



Dr hab. inż. Renata Siedlecka

Wrocław, 27.06.2019 r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr Kamila Lisieckiego, zatytułowanej:

Synteza lignanów i ich pochodnych z wykorzystaniem procesu fotocyklizacji

Praca została wykonana w Pracowni Chemii Związków Naturalnych na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, pod kierunkiem Prof. dr hab. Zbigniewa Czarnockiego.

Pan mgr Kamil Lisiecki realizował swoje badania w laboratorium o uznanej renomie, które zajmuje się m. in. stereoselektywną syntezą alkaloidów oraz lignanów, a także innych związków heterocyklicznych o znaczeniu farmakologicznym, często wywodzących się z pochodnych naturalnych. Otrzymywanie związków o znanej aktywności na drodze czysto syntetycznej, bez wyodrębniania ze źródeł naturalnych jest przedmiotem tzw. syntezy totalnej, która dodatkowo w sposób absolutny potwierdza ich budowę. Korzyścią badań nad syntezą totalną może być uzyskanie naukowego zrozumienia biologicznej aktywności pierwotnego produktu naturalnego pozwalające na otrzymanie prostszych analogów posiadających taką samą aktywność biologiczną lub projektowanie nowych, jeszcze skuteczniejszych leków. Dodatkowym, ale wcale nie mniej istotnym celem takiej syntezy jest opracowanie i testowanie użyteczności nowych procedur reakcji chemicznych oraz nowych odczynników chemicznych. Przedmiotem badań mgr Lisieckiego była synteza związków z grupy aryloctetralin i aryloctidihydronaftalenów, należących do rodziny cyklolignanów, których najlepiej poznanym przedstawicielem jest podofilotoksyna (PPT). Podofilotoksyna ma udokumentowane zastosowania medyczne, ponieważ jest w stanie zatrzymać replikację zarówno komórkowego, jak i wirusowego DNA przez wiązanie niezbędnych enzymów. Może dodatkowo destabilizować mikrotubule i zapobiegać podziałowi komórek. Poszukiwanie nowych aktywnych związków, stanowi ciągle wyzwanie dla chemików, biologów i medyków zaangażowanych w badania przeciwnowotworowe. Naturalne lignany, w tym PPT, mogą stanowić dobry punkt wyjścia do syntezy nowych bioaktywnych pochodnych. W bazie Web of Science tylko dla 2019 r. można odnaleźć 33 publikacje dotyczące podofilotoksyny i jej analogów (stan na dzień 25.06.2019).

Z powyższych względów uznaję temat przygotowanej pracy doktorskiej za aktualny i ważny, zarówno ze względów poznawczych, jak i aplikacyjnych.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska napisana jest w sposób klasyczny. Manuskrypt składa się z części literaturowej (71 stron), części szczegółowo omawiającej uzyskane przez doktoranta wyniki (59 stron), części *stricto* eksperymentalnej (45 strony) oraz bibliografii. W całej pracy cytowanych jest 206 pozycji bibliograficznych. Dodatkowo zamieszczone jest streszczenie oraz spis publikacji, w których przedstawiono badania doktoranta zebrane w dysertacji. Godne podkreślenia jest, że lista ta obejmuje pięć publikacji w renomowanych czasopismach z listy Filadelfijskiej, w których Pan Lisiecki jest pierwszym autorem oraz publikację w roczniku *Review and Research on Cancer Treatment* wydawanym przez Fundację na Rzecz Promocji Nauki i Rozwoju z Lublina.

Część literaturowa pracy w syntetyczny sposób przedstawia charakterystykę lignanów jako grupy oraz bardzo obszernie opisuje właściwości samej podofilotoksyny oraz jej pochodnych. W sposób przejrzysty pokazana jest zależność aktywności biologicznej związków od modyfikacji poszczególnych stałych elementów struktury oraz które z modyfikacji dawały najlepsze rezultaty. Autor przybliży również główne metody syntezy podofilotoksyny, oparte na sprzężonej addycji tandemowej, cykloaddycji Dielsa-Aldera oraz inne inspirowane biologicznie. W osobnych podrozdziałach przedstawia sposoby syntezy enancjomerycznie wzbogaconych pochodnych PPT, obejmujące główne metody otrzymywania enancjomerów, tj. rozdział mieszaniny racemicznej, wykorzystanie chiralnego substratu, czy wykorzystanie chiralnego pomocnika. A ponieważ autor sam zajmował się fotocyklizacją, wiele wysiłku włożył w pokazanie przykładów fotochemicznie indukowanej cyklizacji pochodnych kwasu *E,E*-bisbenzylidenobursztynowego oraz przybliżenie postulowanych mechanizmów tego procesu. Po raz pierwszy fotochemiczne otrzymywanie cyklolignanów przeprowadzono już dość dawno (w 1965r.) jednak popularyzacja tej metody nastąpiła dopiero na początku XXI wieku. Co więcej, szybko okazało się, że fotocyklizacja może być stereoselektywna i z pojedynczych atropoizomerów bisbenzylidenobursztynianów pozwala syntezować czyste diastereoizomery prekursorów lignanów. W tej kwestii niekwestionowany udział miał też zespół Prof. Czarnockiego. Część literaturowa dysertacji kończy się omówieniem reakcji fotochemicznych „w przepływie”, wskazaniem ich wymogów, zalet oraz praktycznych zastosowań. Cały ten rozdział zredagowany jest w przemyślany sposób i napisany bardzo starannie. Sposób przedstawienia zagadnień oraz wybór przykładów świadczy o tym, że doktorant biegle porusza się w tematyce. Drobnym mankamentem może być to, że nie odwołuje się do najnowszych źródeł literaturowych, a jak wykazałam wcześniej, tematyka jest dość intensywnie rozwijana.

Część pracy poświęcona omówieniu wyników własnych osiągniętych przez mgr Lisieckiego podzielona jest na pięć części, zgodnie z podejmowanymi zadaniami badawczymi, dotyczącymi:

- opracowania formalnej syntezy podofilotoksyny,
- opracowania totalnej syntezy (+)-epigalcatyny,
- zastosowania L-proliny jako chiralnego pomocnika w syntezie cyklolignanów,
- syntezy (1*R*)-metylopodofilotoksyny,
- zbadania aktywności cytotoksycznej/cytostatycznej otrzymanych cyklolignanów.

Każdy z podrozdziałów stanowi jakby odrębną całość opatrzoną wstępem i podsumowaniem.

Fundamentem całości prac wydaje się być pierwsza część, dotycząca syntezy podofilotoksyny. W swoim podejściu mgr Lisiecki jako kluczową wykorzystał fotocyklizację chiralnego atropoizomerycznego amidoestru 1,2-benzylidenobursztynianu, który wcześniej otrzymał z odpowiednich aromatycznych aldehydów, bursztynianu dietylu i L-prolinolu, stanowiącego źródło chiralności. Próbując zoptymalizować warunki i uzyskać jak najlepszą wydajność, autor stwierdził, że najkorzystniej będzie przeprowadzać napromieniowanie w reaktorze fotochemicznym z przepływem ciągłym i samodzielnie takowy zbudował. Podsumowując, przeprowadził 9-cio etapową liniową syntezę enancjomerycznego alkoholu (+)-208, będącego bezpośrednim prekursorem (-)-podofilotoksyny (wg procedury Jonesa i Thompsona). Opracowana metodyka daje możliwości syntezy różnie podstawionych epimerycznych analogów znanych oraz nowych pochodnych cyklolignanów. Warto tu podkreślić, że publikacja w *Organic and Biomolecular Chemistry*, zawierająca uzyskane wyniki, została wyróżniona okładką czasopisma.

Kolejnym etapem było sprawdzenie użyteczności opracowanej metodologii. Zastosowano ją do syntezy (+)-epigalcatyny, stereoizomeru naturalnej (-)-galcatyny, który w przyrodzie nie występuje, a charakteryzuje się rzadko spotykaną konfiguracją *cis* podstawników w pierścieniu B. Podobnie jak w przypadku syntezy PPT, najpierw na drodze kondensacji Stobbeego przygotowany został odpowiedni szkielet węglowy, który po wstawieniu pomocnika chiralnego w postaci L-proliny stanowił substrat do fotocyklizacji wykonanej w warunkach przepływowych. Po usunięciu czynnika chiralnego i przeprowadzeniu modyfikacji strukturalnych udało się uzyskać produkt z grupami metylowymi przy C2 i C3 oraz podstawnikiem aromatycznym na C1 w konfiguracji *cis*. Kluczowe okazało się tu stereoselektywne uwodornienie wiązania podwójnego C3-C4 z jednoczesną redukcją grupy formylowej. Konfiguracje na centrach stereogenicznych określono analizując widma korelacyjne NMR.

Mechanizm fotocyklizacji fulgidów postulowany przez Hellera zakłada wzbudzenie grupy karbonylowej (przejście $\pi \rightarrow \pi^*$), co prowadzi do powstania luki elektronowej na węglu

benzylowym, a cyklizacja następuje na drodze konrotacji. Używane do fotocyklizacji pochodne benzylidenobursztynianu zawierały zwykle dwie grupy karbonylowe (bezwodnikowe, obie estrowe lub estrowa i amidowa), co mogło wpływać na stereoselektywność. Uzasadnione było zbadanie, czy w przypadku tylko jednej grupy C=O w substracie nie uda się osiągnąć lepszych rezultatów, pozostając przy stosowaniu L-proliny jako chiralnego pomocnika. Doktorant włożył wiele wysiłku w syntezę odpowiedniego substratu - makrolaktamu **254**, jednak wyniki fotocyklizacji z jego udziałem były dość nieoczekiwane. Jako produkt wyizolowano mieszaninę dwóch cyklolignanów, niestety obu w postaci racemicznej (w przeciwnych proporcjach, stosując różne w charakterze rozpuszczalniki - MeOH lub toluen). Niepowodzenie zostało wynagrodzone odkryciem, iż wiązanie amidowe może być hydrolizowane w sposób fotochemiczny, niestety dzieje się to zanim nastąpi fotocyklizacja. Eksperymentalnie potwierdzono, że reakcja ta zachodzi selektywnie dla III° amidów, pod wpływem światła widzialnego i może mieć aplikacje syntetyczne. Doktorant dokładnie przestudiował ograniczenia substratowe oraz zaproponował mechanizm tej rzadkiej reakcji.

Kolejnym wyzwaniem podjętym przez mgr Lisieckiego była próba otrzymania analogu podofilotoksyny z dodatkowym podstawnikiem metylowym na węglu C1, co mogłoby wpłynąć na poprawę oddziaływań z centrum aktywnym enzymów. W tym celu opracował sposób otrzymywania odpowiednio podstawionego chiralnego bisbenzylidynowego bursztynianu (**300**), zawierającego pierścień amidoestrowy z proliną. Po naświetlaniu w opracowanych wcześniej warunkach i wnikliwej analizie spektroskopowej produktu okazało się, że w tym przypadku cyklizacja biegnie inaczej niż w poprzednich przykładach. Jej mechanizm zaczyna się od wzbudzenia amidowej (nie estrowej jak poprzednio) grupy karbonylowej i prowadzi do cykloliganu o zupełnie innym układzie pierścieni niż w PPT. Budowę produktu i konfigurację na stereogennych atomach węgla ustalono na podstawie widm korelacyjnych NMR. Interesującym faktem w tych badaniach było odkrycie, że druga kondensacja Stobbego z ketonem prowadzi do jednego diastereoizomeru 2,3-bisbenzylidenobursztynianu o konfiguracji E, Z, co udało się ustalić rentgenograficznie. Również w tym przypadku doktorant zaproponował racjonalne wytłumaczenie tej obserwacji.

Wybrane cyklolignany oraz podofilotoksynę poddano dokładnym testom aktywności biologicznej. Intuicja badacza kazała mgr Lisieckiemu dołączyć do tych badań produkt **304**, łączący w sobie fragmenty podofilotoksyny oraz benzotiazolu – oba znane z właściwości przeciwnowotworowych. Badania przeprowadzono *in vitro* na liniach komórkowych szeregu nowotworów, porównując je z oddziaływaniami na tzw. komórki normalne. Uzyskane wyniki świadczą, że analizowane związki wykazują mniejszą cytotoksyczność w stosunku do zdrowych komórek niż PPT. Natomiast związek **304** okazał się o wiele aktywniejszy niż PPT względem większości przebadanych linii komórek nowotworowych.

Pracę uważam za naprawdę bardzo interesującą i starannie przygotowaną, jednak autor nie ustrzegł się kilku niedociągnięć. Mimo długości wykazu stosowanych skrótów nie wszystkie zastosowane w tekście się w nim znalazły (m. in. te ze str. 22), a TPPTS jest innym związkem na str. 49 niż w wykazie. Na Rys. 7. pomyłkowo zamienione zostały struktury związków A i B. Z opisu na str. 54 wynika, że związek 91 ma grupę OH na węglu C4, podczas, gdy na Schemacie 20. ma grupę C=O. Na podpisie do Rys. 40. jest nieściśle oznaczenie widma czystego związku 256. Na stronie 129 w tekście pomyłkowo wymieniono związek 264 jako 265. Pewną konfuzję spowodował różny wygląd (w tym numery stron) ostatniej z opublikowanych prac na dołączonej płycie i na stronie czasopisma. Kopia dołączona do dysertacji wyglądała raczej jak rozdział w monografii. Chyba lepiej było by to jakoś skomentować.

Jednak uchybienia te nie zmieniają mojej bardzo pozytywnej oceny przedstawionej pracy. Eksperymenty mgr Lisieckiego i osiągnięte rezultaty stanowią istotny wkład w badania nad otrzymywaniem cykloignanów. Oczywiście podofilotoksynę z powodzeniem syntetyzowano już wcześniej, jednak zastosowanie fotocyklizacji (zwłaszcza w warunkach przepływowych) wyraźnie upraszcza procedurę oraz nie wymaga stosowania kosztownych substratów i reagentów. Opracowana reakcja fotocyklizacji w przepływie została już na tyle zauważona, że na portalu *Organic Chemistry Portal* wskazano ją jako jedną z głównych metod konstrukcji układów karbocyklicznych.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa wyczerpująco spełnia w moim przekonaniu warunki stawiane pracom doktorskim w *Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym* z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. z 2003 r., poz. 595 z późniejszymi zmianami, tekst jednolity Dz. U. z 2017 r., poz. 1789) a także w *Ustawie* z dnia 3 lipca 2018 r. "*Przepisy wprowadzające ustawę - prawo o szkolnictwie wyższym i nauce*", (Dz.U. z 2018 r. poz.1669) oraz w *Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim* (Dz. U. z 2018 r. poz. 261), wobec tego wnoszę o dopuszczenie Pana mgr Kamila Lisieckiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Dodatkowo składam do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego wniosek o wyróżnienie przedstawionej rozprawy.



Dr hab. inż. Renata Siedlecka

Wrocław, 27.06.2019 r.

Rada Wydziału Chemii
Uniwersytetu Warszawskiego

Po szczegółowej ocenie przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej Pana mgr Kamila Lisieckiego składam wniosek o jej wyróżnienie.

Uzasadnienie:

Eksperymenty mgr Lisieckiego i osiągnięte rezultaty stanowią istotny wkład w badania nad otrzymywaniem cykloignanów – związków znanych ze swoich właściwości biologicznych. Podofilotoksynę z powodzeniem syntetyzowano już wcześniej, jednak zaproponowane przez doktoranta zastosowanie fotocyklizacji (zwłaszcza w warunkach przepływowych) wyraźnie upraszcza procedurę oraz nie wymaga stosowania kosztownych substratów i reagentów. Opracowana reakcja fotocyklizacji w przepływie została już na tyle zauważona, że na portalu *Organic Chemistry Portal* wskazano ją jako jedną z głównych metod konstrukcji układów karbocyklicznych. Rozprawa posiada więc istotne walory poznawcze oraz użytkowe.

Badania zebrane w dysertacji opisane zostały w sumarycznie w sześciu publikacjach: pięciu publikacjach w czasopiśmie z listy Filadelfijskiej, w których Pan Lisiecki jest pierwszym autorem oraz publikacji w roczniku *Review and Research on Cancer Treatment* wydawanym przez Fundację na Rzecz Promocji Nauki i Rozwoju z Lublina.

Moim zdaniem z naddatkiem wypełnia to wymagania stawiane pracom doktorskim.