, R.B., Burke, N., Fell, C., Dion, G., Kolb, M. (2016) Epidemiology and survival of idiopathic

pulmonary fibrosis from national data in Canada. *European Respiratory Journal*. **48**(1), 187–195.

James, A.J., Reinius, L.E., Verhoek, M., Gomes, A., Kupczyk, M., Hammar, U., Ono, J., Ohta, S., Izuhara, K., Bel, E., Kere, J., Söderhäll, C., Dahlén, B., Boot, R.G., Dahlén, S.E., Gaga, M., Siafakas, N.M., Papi, A., Fabbri, L.M., Joos, G., Brusselle, G., Rabe, K.F., Kanniss, F., Hiemstra, P., Johnston, S.L., Chanez, P., Vachier, I., Gjomarkaj, M., Sterk, P.J., Howarth, P.H., Nizankowska-Mogilnicka, E., Middelveld, R., Holgate, S.T., Wilson, S. (2016) Increased YKL-40 and chitotriosidase in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **193**(2), 131–142.

Jeny, F., Bouvry, D., Freynet, O., Soussan, M., Brauner, M., Planes, C., Nunes, H., Valeyre, D. (2016) Management of sarcoidosis in clinical practice. *European Respiratory Review*. **25**(140), 141–150.

Kreuter, M., Swigris, J., Pittrow, D., Geier, S., Klotsche, J., Prasse, A., Wirtz, H., Koschel, D., Andreas, S., Claussen, M., Grohé, C., Wilkens, H., Hagemeyer, L., Skowasch, D., Meyer, J.F., Kirschner, J., Gläser, S., Herth, F.J.F., Welte, T., Neurohr, C., Schwaiblmair, M., Held, M., Bahmer, T., Frankenberger, M., Behr, J. (2017) Health related quality of life in patients with idiopathic pulmonary fibrosis in clinical practice: insights-IPF registry. *Respiratory Research*. **18**(1), 139.

Kuusk, S., Sørli, M., Väljamäe, P. (2017) Human Chitotriosidase Is an Endo-Processive Enzyme. G. Maga, red. *PloS one*. **12**(1), e0171042.

Kzhyshkowska, J., Larionova, I., Liu, T. (2020) YKL-39 as a Potential New Target for Anti-Angiogenic Therapy in Cancer. *Frontiers in Immunology*. **10**(January), 1–10.

Larsen, T., Yoshimura, Y., Voldborg, B.G.R., Cazzamali, G., Bovin, N. V., Westerlind, U., Palcic, M.M., Leisner, J.J. (2014) Human chitotriosidase CHIT1 cross reacts with mammalian-like substrates. *FEBS Letters*. **588**(5), 746–751.

Lee, C.-M., He, C.-H., Park, J.W., Lee, J.H., Kamle, S., Ma, B., Akosman, B., Cotez, R., Chen, E., Zhou, Y., Herzog, E.L., Ryu, C., Peng, X., Rosas, I.O., Poli, S., Bostwick, C.F., Choi, A.M., Elias, J.A., Lee, C.G. (2019) Chitinase 1 regulates pulmonary fibrosis by modulating TGF- $\beta$ /SMAD7 pathway via TGFBRAP1 and FOXO3. *Life Science Alliance*. **2**(3), e201900350.

Lee, C.G., Herzog, E.L., Ahangari, F., Zhou, Y., Gulati, M., Lee, C.-M., Peng, X., Feghali-Bostwick, C., Jimenez, S. a., Varga, J., Elias, J. a. (2012) Chitinase 1 Is a Biomarker for and Therapeutic Target in Scleroderma-Associated Interstitial Lung Disease That Augments TGF- 1 Signaling. *The Journal of Immunology*. **189**(5), 2635–2644.

Lee, J.-H., Lee, C.-M., Lee, J.H., Kim, M.-O., Park, J.W., Kamle, S., Akosman, B., Herzog, E.L., Peng, X.Y.,

Elias, J.A., Lee, C.G. (2022) Kasugamycin Is a Novel Chitinase 1 Inhibitor with Strong Antifibrotic Effects on Pulmonary Fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. **67**(3), 309–319.

Ley, B., Collard, H.R., King, T.E. (2011) Clinical Course and Prediction of Survival in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **183**(4), 431–440.

Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J. (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **46**(1–3), 3–26.

Majewski, S., Szewczyk, K., Jerczyńska, H., Miłkowska-Dymanowska, J., Białas, A.J., Gwadera, Ł., Piotrowski, W.J. (2022) Longitudinal and Comparative Measures of Serum Chitotriosidase and YKL-40 in Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Frontiers in Immunology*. **13**, 1.

Malaguarnera, L., Di Rosa, M., Zambito, a M., Dell’Ombra, N., Nicoletti, F., Malaguarnera, M. (2006) Chitotriosidase gene expression in Kupffer cells from patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*. **55**, 1313–1320.

Malaguarnera, L., Simporè, J., Prodi, D.A., Angius, A., Sassu, A., Persico, I., Barone, R., Musumeci, S. (2003) A 24-bp duplication in exon 10 of human chitotriosidase gene from the sub-Saharan to the Mediterranean area: role of parasitic diseases and environmental conditions. *Genes and immunity*. **4**(8), 570–574.

Martinez, F.J., Collard, H.R., Pardo, A., Raghu, G., Richeldi, L., Selman, M., Swigris, J.J., Taniguchi, H., Wells, A.U. (2017) Idiopathic pulmonary fibrosis. *Nature Reviews Disease Primers 2017 3:1*. **3**(1), 1–19.

Mazur, M., Bartoszewicz, A., Dymek, B., Salamon, M., Andryianau, G., Kowalski, M., Olejniczak, S., Matyszewski, K., Pluta, E., Borek, B., Stefaniak, F., Zagodzón, A., Mazurkiewicz, M., Koralewski, R., Czestkowski, W., Piotrowicz, M., Niedziejko, P., Gruza, M.M., Dzwonek, K., Golebiowski, A., Golab, J., Olczak, J. (2018) Discovery of selective, orally bioavailable inhibitor of mouse chitotriosidase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **28**(3), 310–314.

Mazur, M., Dymek, B., Koralewski, R., Sklepkiwicz, P., Olejniczak, S., Mazurkiewicz, M., Piotrowicz, M., Salamon, M., Jędrzejczak, K., Zagodzón, A., Czestkowski, W., Matyszewski, K., Borek, B., Bartoszewicz, A., Pluta, E., Rymaszewska, A., Mozga, W., Stefaniak, F., Dobrzański, P., Dzwonek, K., Golab, J., Golebiowski, A., Olczak, J. (2019) Development of Dual Chitinase Inhibitors as Potential New Treatment for Respiratory System Diseases. *Journal of Medicinal Chemistry*. **62**(15), 7126–7145.

Mazur, M., Olczak, J., Olejniczak, S., Koralewski, R., Czestkowski, W., Jędrzejczak, A., Golab, J.,



- Dzwonek, K., Dymek, B., Sklepkiwicz, P.L., Zagodzón, A., Noonan, T., Mahboubi, K., Conway, B., Sheeler, R., Beckett, P., Hungerford, W.M., Podjarny, A., Mitschler, A., Cousido-Siah, A., Fadel, F., Golebiowski, A. (2018) Targeting Acidic Mammalian chitinase Is Effective in Animal Model of Asthma. *Journal of Medicinal Chemistry*. **61**(3), 695–710.
- Nunes, H., Jeny, F., Bouvry, D., Uzunhan, Y., Valeyre, D. (2019) Indications for treatment of sarcoidosis. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. **25**(5), 505–518.
- Przysucha, N., Górska, K., Krenke, R. (2020) Chitinases and Chitinase-Like Proteins in Obstructive Lung Diseases – Current Concepts and Potential Applications. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. **15**, 885–899.
- Qi, H., Jiang, X., Ding, Y., Liu, T., Yang, Q. (2021) Discovery of Kasugamycin as a Potent Inhibitor of Glycoside Hydrolase Family 18 Chitinases. *Frontiers in Molecular Biosciences*. **8**, 111.
- Raghu, G., Chen, S.-Y., Hou, Q., Yeh, W.-S., Collard, H.R. (2016) Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis in US adults 18–64 years old. *European Respiratory Journal*. **48**(1), 179–186.
- Rao, F. V., Andersen, O.A., Vora, K.A., DeMartino, J.A., Van Aalten, D.M.F. (2005) Methylxanthine drugs are chitinase inhibitors: investigation of inhibition and binding modes. *Chemistry & biology*. **12**(9), 973–980.
- Rao, F. V., Houston, D.R., Boot, R.G., Aerts, J.M.F.G., Hodgkinson, M., Adams, D.J., Shiomi, K., Omura, S., Van Aalten, D.M.F. (2005) Specificity and affinity of natural product cyclopentapeptide inhibitors against *A. fumigatus*, human, and bacterial chitinases. *Chemistry and Biology*. **12**(1), 65–76.
- Renkema, G.H., Boot, R.G., Strijland, a, Donker-Koopman, W.E., van den Berg, M., Muijsers, a O., Aerts, J.M. (1997) Synthesis, sorting, and processing into distinct isoforms of human macrophage chitotriosidase. *European journal of biochemistry / FEBS*. **244**(2), 279–85.
- Richeldi, L., Collard, H.R., Jones, M.G. (2017) Idiopathic pulmonary fibrosis. *The Lancet*. **389**(10082), 1941–1952.
- Di Rosa, M., Malaguarnera, G., De Gregorio, C., Drago, F., Malaguarnera, L. (2013) Evaluation of CHI3L-1 and CHIT-1 expression in differentiated and polarized macrophages. *Inflammation*. **36**(2), 482–492.
- Ryerson, C.J., Collard, H.R. (2013) Update on the diagnosis and classification of ILD. *Current opinion in pulmonary medicine*. **19**(5), 453–459.
- Sakthivel, P., Bruder, D. (2017) Mechanism of granuloma formation in sarcoidosis. *Current Opinion in*

*Hematology*. **24**(1), 59–65.

Sakuda, S., Isogai, A., Matsumoto, S., Suzuki, A. (1987) Search for microbial insect growth regulators. II Allosamidin, a novel insect chitinase inhibitor. *The Journal of Antibiotics*. **40**(3), 296–300.

Schüttelkopf, A.W., Andersen, O. a., Rao, F. V., Allwood, M., Rush, C.L., Eggleston, I.M., van Aalten, D.M.F. (2011) Bisdionin C-a rationally designed, submicromolar inhibitor of family 18 chitinases. *ACS medicinal chemistry letters*. **2**(6), 428–32.

Seibold, M. a., Donnelly, S., Solon, M., Innes, A., Woodruff, P.G., Boot, R.G., Burchard, E.G., Fahy, J. V. (2008) Chitotriosidase is the primary active chitinase in the human lung and is modulated by genotype and smoking habit. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **122**(5), 944–950.

Sellarés, J., Francesqui, J., Llabres, M., Hernandez-Gonzalez, F., Baughman, R.P. (2020) Current treatment of sarcoidosis. *Current opinion in pulmonary medicine*. **26**(5), 591–597.

Spagnolo, P., Rossi, G., Trisolini, R., Sverzellati, N., Baughman, R.P., Wells, A.U. (2018) Pulmonary sarcoidosis. *The Lancet Respiratory Medicine*. **6**(5), 389–402.

Strongman, H., Kausar, I., Maher, T.M. (2018) Incidence, Prevalence, and Survival of Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis in the UK. *Advances in Therapy*. **35**(5), 724–736.

Sutherland, T.E., Andersen, O. a., Betou, M., Eggleston, I.M., Maizels, R.M., Van Aalten, D., Allen, J.E. (2011) Analyzing airway inflammation with chemical biology: Dissection of acidic mammalian chitinase function with a selective drug-like inhibitor. *Chemistry and Biology*. **18**(5), 569–579.

Travis, W.D., Costabel, U., Hansell, D.M., King, T.E., Lynch, D.A., Nicholson, A.G., Ryerson, C.J., Ryu, J.H., Selman, M., Wells, A.U., Behr, J., Bouros, D., Brown, K.K., Colby, T. V., Collard, H.R., Cordeiro, C.R., Cottin, V., Crestani, B., Drent, M., Dudden, R.F., Egan, J., Flaherty, K., Hogaboam, C., Inoue, Y., Johkoh, T., Kim, D.S., Kitaichi, M., Loyd, J., Martinez, F.J., Myers, J., Protzko, S., Raghu, G., Richeldi, L., Sverzellati, N., Swigris, J., Valeyre, D. (2013) An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **188**(6), 733–748.

Wijsenbeek, M., Cottin, V. (2020) Spectrum of Fibrotic Lung Diseases. *New England Journal of Medicine*. **383**(10), 958–968.

Wijsenbeek, M., Suzuki, A., Maher, T.M. (2022) Interstitial lung diseases. *The Lancet*. **400**(10354), 769–786.

Wollin, L., Wex, E., Pautsch, A., Schnapp, G., Hostettler, K.E., Stowasser, S., Kolb, M. (2015) Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal*. **45**(5), 1434–1445.

Wolters, P.J., Collard, H.R., Jones, K.D. (2014) Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. **9**(1), 157–179.

Yoon, H.-Y., Kim, H.M., Kim, Y.-J., Song, J.W. (2018) Prevalence and incidence of sarcoidosis in Korea: a nationwide population-based study. *Respiratory Research*. **19**(1), 158.

Zhu, Z., Zheng, T., Homer, R.J., Kim, Y.K., Chen, N.Y., Cohn, L., Hamid, Q., Elias, J.A. (2004) Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. *Science*. **304**(5677), 1678–1682.

Zissel, G., Müller-Quernheim, J. (2015) Cellular Players in the Immunopathogenesis of Sarcoidosis. *Clinics in Chest Medicine*. **36**(4), 549–560.

## 11 Oświadczenia współautorów

Warszawa, 15.09.2022

Mgr Robert Koralewski

### Oświadczenie

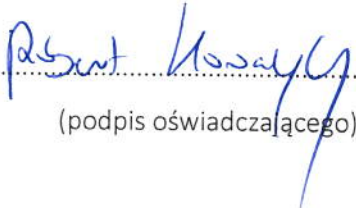
Jako współautor pracy pt. *„Discovery of OATD-01, a First-in-Class Chitinase Inhibitor as Potential New Therapeutics for Idiopathic Pulmonary Fibrosis”* J Med Chem. 2020 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: syntezę chemiczną, konceptualizację syntezy chemicznej, interpretację danych biologicznych i ich analizę oraz budowanie zależności struktura-aktywność, przygotowanie i poprawki manuskryptu.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 25%. Obejmował on: planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jako współautor pracy pt. *„Inhibition of CHIT1 as a novel therapeutic approach in idiopathic pulmonary fibrosis”* Eur J Pharmacol. 2022 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: syntezę chemiczną.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 40%. Obejmował on: opracowanie koncepcji i metodologii badania, planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, analizę statystyczną, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.

  
(podpis oświadczającego)

Warszawa, 19.09.2022

Mgr Marzena Mazur

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. „*Discovery of OATD-01, a First-in-Class Chitinase Inhibitor as Potential New Therapeutics for Idiopathic Pulmonary Fibrosis*” J Med Chem. 2020 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: syntezę chemiczną, konceptualizację syntezy chemicznej, analizę wyników, przygotowanie i poprawki manuskryptu.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 25%. Obejmował on: planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostatecznie poprawki.

Jako współautor pracy pt. „*Inhibition of CHIT1 as a novel therapeutic approach in idiopathic pulmonary fibrosis*” Eur J Pharmacol. 2022 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: syntezę chemiczną.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 40%. Obejmował on: opracowanie koncepcji i metodologii badania, planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, analizę statystyczną, przygotowanie manuskryptu, ostatecznie poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.

*Marzena Mazur*

(podpis oświadczającego)

Warszawa, 20.09.2022

Dr Piotr Sklepkiewicz

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. „Discovery of OATD-01, a First-in-Class Chitinase Inhibitor as Potential New Therapeutics for Idiopathic Pulmonary Fibrosis” J Med Chem. 2020 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: planowanie i przeprowadzenie doświadczeń, analiza i interpretacja danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 25%. Obejmował on: planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jako współautor pracy pt. „Inhibition of CHIT1 as a novel therapeutic approach in idiopathic pulmonary fibrosis” Eur J Pharmacol. 2022 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: opracowanie koncepcji i metodologii badania, planowanie i przeprowadzenie doświadczeń, analizę i interpretację danych, analizę statystyczną, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 40%. Obejmował on: opracowanie koncepcji i metodologii badania, planowanie i przeprowadzenie doświadczeń, analizę i interpretację danych, analizę statystyczną, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jako współautor pracy pt. „Pharmacological inhibition of chitotriosidase (CHIT1) as a novel therapeutic approach for sarcoidosis” J Inflamm Res. 2022 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: opracowanie koncepcji i metodologii badania, planowanie i przeprowadzenie doświadczeń, analizę i interpretację danych, ostateczne poprawki.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 60%. Obejmował on: opracowanie koncepcji i metodologii badania, planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, analizę statystyczną, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.

*Piotr Sklepkiewicz*

(podpis oświadczającego)



Warszawa, 20.09.2022

Mgr Sylwia Olejniczak

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. „*Discovery of OATD-01, a First-in-Class Chitinase Inhibitor as Potential New Therapeutics for Idiopathic Pulmonary Fibrosis*” J Med Chem. 2020 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: syntezę chemiczną, konceptualizację syntezy chemicznej, analizę i interpretację wyników.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 25%. Obejmował on: planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.

  
(podpis oświadczającego)

Warszawa, 20.09.2022

Wojciech Czestkowski

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. „*Discovery of OATD-01, a First-in-Class Chitinase Inhibitor as Potential New Therapeutics for Idiopathic Pulmonary Fibrosis*” J Med Chem. 2020 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: syntezę chemiczną, konceptualizację syntezy chemicznej, analizę i interpretację wyników.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 25%. Obejmował on: planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.



(podpis oświadczającego)

Warszawa, 20.09.2022

Krzysztof Matyszewski

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. „*Discovery of OATD-01, a First-in-Class Chitinase Inhibitor as Potential New Therapeutics for Idiopathic Pulmonary Fibrosis*” J Med Chem. 2020 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: syntezę chemiczną, konceptualizację syntezy chemicznej, analizę i interpretację wyników.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 25%. Obejmował on: planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.

  
.....

(podpis oświadczającego)

Irvine, California, USA, 19.09.2022

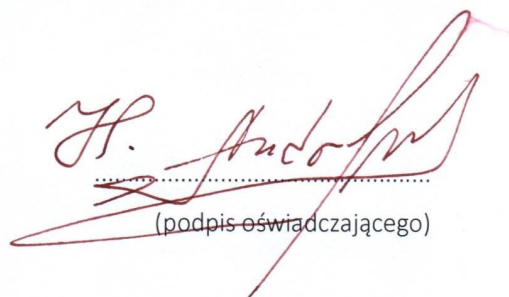
Mgr inż. Gleb Andryianau

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. „*Discovery of OATD-01, a First-in-Class Chitinase Inhibitor as Potential New Therapeutics for Idiopathic Pulmonary Fibrosis*” J Med Chem. 2020 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: syntezę chemiczną.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 25%. Obejmował on: planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.



(podpis oświadczającego)

Warszawa, 20.09.2022

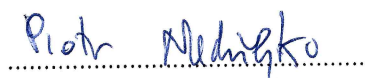
Dr Piotr Niedziejko

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. „*Discovery of OATD-01, a First-in-Class Chitinase Inhibitor as Potential New Therapeutics for Idiopathic Pulmonary Fibrosis*” J Med Chem. 2020 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: syntezę chemiczną, konceptualizację syntezy chemicznej, analizę i interpretację wyników.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 25%. Obejmował on: planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.



(podpis oświadczającego)

Warszawa, 20.09.2022

Dr Michał Kowalski

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. „*Discovery of OATD-01, a First-in-Class Chitinase Inhibitor as Potential New Therapeutics for Idiopathic Pulmonary Fibrosis*” J Med Chem. 2020 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: syntezę chemiczną, konceptualizację syntezy chemicznej, analizę i interpretację wyników.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 25%. Obejmował on: planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.



(podpis oświadczającego)

Warszawa, 20.09.2022

Dr Mariusz Gruza

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. „*Discovery of OATD-01, a First-in-Class Chitinase Inhibitor as Potential New Therapeutics for Idiopathic Pulmonary Fibrosis*” J Med Chem. 2020 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: syntezę chemiczną, konceptualizację syntezy chemicznej, analizę i interpretację wyników.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 25%. Obejmował on: planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.

  
(podpis oświadczającego)



Warszawa, 20.09.2022

Dr Bartłomiej Borek

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. „*Discovery of OATD-01, a First-in-Class Chitinase Inhibitor as Potential New Therapeutics for Idiopathic Pulmonary Fibrosis*” J Med Chem. 2020 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: syntezę chemiczną, konceptualizację syntezy chemicznej, analizę i interpretację wyników.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 25%. Obejmował on: planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.

  
.....  
(podpis oświadczającego)

Warszawa, 29.09.2022

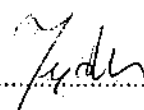
Karol Jędrzejczak

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. „*Discovery of OATD-01, a First-in-Class Chitinase Inhibitor as Potential New Therapeutics for Idiopathic Pulmonary Fibrosis*” J Med Chem. 2020 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: analitykę chemiczną, conceptualizację syntezy chemicznej, analizę i interpretację wyników.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 25%. Obejmował on: planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.

.....  
  
(podpis oświadczającego)

Warszawa, 20.09.2022

Dr Agnieszka Bartoszewicz

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. „*Discovery of OATD-01, a First-in-Class Chitinase Inhibitor as Potential New Therapeutics for Idiopathic Pulmonary Fibrosis*” J Med Chem. 2020 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: syntezę chemiczną, konceptualizację syntezy chemicznej, analizę i interpretację wyników.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 25%. Obejmował on: planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.



(podpis oświadczającego)

Warszawa, 19.09.2022

Dr Elżbieta Pluta

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. „*Discovery of OATD-01, a First-in-Class Chitinase Inhibitor as Potential New Therapeutics for Idiopathic Pulmonary Fibrosis*” J Med Chem. 2020 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: syntezę chemiczną i konceptualizację syntezy chemicznej.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 25%. Obejmował on: planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.

Elżbieta Pluta

  
(podpis oświadczającego)



Warszawa, 20.09.2022

Mgr inż. Aleksandra Rymaszewska

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. „Discovery of OATD-01, a First-in-Class Chitinase Inhibitor as Potential New Therapeutics for Idiopathic Pulmonary Fibrosis” J Med Chem. 2020 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: przeprowadzenie i analiza wyników testów enzymatycznych.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 25%. Obejmował on: planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

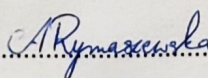
Jako współautor pracy pt. „Inhibition of CHIT1 as a novel therapeutic approach in idiopathic pulmonary fibrosis” Eur J Pharmacol. 2022 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 40%. Obejmował on: opracowanie koncepcji i metodologii badania, przeprowadzenie doświadczeń, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jako współautor pracy pt. „Pharmacological inhibition of chitotriosidase (CHIT1) as a novel therapeutic approach for sarcoidosis” J Inflamm Res. 2022 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 60%. Obejmował on: opracowanie koncepcji i metodologii badania, planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.

.....  


(podpis oświadczającego)

Warszawa, 19.09.2022

Dr Magdalena Kania

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. „*Discovery of OATD-01, a First-in-Class Chitinase Inhibitor as Potential New Therapeutics for Idiopathic Pulmonary Fibrosis*” J Med Chem. 2020 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: analiza i interpretacja danych farmakokinetycznych.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 25%. Obejmował on: planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.

*Magdalena Kania*

(podpis oświadczającego)

Warszawa, 19.09.2022

Dr Tomasz Rejczak

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. „*Discovery of OATD-01, a First-in-Class Chitinase Inhibitor as Potential New Therapeutics for Idiopathic Pulmonary Fibrosis*” *J Med Chem.* 2020 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: analiza i interpretacja danych farmakokinetycznych.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 25%. Obejmował on: planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.

*Tomasz Rejczak*.....

(podpis oświadczającego)



Warszawa, 19.09.2022

Dr Sylwia Piasecka

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. „*Discovery of OATD-01, a First-in-Class Chitinase Inhibitor as Potential New Therapeutics for Idiopathic Pulmonary Fibrosis*” J Med Chem. 2020 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: analiza i interpretacja danych farmakokinetycznych.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 25%. Obejmował on: planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.

..... Sylwia Piasecka

(podpis oświadczającego)

Warszawa, 20.09.2022

Dr Michał Młacki

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. „Discovery of OATD-01, a First-in-Class Chitinase Inhibitor as Potential New Therapeutics for Idiopathic Pulmonary Fibrosis” J Med Chem. 2020 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: planowanie doświadczeń in vivo, analiza i interpretacja danych.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 25%. Obejmował on: planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jako współautor pracy pt. „Inhibition of CHIT1 as a novel therapeutic approach in idiopathic pulmonary fibrosis” Eur J Pharmacol. 2022 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: planowanie i przeprowadzenie doświadczeń, analiza danych, ostateczne poprawki manuskryptu.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 40%. Obejmował on: opracowanie koncepcji i metodologii badania, przeprowadzenie doświadczeń, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jako współautor pracy pt. „Pharmacological inhibition of chitotriosidase (CHIT1) as a novel therapeutic approach for sarcoidosis” J Inflamm Res. 2022 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: planowanie i przeprowadzenie doświadczeń, analiza danych, ostateczne poprawki manuskryptu.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 60%. Obejmował on: opracowanie koncepcji i metodologii badania, planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.

  
.....  
(podpis oświadczającego)

Warszawa, 19.09.2022

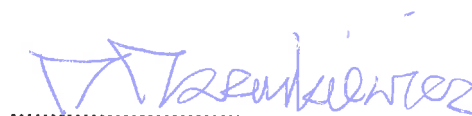
Dr Marcin Mazurkiewicz

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. „*Discovery of OATD-01, a First-in-Class Chitinase Inhibitor as Potential New Therapeutics for Idiopathic Pulmonary Fibrosis*” *J Med Chem.* 2020 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: analiza i interpretacja danych farmakokinetycznych.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 25%. Obejmował on: planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.



(podpis oświadczającego)

Łódź, 20.09.2022

Dr Michał Piotrowicz

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. „*Discovery of OATD-01, a First-in-Class Chitinase Inhibitor as Potential New Therapeutics for Idiopathic Pulmonary Fibrosis*” J Med Chem. 2020 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: syntezę chemiczną.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 25%. Obejmował on: planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.



(podpis oświadczającego)



Warszawa, 19.09.2022

Mgr Magdalena Salamon

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. **„Discovery of OATD-01, a First-in-Class Chitinase Inhibitor as Potential New Therapeutics for Idiopathic Pulmonary Fibrosis”** *J Med Chem.* **2020** oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: przeprowadzenie i opracowanie testów enzymatycznych.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 25%. Obejmował on: planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jako współautor pracy pt. **„Inhibition of CHIT1 as a novel therapeutic approach in idiopathic pulmonary fibrosis”** *Eur J Pharmacol.* **2022** oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: przeprowadzenie i analizę wyników testów biologicznych.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 40%. Obejmował on: opracowanie koncepcji i metodologii badania, planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, analizę statystyczną, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.

.....*Magdalena Salamon*.....

(podpis oświadczającego)

Warszawa, 20.09.2022

Mgr Agnieszka Zagożdżon

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. „Discovery of OATD-01, a First-in-Class Chitinase Inhibitor as Potential New Therapeutics for Idiopathic Pulmonary Fibrosis” J Med Chem. 2020 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: przeprowadzenie testów enzymatycznych.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 25%. Obejmował on: planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

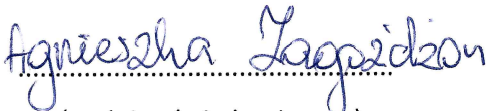
Jako współautor pracy pt. „Inhibition of CHIT1 as a novel therapeutic approach in idiopathic pulmonary fibrosis” Eur J Pharmacol. 2022 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: przeprowadzenie analiz biochemicznych.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 40%. Obejmował on: opracowanie koncepcji i metodologii badania, przeprowadzenie doświadczeń, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jako współautor pracy pt. „Pharmacological inhibition of chitotriosidase (CHIT1) as a novel therapeutic approach for sarcoidosis” J Inflamm Res. 2022 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: przeprowadzenie analiz biochemicznych.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 60%. Obejmował on: opracowanie koncepcji i metodologii badania, planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.

  
(podpis oświadczającego)



Warszawa, 19.09.2022

Dr Agnieszka Napiórkowska-Gromadzka

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. „*Discovery of OATD-01, a First-in-Class Chitinase Inhibitor as Potential New Therapeutics for Idiopathic Pulmonary Fibrosis*” J Med Chem. 2020 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: analiza struktury białka metodą krystalografii rentgenowskiej.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 25%. Obejmował on: planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.

A. Napiórkowska - Gromadzka

(podpis oświadczającego)

Warszawa, 30.09.2022

Mgr Aneta Bartłomiejczak

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. *„Discovery of OATD-01, a First-in-Class Chitinase Inhibitor as Potential New Therapeutics for Idiopathic Pulmonary Fibrosis”* J Med Chem. 2020 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: ekspresja i oczyszczanie rekombinowanego białka oraz analiza struktury kompleksu białko-inhibitor metodą krystalografii rentgenowskiej.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 25%. Obejmował on: planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.

  
.....

(podpis oświadczającego)

Warszawa, 20.09.2022

Mgr inż. Witold Mozga

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. „**Discovery of OATD-01, a First-in-Class Chitinase Inhibitor as Potential New Therapeutics for Idiopathic Pulmonary Fibrosis**” **J Med Chem. 2020** oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: analizę i interpretację wyników.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 25%. Obejmował on: planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.



Witold Mozga  
(podpis oświadczającego)

Warszawa, 20.09.2022

Dr Paweł Dobrzański

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. „Discovery of OATD-01, a First-in-Class Chitinase Inhibitor as Potential New Therapeutics for Idiopathic Pulmonary Fibrosis” J Med Chem. 2020 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: interpretacja danych, konsultacje merytoryczne, ostateczne poprawki.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 25%. Obejmował on: planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

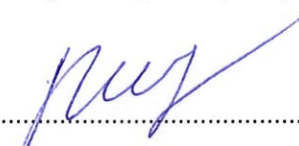
Jako współautor pracy pt. „Inhibition of CHIT1 as a novel therapeutic approach in idiopathic pulmonary fibrosis” Eur J Pharmacol. 2022 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: opracowanie koncepcji i metodologii badania, interpretacja danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 40%. Obejmował on: opracowanie koncepcji i metodologii badania, przeprowadzenie doświadczeń, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jako współautor pracy pt. „Pharmacological inhibition of chitotriosidase (CHIT1) as a novel therapeutic approach for sarcoidosis” XXX oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: opracowanie koncepcji i metodologii badania, analiza i interpretacja danych, analizę statystyczną, ostateczne poprawki manuskryptu.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 60%. Obejmował on: opracowanie koncepcji i metodologii badania, planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.

  
.....  
(podpis oświadczającego)

Warszawa, 22.09.2022

Dr Karolina Dzwonek

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. „Discovery of OATD-01, a First-in-Class Chitinase Inhibitor as Potential New Therapeutics for Idiopathic Pulmonary Fibrosis” J Med Chem. 2020 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: opracowanie koncepcji badań biologicznych, interpretacja danych, konsultacje merytoryczne.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 25%. Obejmował on: planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jako współautor pracy pt. „Inhibition of CHIT1 as a novel therapeutic approach in idiopathic pulmonary fibrosis” Eur J Pharmacol. 2022 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: opracowanie koncepcji badań biologicznych, interpretacja danych, konsultacje merytoryczne.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 40%. Obejmował on: opracowanie koncepcji i metodologii badania, przeprowadzenie doświadczeń, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jako współautor pracy pt. „Pharmacological inhibition of chitotriosidase (CHIT1) as a novel therapeutic approach for sarcoidosis” J Inflamm Res. 2022 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: opracowanie koncepcji badań biologicznych, interpretacja danych, konsultacje merytoryczne.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 60%. Obejmował on: opracowanie koncepcji i metodologii badania, planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.



(podpis oświadczającego)



Warszawa, 19.09.2022

Prof. dr hab. n. med. Jakub Gołąb

### Oświadczenie

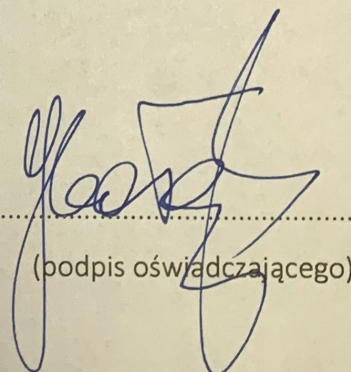
Jako współautor pracy pt. „*Discovery of OATD-01, a First-in-Class Chitinase Inhibitor as Potential New Therapeutics for Idiopathic Pulmonary Fibrosis*” J Med Chem. 2020 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: metodyka, konsultacje merytoryczne, ostateczne poprawki manuskryptu.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 25%. Obejmował on: planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jako współautor pracy pt. „*Inhibition of CHIT1 as a novel therapeutic approach in idiopathic pulmonary fibrosis*” Eur J Pharmacol. 2022 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: konsultacje merytoryczne, ostateczne poprawki manuskryptu.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 40%. Obejmował on: opracowanie koncepcji i metodologii badania, planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, analizę statystyczną, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.



(podpis oświadczającego)



Warszawa, 19.09.2022

Prof. Marcin Nowotny

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. „*Discovery of OATD-01, a First-in-Class Chitinase Inhibitor as Potential New Therapeutics for Idiopathic Pulmonary Fibrosis*” J Med Chem. 2020 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: analiza i interpretacja danych dotyczących struktury białka uzyskanych metodą krystalografii rentgenowskiej, konsultacje merytoryczne.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 25%. Obejmował on: planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.

A handwritten signature in blue ink, reading "Marcin Nowotny", written over a horizontal dotted line.

(podpis oświadczającego)

Warszawa, 20.09.2022

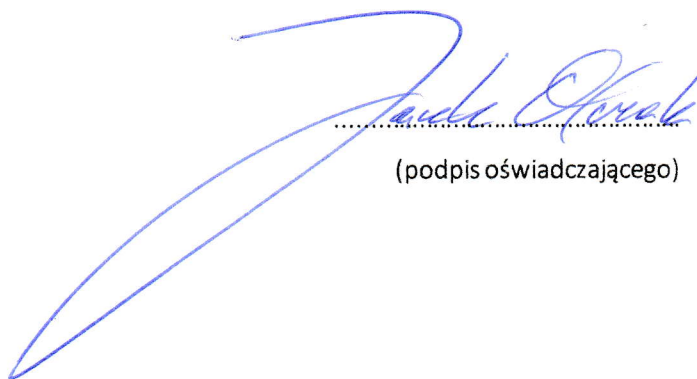
Dr Jacek Olczak

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. *„Discovery of OATD-01, a First-in-Class Chitinase Inhibitor as Potential New Therapeutics for Idiopathic Pulmonary Fibrosis”* J Med Chem. 2020 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: konceptualizacja syntezy chemicznej oraz naniesienie ostatecznych poprawek do manuskryptu publikacji.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 25%. Obejmował on: planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.



(podpis oświadczającego)

Warszawa, 19.09.2022

Dr Adam Gołębiowski

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. **„Discovery of OATD-01, a First-in-Class Chitinase Inhibitor as Potential New Therapeutics for Idiopathic Pulmonary Fibrosis”** J Med Chem. 2020 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: koncepcja i metodologia badań, konceptualizacja syntezy chemicznej, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 25%. Obejmował on: planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jako współautor pracy pt. **„Inhibition of CHIT1 as a novel therapeutic approach in idiopathic pulmonary fibrosis”** Eur J Pharmacol. 2022 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: konceptualizacja syntezy chemicznej, konsultacje merytoryczne.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 40%. Obejmował on: opracowanie koncepcji i metodologii badania, planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, analizę statystyczną, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.



(podpis oświadczającego)

Warszawa, 21.09.2022

Dr Patrycja Nejman-Gryz

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. „Inhibition of CHIT1 as a novel therapeutic approach in idiopathic pulmonary fibrosis” Eur J Pharmacol. 2022 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: wykonanie oznaczeń laboratoryjnych, analiza danych, ostateczne poprawki.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 40%. Obejmował on: opracowanie koncepcji i metodologii badania, przeprowadzenie doświadczeń, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jako współautor pracy pt. „Pharmacological inhibition of chitotriosidase (CHIT1) as a novel therapeutic approach for sarcoidosis” J Inflamm Res. 2022 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: wykonanie oznaczeń laboratoryjnych, analiza danych, ostateczne poprawki.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 60%. Obejmował on: opracowanie koncepcji i metodologii badania, planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.

Patrycja Nejman-Gryz  
(podpis oświadczającego)



Warsaw, 21.09.2022

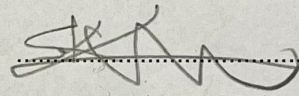
Serdar Korur, PhD

### Statement

As a co-author of the publication entitled: „Inhibition of CHIT1 as a novel therapeutic approach in idiopathic pulmonary fibrosis” Eur J Pharmacol. 2022, I declare that my own contribution to the preparation, conduct and development of research and preparation of the manuscript is: analysis and interpretation of publicly available data sets.

I describe Barbara Dymek’s contribution as 40%. It included methodology, design and conduct of the experiments, data analysis and interpretation, manuscript preparation, manuscript corrections.

I give consent on the use of the above-mentioned publication as part of the doctoral dissertation of Barbara Dymek.



(signature)

Rotterdam, 21.09.2022

Jan H. von der Thüsen, MD, PhD

### Statement

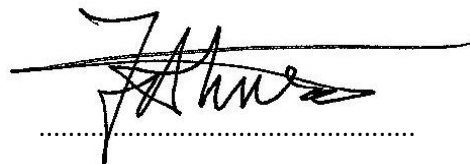
As a co-author of the publication entitled: „Inhibition of CHIT1 as a novel therapeutic approach in idiopathic pulmonary fibrosis” Eur J Pharmacol. 2022, I declare that my own contribution to the preparation, conduct and development of research and preparation of the manuscript is: analysis and interpretation of data.

I describe Barbara Dymek’s contribution as 40%. It included: methodology, design and conduct of the experiments, data analysis and interpretation, manuscript preparation, manuscript corrections.

As a co-author of the publication entitled: „ Pharmacological inhibition of chitotriosidase (CHIT1) as a novel therapeutic approach for sarcoidosis” J Inflamm Res. 2022, I declare that my own contribution to the preparation, conduct and development of research and preparation of the manuscript is: analysis and interpretation of data.

I describe Barbara Dymek’s contribution as 60%. It included: methodology, design and conduct of the experiments, data analysis and interpretation, manuscript preparation, manuscript corrections.

I give consent to the use of the above-mentioned publications as part of the doctoral dissertation of Barbara Dymek.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. von der Thüsen', is written over a solid horizontal line. Below the signature, a dotted horizontal line is present.

(signature)



Warszawa, 20.09.2022

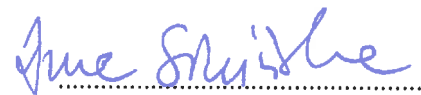
Dr Anna Siwińska

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. „*Inhibition of CHIT1 as a novel therapeutic approach in idiopathic pulmonary fibrosis*” Eur J Pharmacol. 2022 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: przeprowadzenie analiz, interpretację danych.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 40%. Obejmował on: opracowanie koncepcji i metodologii badania, planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, analizę statystyczną, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.



(podpis oświadczającego)

Warszawa, 20.09.2022

Mgr Nazan Cemre Güner

### Oświadczenie


Jako współautor pracy pt. „Inhibition of CHIT1 as a novel therapeutic approach in idiopathic pulmonary fibrosis” Eur J Pharmacol. 2022 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: przeprowadzenie doświadczeń in vivo.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 40%. Obejmował on: opracowanie koncepcji i metodologii badania, przeprowadzenie doświadczeń, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jako współautor pracy pt. „Pharmacological inhibition of chitotriosidase (CHIT1) as a novel therapeutic approach for sarcoidosis” J Inflamm Res. 2022 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: przeprowadzenie doświadczeń in vivo.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 60%. Obejmował on: opracowanie koncepcji i metodologii badania, planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.

  
.....  
(podpis oświadczającego)

Warszawa, 20.09.2022 r.

**mgr Łukasz Cheda**

ul. Rechniewskiego 3/55  
03-980 Warszawa  
tel. 575-550-667  
lcheda@chem.uw.edu.pl

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. „Inhibition of CHIT1 as a novel therapeutic approach in idiopathic pulmonary fibrosis” Eur J Pharmacol. 2022 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: przeprowadzenie doświadczeń in vivo.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 40%. Obejmował on: opracowanie koncepcji i metodologii badania, przeprowadzenie doświadczeń, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.



(podpis oświadczającego)

Warszawa, 21.09.2022

Dr hab. Magdalena Paplińska-Goryca

### Oświadczenie


Jako współautor pracy pt. „Inhibition of CHIT1 as a novel therapeutic approach in idiopathic pulmonary fibrosis” Eur J Pharmacol. 2022 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: wykonanie oznaczeń laboratoryjnych, analiza danych, ostateczne poprawki.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 40%. Obejmował on: opracowanie koncepcji i metodologii badania, przeprowadzenie doświadczeń, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jako współautor pracy pt. „Pharmacological inhibition of chitotriosidase (CHIT1) as a novel therapeutic approach for sarcoidosis” J Inflamm Res. 2022 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: wykonanie oznaczeń laboratoryjnych, analiza danych, ostateczne poprawki.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 60%. Obejmował on: opracowanie koncepcji i metodologii badania, planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.

  
(podpis oświadczającego)

Warszawa, 21.09.2022

Mgr Małgorzata Proboszcz

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. „Inhibition of CHIT1 as a novel therapeutic approach in idiopathic pulmonary fibrosis” Eur J Pharmacol. 2022 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: wykonanie oznaczeń laboratoryjnych.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 40%. Obejmował on: opracowanie koncepcji i metodologii badania, przeprowadzenie doświadczeń, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jako współautor pracy pt. „Pharmacological inhibition of chitotriosidase (CHIT1) as a novel therapeutic approach for sarcoidosis” J Inflamm Res. 2022 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: wykonanie oznaczeń laboratoryjnych.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 60%. Obejmował on: opracowanie koncepcji i metodologii badania, planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.



(podpis oświadczającego)

Rotterdam, 21.09.2022

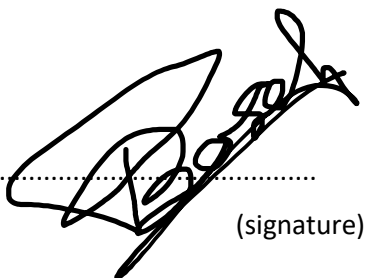
Thierry P.P. van den Bosch, PhD

### Statement

As a co-author of the publication entitled: „Inhibition of CHIT1 as a novel therapeutic approach in idiopathic pulmonary fibrosis” Eur J Pharmacol. 2022, I declare that my own contribution to the preparation, conduct and development of research and preparation of the manuscript is: analysis and interpretation of data.

I describe Barbara Dymek’s contribution as 40%. It included: methodology, design and conduct of the experiments, data analysis and interpretation, manuscript preparation, manuscript corrections.

I give consent to the use of the above-mentioned publications as part of the doctoral dissertation of Barbara Dymek.

  
.....  
(signature)



Warszawa, 21.09.2022

Dr hab. n. med. Katarzyna Górka

### Oświadczenie

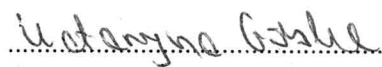
Jako współautor pracy pt. „Inhibition of CHIT1 as a novel therapeutic approach in idiopathic pulmonary fibrosis” Eur J Pharmacol. 2022 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: rekrutacja uczestników badania, ostateczne poprawki manuskryptu.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 40%. Obejmował on: opracowanie koncepcji i metodologii badania, przeprowadzenie doświadczeń, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jako współautor pracy pt. „Pharmacological inhibition of chitotriosidase (CHIT1) as a novel therapeutic approach for sarcoidosis” J Inflamm Res. 2022 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: rekrutacja uczestników badania, ostateczne poprawki manuskryptu.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 60%. Obejmował on: opracowanie koncepcji i metodologii badania, planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.



(podpis oświadczającego)

Warszawa, 19.09.2022


Dr Rafał Kamiński

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. „*Inhibition of CHIT1 as a novel therapeutic approach in idiopathic pulmonary fibrosis*” Eur J Pharmacol. 2022 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: konsultacje merytoryczne, ostateczne poprawki manuskryptu.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 40%. Obejmował on: opracowanie koncepcji i metodologii badania, planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, analizę statystyczną, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.



(podpis oświadczającego)

Warszawa, 23.09.2022

Prof. dr hab. n. med. Rafał Krenke

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. „Inhibition of CHIT1 as a novel therapeutic approach in idiopathic pulmonary fibrosis” Eur J Pharmacol. 2022 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: koncepcja badania materiału klinicznego, konsultacje merytoryczne, ostateczne poprawki manuskryptu.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 40%. Obejmował on: opracowanie koncepcji i metodologii badania, przeprowadzenie doświadczeń, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jako współautor pracy pt. „Pharmacological inhibition of chitotriosidase (CHIT1) as a novel therapeutic approach for sarcoidosis” J Inflamm Res. 2022 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: koncepcja pozyskania i badań materiałów bronchoskopowych, konsultacje merytoryczne, wpływ na ostateczny kształt pracy, ostateczne poprawki manuskryptu.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 60%. Obejmował on: opracowanie koncepcji i metodologii badania, planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.



.....  
(podpis oświadczającego)

Warszawa, 20.09.2022

Dr Katarzyna Drzewicka

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. „Pharmacological inhibition of chitotriosidase (CHIT1) as a novel therapeutic approach for sarcoidosis” J Inflamm Res. 2022 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: planowanie i przeprowadzenie oznaczeń biochemicznych.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 60%. Obejmował on: opracowanie koncepcji i metodologii badania, planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.

.....  
KD Drzewicka

(podpis oświadczającego)

Warszawa, 21.09.2022

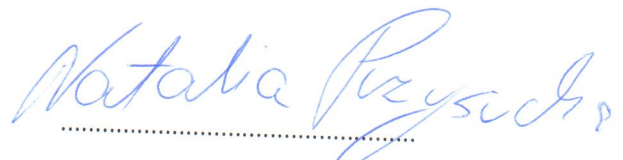
Lek. Natalia Przysucha

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. „Pharmacological inhibition of chitotriosidase (CHIT1) as a novel therapeutic approach for sarcoidosis” J Inflamm Res. 2022 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: rekrutacja uczestników badania, ostateczne poprawki manuskryptu.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 60%. Obejmował on: opracowanie koncepcji i metodologii badania, planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.

  
.....  
(podpis oświadczającego)



Warszawa, 20.09.2022

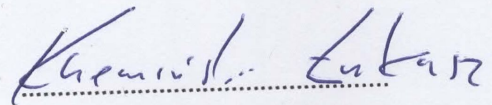
Dr Łukasz Krzemiński

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. „Pharmacological inhibition of chitotriosidase (CHIT1) as a novel therapeutic approach for sarcoidosis” J Inflamm Res. 2022 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 60%. Obejmował on: opracowanie koncepcji i metodologii badania, planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.



(podpis oświadczającego)



Warszawa, 20.09.2022

Dr Zbigniew Zaślona

### Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. „Pharmacological inhibition of chitotriosidase (CHIT1) as a novel therapeutic approach for sarcoidosis” J Inflamm Res. 2022 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: konsultacje merytoryczne, poprawki manuskryptu.

Udział procentowy mgr Barbary Dymek w przygotowaniu publikacji określam jako 60%. Obejmował on: opracowanie koncepcji i metodologii badania, planowanie i przeprowadzenie oznaczeń laboratoryjnych, analizę i interpretację danych, analizę statystyczną, przygotowanie manuskryptu, ostateczne poprawki.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w prac jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Dymek.



.....  
(podpis oświadczającego)

## 12 Opinia Komisji Bioetycznej



# Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym

Tel.: 022/ 57 - 20 -303  
Fax: 022/ 57 - 20 -165

ul. Żwirki i Wigury nr 61  
02-091 Warszawa

e-mail: komisja.bioetyczna@wum.edu.pl  
www.komisja-bioetyczna.wum.edu.pl

KB/.....<sup>236</sup>...../2015

Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym  
po zapoznaniu się z wnioskiem /wymienić wnioskodawcę/ - w dniu 01 grudnia 2015r.  
Prof. dr hab. n.med. Rafał Krenke, Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych,  
Pneumonologii i Alergologii, ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa

dotyczącym: wyrażenia opinii w sprawie badania pt.: „ Ocena aktywności enzymatycznej  
chitynaz u pacjentów z przewlekłymi chorobami płuc.”

## wyraża następującą opinię

- stwierdza, że jest ono dopuszczalne i zgodne z zasadami naukowo-etycznymi\*.
- ~~stwierdza, że jest ono niedopuszczalne i niezgodne z zasadami naukowo-etycznymi.\*~~

## Uwagi Komisji-verte

**Pouczenie-w ciągu 14 dni od otrzymania decyzji wnioskodawcy przysługuje Prawo  
odwołania do Komisji Odwoławczej za pośrednictwem Komisji Bioetycznej przy  
Warszawskim Uniwersytecie Medycznym.**

Komisja działa na podstawie art.29 ustawy z dnia 5.12.1996r. o zawodzie lekarza /Dz.U.nr 28/97 poz.152  
wraz z późn.zm./, zarządzenia MZiOS z dn.11.05.1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i  
finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych /Dz.U.nr 47 poz.480/, Ustawy prawo  
farmaceutyczne z dnia 6 września 2001r. (Dz.U.Nr 126, poz. 1381 z późn. zm.) Zarządzenie nr 56/2007  
z dnia 15 października 2007 r.w sprawie działania Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie  
Medycznym /Regulamin Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym/.

Komisja działa zgodnie z zasadami GCP.

W załączeniu- skład Komisji oraz lista obecności.

Zastępca Przewodniczącej  
Komisji Bioetycznej

  
Prof. dr hab.Barbara Gajkowska

\*niepotrzebne skreślić

strona podpisowa do uchwały Komisji Bioetycznej przy Warszawskim  
Uniwersytecie Medycznym nr KB/.....<sup>236</sup>..... z dnia 01 grudnia 2015r.

1. Prof. dr hab. med. Maria ROSZKOWSKA-BLAIM .....
2. Prof. dr hab. Barbara GAJKOWSKA .....
3. Prof. dr hab. med. Jadwiga KOMENDER .....
4. Prof. dr hab. med. Bożenna WOCIAL .....
5. Prof. nadzw. dr hab. med. Andrzej KAŃSKI .....
6. Prof. dr hab. med. Jadwiga DWILEWICZ-TROJACZEK .....
7. Prof. dr hab. med. Zbigniew WIERZBICKI .....
8. Prof. dr hab. med. Krzysztof J. FILIPIAK .....
9. Dr n. med. Zygmunt JAMROZIK .....
10. Dr hab. n. med. Mariusz JASIK .....
11. Dr Agnieszka PIECHAL .....
12. Mec. Ryszard PŁACZKOWSKI .....
13. Prof. dr hab. Joanna GÓRNICKA-KALINOWSKA .....
14. Alicja JAWORSKA .....
15. Ksiądz Władysław GRĘDOWSKI .....