

Autoreferat rozprawy doktorskiej:

„Synteza lignanów i ich pochodnych z wykorzystaniem procesu fotocyklizacji”

Promotor: prof. dr hab. Zbigniew Czarnocki

Synteza totalna stanowi, z jednej strony, ostateczny dowód potwierdzający strukturę danego związku organicznego, lecz z drugiej strony jest również polem doświadczalnym służącym odkrywaniu i testowaniu reakcji nieznanych wcześniej. Planując ścieżkę syntetyczną prowadzącą do związku o aktywności farmakologicznej należy wziąć pod uwagę absolutną stereochemię pożądanego produktu ze względu na bioenantjoróżnicowanie.

Niniejsza praca dotyczy syntezy związków naturalnych z grupy lignanów oraz ich pochodnych o dużym znaczeniu terapeutycznym. Pomimo stosunkowo prostego szkieletu węglowego tych cząsteczek ich chemii i biologii poświęcono wiele uwagi, czego dowodem są tysiące opublikowanych prac na ich temat. Najlepiej poznanym z lignanów jest podofilotoksyna (PPT) ze względu na potwierdzone właściwości terapeutyczne, szczególnie przeciwwirusową i przeciwnowotworową. Jest ona jednocześnie punktem wyjścia przy modyfikacjach strukturalnych, które wymagają złożonych syntez z uwzględnieniem stereochemii otrzymywanych produktów. Głównymi wadami obecnie znanych metod syntezy tego typu układów jest wieloetapowość, brak ogólności, niska stereoselektywność i wysokie koszty syntezy.

Nadrzędnym celem podjętych badań było poszerzenie wiedzy na temat metod syntezy cyklolignanów poprzez zbadanie złożonej i fascynującej fotochemii pochodnych kwasu bisbenzylidenobursztynowego (kwasu fulgenowego). Szczegółowymi celami podjętych aktywności badawczych były: opracowanie formalnej syntezy podofilotoksyny; opracowanie totalnej syntezy (+)-epigalcatyny; wykorzystanie L-proliny jako pomocnika chiralnego w syntezie cyklolignanów, w tym w syntezie (1*R*)-metylopodofilotoksyny oraz zbadanie aktywności cytotoksycznej/cytostatycznej nowo otrzymanych cyklolignanów.

W pierwszej kolejności postanowiłem opracować formalną syntezę (–)-podofilotoksyny. Jako metodę konstrukcji szkieletu węglowego docelowej cząsteczki wybrałem, słabo jak dotąd zbadaną, fotocyklizację chiralnej pochodnej kwasu fulgenowego.

W zrealizowanej przeze mnie 9-cio etapowej syntezie liniowej prekursora podofilotoksyny wykorzystałem L-prolinol jako źródło chiralności oraz wykazałem, że kluczowy etap,

fotocyklizacja, przeprowadzony w warunkach przepływowych, charakteryzuje szereg zalet w stosunku do syntezy klasycznej. Dodatkowo, w celu usunięcia pomocnika chiralnego wykorzystałem odczynnik Schwartz'a.

W porównaniu ze znanymi z literatury syntezaami totalnymi PPT, podejście zrealizowane przeze mnie zakłada wykorzystanie tanich i łatwo dostępnych substratów, brak konieczności używania wyrafinowanych organokatalizatorów czy katalizatorów zawierających metale ciężkie, co jest ważne w kontekście otrzymywania substancji leczniczych. Metoda ta umożliwiła również otrzymywanie pochodnych z różną dekoracją pierścieni B, C i E.

Opracowana przeze mnie metodologia syntezy 1,2-*cis*-cyklolignanów stwarza możliwość otrzymywania pochodnych niedostępnych w naturalnych źródłach roślinnych czy też trudnych w syntezie innymi metodami. W kolejnej części moich badań postanowiłem zatem przeprowadzić totalną syntezę stereoisomeru związku naturalnego, który to izomer nie został jak dotąd odnaleziony w źródłach naturalnych czy otrzymany na drodze syntezy chemicznej.

(-)-Galcatyna została po raz pierwszy wyizolowana w 1954 r. z rośliny *Hirnantandra baccata*, natomiast jej enancjomer został zsyntetyzowany w 1981 r. Jednak należy zauważyć, że związki te posiadają konfigurację *trans* na centrach C-1 i C-2. Spośród diastereoizomerów o konfiguracji *cis*, która obecna jest w najbardziej aktywnych biologicznie cyklolignanach, znany jest zaledwie jeden. Dlatego też za cel syntetyczny wybrałem nieznaną dotąd stereoisomer - (+)-epigalcatynę.

Podobnie jak w przypadku otrzymywania prekursora PPT, syntezę rozpocząłem od konstrukcji szkieletu węglowego na drodze kondensacji Stobbeego, a następnie fotocyklizacji pochodnej kwasu fulgenowego i funkcjonalizacji otrzymanego cyklolignanu. Podczas funkcjonalizacji zaobserwowałem, że reakcja z wodorem cząsteczkowym w obecności katalizatora Pd/C prowadziła do symultanicznej redukcji wiązania podwójnego i grupy formylowej w pozycji C-3. Co ciekawe, grupa formylowa uległa redukcji bezpośrednio do grupy metylowej, natomiast redukcja wiązania podwójnego przebiegła ze znakomitą stereoselektywnością – powstał tylko jeden diastereoizomeryczny produkt, co wyjaśniłem w oparciu o mechanizm katalitycznej hydrogenacji i strukturę przestrzenną substratu tej przemiany.

W rezultacie ukończyłem pierwszą totalną syntezą (+)-epigalcatyny wykorzystując w kluczowym etapie fotocyklizację w warunkach przepływowych. Przeprowadzona 11-sto etapowa ścieżka syntetyczna, dająca produkt końcowy z całkowitą wydajnością 5% potwierdza użyteczność zastosowanej metodologii w syntezie cyklolignanów niedostępnych w źródłach naturalnych.

W kolejnej części badań postanowiłem zsyntetyzować prekursor cyklolignanów, który posiadał będzie tylko jedną grupę karbonylową sprzężoną z resztą benzylową, co wymusi regiospecyficzną fotocyklizację. Jako pomocnik chiralny postanowiłem w tym przypadku wykorzystać naturalny aminokwas – L-prolinę. Dodatkową zaletą tej metody, miała być łatwość stworzenia pierścienia laktonowego (pierścienia D) po usunięciu pomocnika chiralnego. Usunięcia jednej z grup karbonylowych dokonałem poprzez redukcję odpowiedniego kwasu fulgenowego za pomocą kompleksu boran-dimetylosiarczek ($((\text{CH}_3)_2\text{S}\cdot\text{BH}_3)$; BMS). Otrzymanie substratu do fotocyklizacji, zawierającego w swej strukturze L-prolinę okazało się jednak wymagającym zadaniem. Udało mi się go otrzymać poprzez zabezpieczenie grupy hydroksylowej i utworzenie wiązania amidowego z estrem metylowym L-proliny. Naświetlanie tak przygotowanego substratu, nie prowadziło jednak do docelowego cyklolignanów, a do mieszaniny β -apopikropodofiliny i jej izomeru (w postaci racematów). Wykazałem również, że obserwowany rozpad wiązania amidowego i uwalnianie proliny jest procesem czysto fotochemicznym, oraz że rozpad ten jest oddzielnym procesem fotochemicznym, zachodzącym na skutek wzbudzenia światłem o innej długości fali, niż fotochemiczna cyklizacja bisbenzylidenobursztynianów. Zsyntetyzowałem też serię substratów, w celu zbadania ogólności tego procesu i wpływu struktury cząsteczki.

Przeprowadzone eksperymenty umożliwiły mi odkrycie rzadkiej reakcji, w trakcie której dochodzi do fotolitycznego rozerwania wiązania amidowego pod wpływem światła widzialnego. Pokazałem też możliwe wykorzystanie platformy bisbenzylidenobursztynylowej jako fotolabilnej grupy zabezpieczającej aminy drugorzędowe. Reakcja ta może być przydatna w otrzymywaniu cyklolignanów z różnie podstawionymi grupami benzylidenowymi. Pomimo, iż nie ukończyłem syntezy docelowej cząsteczki, udało mi się otrzymać (\pm)- β -apopikropodofilinę, jej izomer oraz nieopisany wcześniej lignan arylnaftalenowy o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej.

Literatura naukowa dotycząca otrzymywania pochodnych podofilotoksyny o potencjalnie lepszym profilu farmakologicznym zawiera setki opisanych dotąd cząsteczek. Jednakże pochodne zawierające dodatkową grupę metylową w pozycji C-1 stanowią wciąż niezbadaną klasę cyklolignanów. Grupa metylowa w tej pozycji wpływać będzie na kąt pomiędzy pierścieniem trimetoksyfenylowym, a płaszczyzną dihydronaftalenu, co może przyczynić się do silniejszego wiązania się tych związków w miejscu aktywnym tubuliny lub topoizomerazy II. Dlatego też postanowiłem podjąć próbę syntezy (1*R*)-metylopodofilotoksyny, wykorzystując metodę opartą na fotocyklizacji chiralnego bisbenzylidenobursztynianu (*vide supra*).

Podwójna kondensacja Stobbeego pomiędzy kwasem bursztynowym, piperonalem i 3',4',5'-trimetoksyacetofenonem dała jako produkt kwas fulgenowy, który wbrew oczekiwaniom nie był mieszaniną izomerów (*E*, *Z*) i (*E*, *E*), a pojedynczym izomerem (*E*, *Z*). Pochodne 1,4-difenylobutadienu są znanymi inhibitorami wytwarzania inhibitora aktywatora plazminogenu typu 1 (PAI-1). Przeprowadzona przeze mnie regioselektywna kondensacja Stobbeego może być użyteczną metodą syntezy pochodnych w formie pojedynczego izomeru i zostać wykorzystana do syntezy nowych, biologicznie aktywnych pochodnych.

Wprowadzając pomocnik chiralny i dokonując makrocyclizacji otrzymałem następnie odpowiedni substrat do fotocyclizacji. Obliczenia przeprowadzone w programie Gaussian (na poziomie AM1) umożliwiły mi na ustalenie, że preferowaną konformacją tego związku jest forma *P*. Po naświetleniu tego związku nie wyizolowałem z mieszaniny poreakcyjnej oczekiwanego prekursora 1-metylopodofilotoksyny, natomiast nowy cyklolignan. Konfigurację na centrach C-1 i C-2 ustaliłem na podstawie widm korelacyjnych NMR. Powstawanie tego produktu oznaczało, że cyclizacja musiała rozpocząć się od wzbudzenia amidowej grupy karbonylowej, a nie estrowej grupy karbonylowej, tak jak zakładałem. Implikuje to również, że musiało dojść do fotochemicznej izomeryzacji $Z \rightarrow E$ ugrupowania benzyliденowego, ponieważ tylko izomer *E* może ulec cyclizacji. Podobne fotochemiczne izomeryzacje *Z-E* znane są w literaturze. Uzyskane wyniki w połączeniu z moimi poprzednimi obserwacjami oraz doniesieniami literaturowymi, umożliwiły mi określenie pewnych ogólnych reguł dotyczących fotocyclizacji chiralnych 2,3-bisbenzyliденobursztynianów. Obecność grupy metylowej w zawierających prolinol cyklicznych amidoestrach kwasu fulgenowego determinuje regioselektywność ich fotocyclizacji. Kiedy grupa ta zastępuje atom wodoru przy przynajmniej jednym z benzyliденowych wiązań podwójnych, cyclizacja zachodzi preferencyjnie poprzez wzbudzenie amidowej grupy karbonylowej. Do wzbudzenia estrowej grupy karbonylowej dochodzi, gdy obydwa ugrupowania benzyliденowe są wprowadzone poprzez kondensację Stobbeego z wykorzystaniem aldehydów. Możliwą przyczyną tego zjawiska jest różna preorganizacja konformacyjna substratu przy zmianie $R = H$ do $R = CH_3$.

W ciągu ostatnich lat związki naturalne odgrywały znaczącą rolę w odkrywaniu nowych leków. W obszarze leków przeciwnowotworowych, zgodnie z danymi obejmującymi okres 25 lat, 47% wszystkich zatwierdzonych leków to produktu naturalne lub ich pochodne. Zainspirowany tymi danymi postanowiłem niektóre z otrzymanych, w trakcie realizowanych zadań syntetycznych, cyklolignanów poddać badaniom biologicznym mających na celu sprawdzenie ich cytotoksyczności względem komórek nowotworowych. Uzyskane, dzięki testom *in vitro*, wyniki cytotoksyczności trzech wybranych cyklolignanów wykazały, że są one

mniej toksyczne dla komórek nienowotworowych niż podofilotoksyna. Dodatkowo, pierwszy zsyntetyzowany heterodimer PPT i benzotiazolu, był o wiele aktywniejszy, względem większości przebadanych linii komórek nowotworowych, niż PPT. Biorąc pod uwagę, że synteza otrzymanego kongeneru obejmuje wykorzystanie tanich i łatwo dostępnych substratów, brak konieczności używania metali ciężkich (aspekty ekonomiczne) oraz możliwość prowadzenia procesu w dużej skali (aspekt techniczny), istnieją dogodne warunki syntezy biblioteki pochodnych mającej na celu wyłonienie najaktywniejszego i najbardziej selektywnego związku o zadawalających parametrach farmakokinetycznych.

Wyniki badań przedstawione w niniejszej rozprawie zostały włączone do następujących publikacji:

1. Lisiecki, K.; Krawczyk, K. K.; Roszkowski, P.; Maurin, J. K.; Czarnocki, Z. „Formal synthesis of (-)-podophyllotoxin through the photocyclization of an axially chiral 3,4-bisbenzylidene succinate amide ester – a flow photochemistry approach”, *Org. Biomol. Chem.*, **2016**, *14*, 460-469.
2. Lisiecki, K.; Krawczyk, K. K.; Roszkowski, P.; Maurin, J. K.; Budzianowski, A.; Czarnocki, Z. „Unusual visible-light photolytic cleavage of tertiary amides during the synthesis of cyclolignans related to podophyllotoxin”, *Tetrahedron*, **2017**, *73*, 6316-6328.
3. Lisiecki, K.; Roszkowski, P.; Krawczyk, K. K.; Maurin, J. K.; Czarnocki, Z. „Unexpected regioselectivity in the photocyclization of a chiral 2,3-bisbenzylidenesuccinate, leading to a podophyllotoxin related cyclolignan”, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, **2018**, *364*, 297-302.
4. Lisiecki, K.; Czarnocki, Z. „Flow Photochemistry as a Tool for the Total Synthesis of (+)-Epigallocatechin”, *Org. Lett.*, **2018**, *20*, 605-607.
5. Lisiecki, K.; Czarnocki, Z. „Advances in the Synthesis of Aryltetralin and Arylnaphthalene Lignans using Photocyclization”, *Org. Prep. Proced. Int.*, **2018**, *50*, 527-543.
6. Strus, P.; Lisiecki, K.; Czarnocki, Z.; Młynarczuk-Biały, I.; Biały, Ł. P. „Novel podophyllotoxin derivatives as Anticancer Agents: Design, Synthesis, and Biological Screening”, *Review and Research on Cancer Treatment*, **2018**, *4*, 48-61.