

Prof. dr hab. Andrzej Kutner
Warszawski Uniwersytet Medyczny
Wydział Farmaceutyczny
Zakład Bioanalizy i Analizy Leków
Stefana Banacha 1, 02-097 Warszawa
tel. 22 57 20 726, e-mail: andrzej.kutner@wum.edu.pl
<http://analizalekow.wum.edu.pl/content/pracownicy>
<http://orcid.org/0000-0002-9518-4142>

Warszawa, 13 stycznia 2021

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr Adriana Fabisiaka
p.t. „Synteza analogów 1 α ,25-dihydroksy-19-norwitaminy D₃ ze zmodyfikowanym
pierścieniem A”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Adriana Fabisiaka została wykonana pod kierunkiem Prof. dr hab. Rafała Sicińskiego, jako promotora. Zespół Profesora Sicińskiego zajmuje znaczące miejsce na mapie najważniejszych na świecie ośrodków naukowych prowadzących badania w dziedzinie syntezy aktywnych analogów witamin z grupy D, obok takich zespołów jak grupa Prof. Antonio Mourino, z University of Santiago de Compostela i grupa Prof. Susan Fernandez z University of Oviedo w Hiszpanii oraz grupa Prof. Atsushi Kittaka z Teikyo University i grupa Prof. Keiko Yamamoto z Showa Pharmaceutical University w Japonii. Wysoki poziom badań doktoranta, przedstawionych w rozprawie doktorskiej, jest w znacznym stopniu wynikiem jego pracy w zespole naukowym o światowej renomie. W zespole Prof. Sicińskiego prowadzone są od szeregu lat z dużym powodzeniem syntezy analogów witamin D zmodyfikowanych w starannie wybranych miejscach cząsteczki. Badania te doprowadziły m.in. do odkrycia szczególnie korzystnej modyfikacji w pierścieniu A cząsteczki witaminy D, polegającej na formalnym przeniesieniu egzocyklicznej grupy metylenowej C-19 z położenia przy atomie węgla C-10 do położenia przy C-2. Modyfikacja ta wynikała z analizy strukturalnej domeny receptora witaminy D (vitamin D receptor, VDR) wiążącej ligand witaminowy i ze stwierdzenia niszy hydrofobowej w otoczeniu C-2. Wypełnienie tej niszy grupą metylenową znacznie poprawiło powinowactwo tak zmodyfikowanych analogów do VDR i w konsekwencji doprowadziło do opracowania substancji czynnej leku. Z tego typu przełomowych wyników badań zespołu korzystał również doktorant w celu zaprojektowania nowych modyfikacji strukturalnych pierścienia A w celu uzyskania korzystnego efektu aktywności biologicznej nowych analogów.

Badania doktoranta dotyczą cyklicznego fragmentu strukturalnego cholecalciferolu, który jest obecnie obiektem dużego zainteresowania szeregu zespołów badawczych. Badania doktoranta wpisują się w ważny obszar światowych badań o wysokim poziomie nowości naukowej. W ten sposób mają one istotne znaczenie dla rozszerzenia wiedzy w dziedzinie zależności pomiędzy strukturą a aktywnością w tej grupie związków, jako potencjalnych

substancji czynnych leków o zróżnicowanym profilu aktywności terapeutycznej. Zakres i temat rozprawy doktorskiej został więc wybrany odpowiednio, a badania zostały przeprowadzone przez doktoranta znajdują się w centrum zainteresowań w tej dziedzinie.

Zgodnie z wymaganiami, rozprawa doktorska ma klasyczny układ i zawartość. Poprzedza ją spis publikacji doktoranta, w których zostały opisane najważniejsze wyniki jego badań. Doktorant jest pierwszym autorem trzech publikacji oraz kolejnym autorem czterech publikacji w czasopismach o zasięgu międzynarodowym i o względnie wysokim lub bardzo wysokim współczynniku oddziaływania IF oraz punktacji MNiSW (*Bioorganic Chemistry* IF 4,8 MNiSW 100 pkt; *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* IF 3,8 MNiSW 100 pkt; *International Journal of Molecular Sciences* IF 4,6 MNiSW 140 pkt i *Molecules* IF 3,0, MNiSW 100 pkt). W czasopismach tych są zamieszczone m.in., publikacje ze światowych konferencji „Vitamin D Workshop” oraz licznych konferencji on-line w dziedzinie syntezy i aktywności biologicznej witamin D. Dołączenie do drugiej i trzeciej publikacji doktoranta szczegółowego opisu części doświadczalnej w postaci Supplementary Information, znacznie poprawiłoby ich walory naukowe.

Wartość badań syntetycznych doktoranta jest tym większa, że zbadana została podstawowa aktywność biologiczna otrzymanych przez niego analogów, tzn. powinowactwo analogów do VDR oraz aktywność w hamowaniu proliferacji wybranych linii komórek nowotworowych. Doktorant wyraźnie zaznacza w rozprawie, że badania biologiczne wykonał wspólnie z inną osobą, mgr Klaudią Berkowską, doktorantką w zespole Prof. Ewy Marcinkowskiej na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego, a badania cytotoksyczności otrzymanych przez doktoranta kompleksów platyny wykonała oddzielnie dr Lucie Rarova z Institute of Experimental Botany of the Czech Academy of Sciences & Palacky University.

Wyniki badań własnych doktorant przedstawił na licznych międzynarodowych konferencjach naukowych, jednych z najważniejszych w ostatnim czasie na świecie w jego dziedzinie badań (20th Workshop on Vitamin D, 2017, Orlando; 21st Workshop on Vitamin D, 2018, Barcelona i 22nd Workshop on Vitamin D, 2019, Nowy Jork oraz 18th Tetrahedron Symposium, 2017, Budapeszt i 19th Tetrahedron Symposium, 2018, Riva del Garda, Włochy), a także na 24th Conference on Isoprenoids, 2018, w Białymstoku.

Rozprawa doktorska ma odpowiednie rozmiary i właściwe proporcje. Przedstawiono ją w typowych częściach: Summary, Wstęp, Badania własne, Podsumowanie, Część eksperymentalna i Literatura cytowana. Zwraca uwagę bardzo szczegółowy spis treści, ułatwiający dostęp do poszczególnych części pracy, obszerny i kompletny wykaz stosowanych skrótów, a także, umieszczone na końcu Podsumowania, zestawienie schematów wszystkich syntez. Właściwą rozprawę poprzedza jednostronicowe Summary napisane poprawnie w języku angielskim. Doktorant przedstawia w nim kolejne fragmenty pracy, od wstępu, poprzez opis stanu literatury i na jej podstawie dokonanie wyboru obiektów syntetycznych, poprzez projekt i wykonanie syntezy oraz przedstawienie wyników badania aktywności biologicznej otrzymanych analogów.

We Wstępie (cz. 1) doktorant bardzo klarownie uzasadnił przyczyny wyboru modyfikacji analogów witamin D właśnie w pierścieniu A, jako obiekty swoich badań. W

ogólnym Wstępie (cz. 1) doktorant przedstawił krótką historię badań nad witaminami D, drogi ich metabolicznej aktywacji i deaktywacji, według aktualnego stanu wiedzy. We Wstępie szczegółowym (cz. 2) doktorant podsumował wszystkie znane modyfikacje witaminy D w interesującym go fragmencie cząsteczki. W tej części doktorant ciekawie przedstawia początki badań nad witaminą D oraz doświadczenia prowadzące do jej zidentyfikowania, od czasu badań objawowych nad przyczynami krzywicy, nazywanej wówczas chorobą angielską. Opisuje prace badaczy angielskich nad przyczynami i sposobami zapobiegania i zwalczania tej choroby, na długo przed odkryciem samej witamin D. Niestety, w tej części rozprawy doktorant nie wspomina o zasługach w tym zakresie Profesora Jędrzeja Śniadeckiego, z Wydziału Chemii Uniwersytetu Stefana Batorego w Wilnie. Zasługi te przypomniał w naszym stuleciu jako pierwszy, paradoksalnie, Michael Holick z Boston University Hospital, badający od lat przemiany fotochemiczne steroli prowadzące do witaminy D. Po nim zasługi Profesora Śniadeckiego w badaniu przyczyn, sposobu zapobiegania i leczenia krzywicy opisano w licznych publikacjach przeglądowych. Warto więc przypomnieć, że to właśnie Jędrzej Śniadecki, jako pierwszy na świecie, na pół wieku przed lekarzem brytyjskim, wskazał w swojej pracy „O fizycznym wychowaniu dzieci” (Wilno 1822), na nasłonecznienie, jako sposób na leczenie i zapobieganie choroby angielskiej.

W cz. 3 Wstępu doktorant opisuje dokładnie biosyntezę i przemiany metaboliczne witaminy D. W opisie hormonalnego działania witaminy D zabrakło jednak ważnej informacji, że 1,25-dihydroksycholecalciferol [$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$] jest uznawany za hormon nie tylko dlatego, że działa poprzez receptor ulokowany w jądrze komórkowym, ale i dlatego, że powstanie calcitriolu następuje w sposób „hormonalny”, czyli w wyniku hydroksylacji nieaktywnej witaminy D w innych miejscach organizmu niż to, w którym powstaje sama witamina D, czyli głównie w komórkach kanalikowych nerek i mikrosomach komórek wątroby. W cz.4 Wstępu doktorant opisuje bardzo szczegółowo strukturę VDR, a w szczególności domenę wiążącą ligand, jakim jest aktywna forma witaminy D. Przedstawia też oddziaływania molekularne VDR z analogami witamin D i receptorem witaminy A, prowadzące do utworzenia odpowiedniego heterodimeru. Te szczegółowe rozważania literaturowe, głównie na podstawie badań krystalograficznych z lat 2000-2001, są w pełni uzasadnione z tego powodu, że doktorant wykonał również podstawowe badania biologiczne swoich analogów na ich powinowactwo do VDR. Doktorant nie wspomina jednak o tym, że aktualne poglądy na temat struktury VDR, w tym i samego autora tej struktury, prof. Dino Moras z Department of Biology and Structural Genomics of INSERM, istotnie odbiegają od pierwotnej koncepcji. Wątpliwości dotyczą wiarygodności modelu rekombinowanego receptora, (tzw. hVDR Δ), z usuniętym ogromnym fragmentem wiążącym ze sobą dwie główne domeny receptora, który utrudniał krystalizację naturalnego VDR. W tej części rozprawy brak odwołania do publikacji samego Prof. Dino Moras z ostatnich lat jego badań, tzn. 2010-2014 oraz późniejszych prac jego głównej współpracownicy (dr Natacha Rochel). W pracach tych Prof. Moras przyznaje, że opracowany przez jego zespół rekombinowany receptor hVDR Δ , pozbawiony dużej domeny wiążącej, najprawdopodobniej istotnie różni się jednak strukturalnie od naturalnego pełnego VDR. Z tego względu, dane eksperymentalne dotyczące powinowactwa do VDR mogą istotnie odbiegać od wartości oczekiwanych dla nowych analogów i zaprojektowanych w oparciu o strukturę sztucznego receptora. Doktorant również przekonał się o tym w swoich badaniach 2-

alkyldenowych analogów 19-*nor*-1,25(OH)₂D₃, opisanych w publikacji nr 2. Dla tych analogów, wykonane prawidłowo przez doktoranta dokowanie przewidywało istotne powinowactwo do receptora, czego nie potwierdziły wyniki doświadczalne doktoranta. W cz. 5 Wstępu doktorant opisał dane literaturowe dotyczące analizy konformacyjnej pierścienia A cząsteczki witaminy D, który to fragment był obiektem jego badań i modyfikacji strukturalnych. W cz. 6 Wstępu doktorant przedstawił podstawy literaturowe swoich badań syntetycznych, czyli najważniejsze metody syntezy analogów 1,25(OH)₂D₃ pozbawionych grupy 19-metylenowej. Bardzo ciekawe jest graficzne podsumowanie strategii syntezy na opracowanym przez doktoranta diagramie kołowym (Rysunek 10). Podsumowanie to obejmuje zarówno klasyczne metody syntezy, takie jak reakcja Wittiga-Homera czy olefinowanie Julia sulfonów fenylowych i jego zmodyfikowaną wersję z użyciem sulfonów benzotiazolowych, a także nowsze metody syntezy, wykorzystujące terminalne alkiyny czy kondensację Suzuki-Miyaura. Doktorant opisuje również dogodne metody syntezy fragmentu pierścienia A z surowców naturalnych, na zasadzie przeniesienia chiralności, oraz z prekursorów acyklicznych z wykorzystaniem zamykającej pierścień metatezy olefin. Analizuje zarówno aspekty stereochemiczne procesów łączenia fragmentów i symetrii syntonów pierścienia A, jak i zagadnienia praktyczne związane ze stabilnością otrzymanych półproduktów i wydajnością poszczególnych etapów. Ciekawie koreluje strukturę opisanych analogów pierścienia A z ich powinowactwem do VDR i aktywnością biologiczną w standardowym teście różnicowania komórek białaczki promielocytarnej HL-60. Doktorant dokonał również podsumowania badań w tej dziedzinie przeprowadzonych dotychczas w zespole jego promotora przez poprzednich doktorantów. Przedstawiona przez doktoranta krytyczna analiza stanu wiedzy w tej dziedzinie oraz jej podsumowanie jest na tyle precyzyjna i kompleksowa, że może stanowić przedmiot oddzielnej publikacji przeglądowej.

W Cz. 8. „Badania Własne”, doktorant opisał i uzasadnił wybór obiektu swoich badań syntetycznych, analogów 19-*nor*-1,25(OH)₂D₃ zmodyfikowanych wyłącznie w pierścieniu A przy C-2 jako czynników antyproliferacyjnych i nośników cytostatyków. Ta nowatorska koncepcja wykorzystania analogu do celowanego transportu cytostatyku do komórki nowotworowej nie była dotychczas opisana. Istotną nowością rozprawy jest więc zaprojektowanie i otrzymanie analogów zdolnych do tworzenia połączeń kowalencyjnych z cytostatykami z grupy pochodnych platyny Pt(II). Doktorant zaprojektował strukturę analogów, które, w połączeniu z receptorem VDR powinny być zdolne do transportowania cytostatyków do wnętrza komórki. Koncepcja ta zakładała skierowanie i akumulację cytostatyku szczególnie w komórkach nowotworowych, wykazujących silną ekspresję VDR oraz jego działanie synergistyczne z samym analogiem 19-*nor*-1,25(OH)₂D₃. W sposób bardzo przekonujący doktorant uzasadnił wybór sposobu tworzenia połączenia z platyną w oparciu o teorię Pearsona twardych i miękkich kwasów i zasad. Do realizacji planu badań konieczne było opracowanie metody syntezy nowego syntonu pierścienia A, przeznaczonego do konstrukcji C-2 modyfikowanych analogów. W swoich projektach doktorant wykorzystał wyniki badań poprzednio uzyskanych w zespole i dotyczących analogów zawierających również podstawniki alkyldenowe w położeniu C-2. Na podstawie danych literaturowych doktorant zaprojektował wykorzystanie naturalnego aminokwasu siarkowego i kwasu dikarboksylowego do utworzenia połączenia z platyną Pt(II). Do zaprojektowania *in silico* oddziaływań

projektowanych związków z VDR doktorant zastosował ogólnie dostępne metody modelowania molekularnego oraz dokowanie projektowanych analogów do VDR. Obliczenia zoptymalizowanych geometrii i energii sterycznych doktorant wykonał zgodnie z odpowiednim algorytmem dla oprogramowania MM+ programu HyperChem. Globalne minimum wybranych konformerów zostało następnie zminimalizowane energetycznie w programie PCModel. Otrzymane w ten sposób struktury zostały wykorzystane w eksperymentach dokowania do kieszeni wiążącej VDR z wykorzystaniem programu Molegro Virtual Docker. Dla badanych analogów wybrano struktury charakteryzujące się najsilniejszym oddziaływaniem z VDR z uwagi na ilość i siłę oddziaływania obserwowanych wiązań wodorowych. Postępowanie doktoranta, z wykorzystaniem popularnych i zaawansowanych programów do modelowania molekularnego jest całkowicie poprawne metodologicznie i wykorzystuje najlepsze ogólnie dostępne oprogramowanie. Ma wysoką rangę poznawczą i jest kształcące naukowo. Doprowadziłoby ono z pewnością do zaprojektowania analogów o rzeczywistym wysokim powinowactwie do VDR i prawdopodobnie o znaczącej aktywności biologicznej, gdyby możliwe było wykorzystanie w tych pracach, nadal niedostępnej, struktury krystalograficznej naturalnego VDR o pełnym łańcuchu aminokwasowym. Z uwagi na brak takiej struktury, doktorant opierał się w swoich badaniach o fragmentaryczną strukturę krystalograficzną domeny VDR wiążącej ligand. Jak wspomniano powyżej, wyniki modelowania komputerowego w oparciu o strukturę rekombinowanego ludzkiego hVDRA często nie wykazują oczekiwanej zgodności z wynikami doświadczalnymi. To właśnie mogło być również przyczyną rozbieżności obserwowanych przez doktoranta.

W opisie syntezy 19-*nor* analogów doktorant bardzo starannie przedstawia i uzasadnia wybór stosowanych strategii i metod, w oparciu o dane literaturowe i wcześniejsze doświadczenia zespołu. Wyjaśnia związane z prowadzonymi procesami mechanizmy reakcji, sposoby izolacji, oczyszczania i identyfikacji oraz potwierdzenia struktur nowych związków różnymi metodami spektroskopowymi. W badaniach wykorzystuje, szczegółowo wyjaśnia i odpowiednio interpretuje zaawansowane techniki analityczne np. zjawisko jądrowego efektu Overhausera, czy też dwuwymiarowe widma ^1H NOESY do identyfikacji izomerów geometrycznych nowych związków. Syntezę syntonu A doktorant przeprowadził ze stosowanego w zespole w tym celu kwasu chinowego metodami literaturowymi. Szczegółowo opisał i uzasadnił schemat przekształceń prowadzących do otrzymania syntonu pierścienia A z opisem i uzasadnieniem stosowanych transformacji strukturalnych i doбором odpowiednich grup zabezpieczających. W łączeniu otrzymanego syntonu z fragmentem CD doktorant wykorzystał klasyczną metodę zmodyfikowanej reakcji Julia odpowiedniego sulfonu benztiazolowego z ketonem syntonu pierścienia A. Wadą tej metody jest jej brak selektywności geometrycznej. Stąd doktorant otrzymał dwa izomeryczne produkty, których geometrię poprawnie zidentyfikował zaawansowanymi metodami rezonansu magnetycznego. Ustalił także nową i bardzo ciekawą zależność aktywności biologicznej od geometrii E/Z analogu i wykorzystał tę nową zależność w projektowaniu kolejnych nowych analogów. Aminowe pochodne 19-*nor* związków doktorant wykorzystał w dalszej w syntezie dywergentnej i skutecznie wprowadził do łańcucha alkilidenu w pierścieniu A dwa ugrupowania, które powinny być zdolne do tworzenia połączeń ze związkami platyny(II): kwas bursztynowy i *L*-metioninę. Staranne posługiwanie się grupami zabezpieczającymi oraz

odpowiednio uzasadniony i bardzo udany wybór Fmoc jako grupy zabezpieczającej pozwolił na efektywne otrzymanie końcowych analogów odpowiednio podstawionych na C-2. Dokonany uprzednio przez doktoranta szeroki wybór analogów teoretycznie zdolnych do przyłączenia platyny okazał się bardzo uzasadniony. Z serii tych związków połączenie kowalencyjne z Pt(II) utworzyły jedynie analogi posiadające resztę naturalnego aminokwasu. W ten sposób doktorant otrzymał pierwsze dwa analogi tworzące wiązania kowalencyjne z Pt(II). Z przyczyn przedstawionych powyżej, wszystkie otrzymane przez doktoranta analogi alkylidenu wykazały znacznie obniżone powinowactwo do VDR. Otrzymane wyniki powinowactwa doktorant starannie przeanalizował i z otrzymanych wyników wyciągnął poprawne wnioski dotyczące dalszych modyfikacji strukturalnych. Zgodne z aktualną wiedzą w sztuce i intuicją jest wnioskowanie doktoranta, że podstawnik zawierający związek Pt(II) powinien być wprowadzony w innym miejscu cząsteczki niż przy C-2. Doktorant poprawnie wnioskuje, że podstawnik ten może być dołączony np. przy grupie hydroksylowej na C-3, wnoszącej jedynie niewielki wkład w wiązanie z VDR albo, co wydaje się szczególnie uzasadnione, w łańcuchu bocznym, wokół którego w kieszeni wiążącej ligand jest ogromna wolna przestrzeń. Tak więc, doktorant zgodnie ze standardami światowymi w tej dziedzinie, przeprowadza zarówno projektowanie *a priori* i wykonuje skomplikowane modelowania *in silico*, jak i projektowanie *a posteriori*, na podstawie uzyskanych wyników badań biologicznych *in vitro*. Dodatkowo, wykorzystanie pośrednich wyników badań biologicznych, w trakcie prowadzenia prac syntetycznych, wskazuje na nowoczesny sposób prowadzenia badań naukowych przez doktoranta i zasługuje na szczególne podkreślenie.

Na podstawie wyników badań biologicznych opisanych w głównej części rozprawy doktorant dodatkowo zaprojektował i opracował stereoselektywną syntezę fragmentu pierścienia A, zawierającego podstawnik winylowy przy C-3 o orientacji alfa i geminalny w stosunku do naturalnego hydroksylu przy C-3. Fragment ten, zawierający ugrupowanie pinakoloboranowe, stanowi punkt wyjścia nie tylko do nowych analogów zmodyfikowanych na C-3, ale też pewnie do wprowadzenia w przyszłości w zespole nowoczesnej metody kondensacji Suzuki-Miyaura, w miejsce klasycznej reakcji Wittiga-Hornera kondensacji pierścienia A i fragmentu pierścieni CD.

Wyniki prac syntetycznych, wraz z opisem modelowania molekularnego i syntezą fragmentów budulcowych, doktorant przedstawił przejrzysto i klarownie w części Badań własnych oraz zebrał w Podsumowaniu. Doktorant przedstawił konsekwentnie nie tylko przebieg syntez, ale też i przekonujące uzasadnienie wyboru zsyntetyzowanych struktur. W bardzo żywym opisie badań własnych doktorant przedstawia dyskusję wybranych metod syntezy oraz nie tylko wyniki pozytywne, ale też i niekorzystne wyniki syntez, jak w przypadku wykorzystania reakcji Williamsona tworzenia przy C-2 łańcuchów eterowych o zróżnicowanej długości. W celu uzyskania oczekiwanych wyników doktorant dokonał wielokrotnej optymalizacji tego procesu, aż do uzyskania odpowiednich wydajności w końcowych stadiach wieloetapowych syntez. W pracach syntetycznych doktorant wyciąga odpowiednie wnioski z uzyskanych wyników tak, że zmienione metody i drogi syntezy doprowadzają do zamierzonego celu. W syntezie fragmentów strukturalnych i analogów doktorant wykorzystał zarówno metody dotychczas stosowane w zespole jak i nowe metody łączenia fragmentów A i CD oraz dodatkowego łańcucha przy C-2.

Część eksperymentalna jest przygotowana również bardzo starannie. Doktorant podał zarówno nazwy systematyczne otrzymanych związków, jak i nazwy prowadzonych procesów. Opisał bardzo szczegółowo warunki prowadzenia syntez i wykonania analiz. Podał charakterystyki otrzymanych związków wraz z ich wzorami strukturalnymi, co znakomicie ułatwia zapoznanie się z tą częścią pracy. Opisy syntez są mocno skondensowane i wykonane perfekcyjnie, w stylu publikacyjnym. Wszystkie otrzymane związki są scharakteryzowane przez zestaw analiz spektroskopowych ^1H i ^{13}C NMR. Dla wielu związków doktorant podał temperatury topnienia, wskazujące na ich wysoką czystość, dla związków chiralnych wartości skręcalności właściwej, a dla wszystkich wyliczone i uzyskane wartości HRMS jonów molekularnych. Interpretacja widm ^1H i ^{13}C NMR jest precyzyjna i kompletna. Przedstawiony materiał doświadczalny jest niezwykle wiarygodny, a sposób przedstawienia bardzo przejrzysty. Prawidłowe jest też nazewnictwo IUPAC wszystkich związków i analogów.

Bibliografia jest wystarczająco obszerna, liczy ponad 120 pozycji i obejmuje starannie wybrane najważniejsze publikacje związane z tematyką pracy, głównie jednak z pierwszej dekady tego stulecia i wcześniejsze.

Zwraca uwagę fakt, że badania naukowe doktoranta były finansowane w ramach grantów NCN: „Nowe steroidowe kompleksy platyny o potencjalnym zastosowaniu w medycynie” (OPUS 8 NCN2014/15/B/ST5/02129), w którym doktorant był głównym wykonawcą, „Synteza analogów 1-hydroksywitaminy D_3 ze zmodyfikowanym pierścieniem A” (ETIUDA 7 NCN 2019/32/T/ST4/00575), w którym doktorant był kierownikiem oraz częściowo w ramach grantu „Nowe analogi kalcetriolu o nienaturalnym pierścieniu D” (PRELUDIUM 16 NCN 2018/31/N/ST5/01679), w którym doktorant był również kierownikiem.

Niemłym obowiązkiem recenzenta jest wskazanie niedoskonałości i ewentualnych uchybień rozprawy. W przypadku rozprawy doktorskiej mgr Fabisiaka było to zadanie szczególnie trudne i zakończone umiarkowanym powodzeniem, jako że poważnych uchybień nie udało się znaleźć, a te drobne okazały się bardzo nieliczne. Recenzent nie znajduje w pracy komentarza doktoranta do intrygującego wyniku bardzo wysokiej wartości współczynników ekstynkcji nowych analogów z nietypowym układem dienowym, ponad dwukrotnie wyższej od odpowiednich wartości dla naturalnych witamin D.

Wydaje się, że dla swoich końcowych analogów zawierających Pt(II) doktorant używa zbyt wielu określeń (analog, związek, koniugat, kompleks), chociaż wszystkie są poprawne.

W rozprawie chemicznej recenzenci zazwyczaj podnoszą również zagadnienia nomenklaturowe. Nie chciałbym być w tym zakresie wyjątkiem, więc pozwolę sobie zwrócić uwagę na fakt, że w rozprawie chemicznej powinno się używać nazw chemicznych, w tym przypadku np. 1,25-dihydroksycholekalcyferolu, w skrócie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ lub nawet $1,25\text{D}_3$. Nie jest odpowiednie używanie nazwy zwyczajowej kalcetriol, która nie jest nazwą chemiczną lecz tzw. International Nonproprietary Name. Stąd stosowana przez doktoranta nazwa 19-norkalcetriol, (zamiast 19-nor- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) jako połączenie przedrostka chemicznego z nazwą zwyczajową, stosowana wprawdzie w publikacjach doktoranta, chociaż wygodna, nie jest jednak poprawna. Nie są również poprawne, stosowane w Części doświadczalnej, nazwy zawierające określenia różnych podstawników łączone z nazwą zwyczajową „witamina D_3 ”, zamiast z nazwą chemiczną „cholekalcyferol”.

W swych rozlicznych syntezach doktorant otrzymał cały szereg nowych związków chiralnych, w tym diastereomerycznych fragmentów strukturalnych i nowych analogów, często we względnie dużych ilościach miligramowych, dla których podał temperatury topnienia, czyli że zostały otrzymane w postaci krystalicznej. Ich strukturę najlepiej potwierdziłyby badania dyfrakcji rentgenowskiej, których niestety nie wykonano, pewnie z uwagi na brak odpowiedniej jakości monokryształów. Nie jest również zrozumiałe, dlaczego opis wykonania doświadczeń biologicznych, chociaż bardzo precyzyjny, znalazł się w części Badań własnych, a nie w Części doświadczałnej.

Należy jednak podkreślić, że wszystkie te drobne uchybienia w niczym nie umniejszają bardzo wysokiej wartości merytorycznej wykonanych badań oraz równie wysokiego poziomu ich prezentacji w rozprawie doktorskiej.

Pomimo tego, że kolejne publikacje doktoranta były recenzentowi wcześniej znane, to samą rozprawę doktorską czyta się z niemalym zainteresowaniem i prawdziwą przyjemnością. Nieczęsto się zdarza, aby rozprawa była napisana tak ciekawie, w postaci relacji z rozwoju koncepcji, zarówno przed jak i w trakcie prowadzenia badań, projektowania kolejnych fragmentów badań oraz twórczego analizowania uzyskanych wyników, które prowadzi do skutecznego pokonania rozlicznych trudności. Ten sposób przedstawienia rozprawy świadczy o rozległej wiedzy syntetycznej i determinacji młodego badacza do osiągnięcia zamierzonych celów. W podsumowaniu należy stwierdzić, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska opisuje bardzo obszerny zakres starannie zaprojektowanych, wykonanych i opisanych prac syntetycznych i modelowych. Przedstawia syntezy ponad 220 głównie nowych związków chemicznych na ponad 70 schematach, wielu tabelach i rysunkach. Spełnia nie tylko wysokie standardy krajowe, ale i międzynarodowe, w tym znane recenzentowi wymagania stawiane rozprawom doktorskim na uczelni hiszpańskiej (University of Santiago de Compostela) i brytyjskiej (The University of Birmingham).

Z tego względu z pełnym przekonaniem stwierdzam, że dorobek publikacyjny i konferencyjny doktoranta oraz przedstawiona do recenzji rozprawa znakomicie spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Składam więc Wysokiej Radzie Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego mój wniosek o dopuszczenie mgr Adriana Fabisiaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, z uwagi na nowatorską koncepcję i bardzo wysoki poziom badań stanowiących przedmiot rozprawy oraz sposób ich przedstawienia w samej rozprawie oraz w formie komunikatów na najważniejszych konferencjach międzynarodowych i licznych publikacjach w prestiżowych czasopismach naukowych, a także przeprowadzenie większej części badań w ramach własnych grantów NCN, w osobnym dokumencie składam wniosek do Rady Dyscypliny Naukowej Wydziału Chemii UW o wyróżnienie.

Prof. dr hab. Andrzej Kutner

Prof. dr hab. Andrzej Kutner
Warszawski Uniwersytet Medyczny
Wydział Farmaceutyczny
Zakład Bioanalizy i Analizy Leków
ul. Stefana Banacha 1, 02-097 Warszawa

Warszawa, 13 stycznia 2021

Rada Dyscypliny Naukowej
Wydział Chemii
Uniwersytet Warszawski
ul. Ludwika Pasteura 1
02-093 Warszawa

***Wniosek o wyróżnienie
rozprawy doktorskiej mgr Adriana Fabisiaka
p.t. „Synteza analogów 1 α ,25-dihydroksy-19-norwitaminy D₃ ze zmodyfikowanym
pierścieniem A”***

Badania doktoranta dotyczą cyklicznego fragmentu strukturalnego 1,25-dihydroksycholecalciferolu [1,25(OH)₂D₃], który jest obecnie obiektem dużego zainteresowania szeregu zespołów badawczych. Badania te wpisują się w ważny obszar światowych badań o wysokim poziomie nowości naukowej.

W rozprawie doktorant opisał i uzasadnił wybór obiektu swoich badań syntetycznych, analogów 19-nor-1,25(OH)₂D₃ zmodyfikowanych w pierścieniu A przy C-2 jako czynników antyproliferacyjnych i nośników cytostatyków. Ta nowatorska koncepcja wykorzystania analogu do celowanego transportu cytostatyku do komórki nowotworowej nie była dotychczas opisana. Istotną nowością rozprawy jest więc zaprojektowanie i otrzymanie analogów zdolnych do tworzenia połączeń kowalencyjnych z cytostatykami z grupy pochodnych platyny Pt(II). Doktorant zaprojektował strukturę analogów, które, w połączeniu z receptorem VDR powinny być zdolne do transportowania cytostatyków do wnętrza komórki. Koncepcja ta zakładała skierowanie i akumulację cytostatyku szczególnie w komórkach nowotworowych, wykazujących silną ekspresję VDR oraz jego działanie synergistyczne z samym analogiem 19-nor-1,25(OH)₂D₃. W sposób bardzo przekonujący doktorant uzasadnił wybór sposobu tworzenia połączenia z platyną w oparciu o teorię Pearsona twardych i miękkich kwasów i zasad. Do realizacji planu badań doktorant opracował metody syntezy nowego syntonu pierścienia A, przeznaczonego do konstrukcji C-2 modyfikowanych analogów. Na podstawie danych literaturowych doktorant zaprojektował wykorzystanie naturalnego aminokwasu siarkowego i kwasu dikarboksylowego do utworzenia połączenia z platyną Pt(II). Do zaprojektowania *in silico* oddziaływań projektowanych związków z VDR doktorant zastosował ogólnie dostępne metody modelowania molekularnego oraz dokowanie projektowanych analogów do VDR. Obliczenia zoptymalizowanych geometrii i energii sterycznych doktorant wykonał zgodnie z odpowiednim algorytmem dla oprogramowania MM+ programu HyperChem. Globalne minimum wybranych konformerów zostało następnie zminimalizowane

energetycznie w programie PCModel. Otrzymane w ten sposób struktury zostały wykorzystane w eksperymentach dokowania do kieszeni wiążącej VDR z wykorzystaniem programu Molegro Virtual Docker. Dla badanych analogów wybrano struktury charakteryzujące się najsilniejszym oddziaływaniem z VDR z uwagi na ilość i siłę oddziaływania obserwowanych wiązań wodorowych.

W opisie syntezy 19-*nor* analogów doktorant bardzo starannie przedstawia i uzasadnia wybór stosowanych strategii i metod, w oparciu o dane literaturowe i wcześniejsze doświadczenia zespołu. Wyjaśnia związane z prowadzonymi procesami mechanizmy reakcji, sposoby izolacji, oczyszczania i identyfikacji oraz potwierdzenia struktur nowych związków różnymi metodami spektroskopowymi. W badaniach wykorzystuje, szczegółowo wyjaśnia i odpowiednio interpretuje zaawansowane techniki analityczne.

Otrzymane wyniki powinowactwa analogi alkylidenowe receptora VDR doktorant starannie przeanalizował i z otrzymanych wyników wyciągnął poprawne wnioski dotyczące dalszych modyfikacji strukturalnych. Zgodne z aktualną wiedzą w sztuce i intuicją jest wnioskowanie doktoranta, że podstawnik zawierający związek Pt(II) powinien być wprowadzony w innym miejscu cząsteczki niż przy C-2. Doktorant poprawnie wnioskuje, że podstawnik ten może być dołączony np. przy grupie hydroksylowej na C-3, wnoszącej jedynie niewielki wkład w wiązanie z VDR albo, co wydaje się szczególnie uzasadnione, w łańcuchu bocznym, wokół którego w kieszeni wiążącej ligand jest ogromna wolna przestrzeń. Tak więc, doktorant zgodnie ze standardami światowymi w tej dziedzinie, przeprowadza zarówno projektowanie *a priori* i wykonuje skomplikowane modelowania *in silico*, jak i projektowanie *a posteriori*, na podstawie uzyskanych wyników badań biologicznych *in vitro*. Dodatkowo, wykorzystanie pośrednich wyników badań biologicznych, w trakcie prowadzenia prac syntetycznych, wskazuje na nowoczesny sposób prowadzenia badań naukowych przez doktoranta i zasługuje na szczególne podkreślenie.

Doktorant przedstawił konsekwentnie nie tylko przebieg syntez, ale też i przekonujące uzasadnienie wyboru zsyntetyzowanych struktur. W bardzo żywym opisie badań własnych doktorant przedstawia dyskusję wybranych metod syntezy oraz nie tylko wyniki pozytywne, ale też i niekorzystne wyniki syntez, jak w przypadku wykorzystania reakcji Williamsona tworzenia przy C-2 łańcuchów eterowych o zróżnicowanej długości. W celu uzyskania oczekiwanych wyników doktorant dokonał wielokrotnej optymalizacji tego procesu, aż do uzyskania odpowiednich wydajności w końcowych stadiach wieloetapowych syntez. W pracach syntetycznych doktorant wyciąga odpowiednie wnioski z uzyskanych wyników tak, że zmienione metody i drogi syntezy doprowadzają do zamierzonego celu. W syntezie fragmentów strukturalnych i analogów doktorant wykorzystał zarówno metody dotychczas stosowane w zespole jak i nowe metody łączenia fragmentów A i CD oraz dodatkowego łańcucha przy C-2.

Doktorant jest pierwszym autorem trzech publikacji oraz kolejnym autorem czterech publikacji w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym i o względnie wysokim lub bardzo wysokim współczynniku oddziaływania IF oraz punktacji MNiSW (*Bioorganic Chemistry* IF 4,8 MNiSW 100 pkt; *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* IF 3,8 MNiSW 100 pkt; *International Journal of Molecular Sciences* IF 4,6 MNiSW 140 pkt i *Molecules* IF 3,0, MNiSW 100 pkt).

Wyniki badań własnych doktorant przedstawił na licznych międzynarodowych konferencjach naukowych, jednych z najważniejszych w ostatnim czasie na świecie w jego dziedzinie badań (20th Workshop on Vitamin D, 2017, Orlando; 21st Workshop on Vitamin D, 2018, Barcelona i 22nd Workshop on Vitamin D, 2019, Nowy Jork oraz 18th Tetrahedron Symposium, 2017, Budapeszt i 19th Tetrahedron Symposium, 2018, Riva del Garda, Włochy), a także na 24th Conference on Isoprenoids, 2018, w Białymstoku.

Zwraca uwagę fakt, że badania naukowe doktoranta były finansowane w ramach grantów NCN: „Nowe steroidowe kompleksy platyny o potencjalnym zastosowaniu w medycynie” (OPUS 8 NCN2014/15/B/ST5/02129), w którym doktorant był głównym wykonawcą, „Synteza analogów 1-hydroksywitaminy D₃ ze zmodyfikowanym pierścieniem A” (ETIUDA 7 NCN 2019/32/T/ST4/00575), w którym doktorant był kierownikiem oraz częściowo w ramach grantu „Nowe analogi kalcytriolu o nienaturalnym pierścieniu D” (PRELUDIUM 16 NCN 2018/31/N/ST5/01679), w którym doktorant był również kierownikiem.

Sposób przedstawienia rozprawy świadczy o rozległej wiedzy syntetycznej i determinacji doktoranta do osiągania zamierzonych celów. W podsumowaniu należy stwierdzić, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska opisuje bardzo obszerny zakres starannie zaprojektowanych, wykonanych i opisanych prac syntetycznych i modelowych. Przedstawia syntezy ponad 220 głównie nowych związków chemicznych na ponad 70 schematach, wielu tabelach i rysunkach. Spełnia nie tylko wysokie standardy krajowe, ale i międzynarodowe.

Rozprawę doktorską czyta się z niemałym zainteresowaniem i prawdziwą przyjemnością. Rozprawa jest napisana ciekawie, w postaci relacji z rozwoju koncepcji, zarówno przed jak i w trakcie prowadzenia badań, projektowania kolejnych fragmentów badań oraz twórczego analizowania uzyskanych wyników, które prowadzi do skutecznego pokonania rozlicznych trudności. Ten sposób przedstawienia rozprawy świadczy o rozległej wiedzy syntetycznej i determinacji młodego badacza do osiągania zamierzonych celów. W podsumowaniu należy stwierdzić, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska opisuje bardzo obszerny zakres starannie zaprojektowanych, wykonanych i opisanych prac syntetycznych i modelowych. Przedstawia syntezy ponad 220 głównie nowych związków chemicznych na ponad 70 schematach, wielu tabelach i rysunkach. Spełnia nie tylko wysokie standardy krajowe, ale i międzynarodowe.

Z uwagi na nowatorską koncepcję i bardzo wysoki poziom badań stanowiących przedmiot rozprawy oraz sposób ich przedstawienia w samej rozprawie oraz w formie komunikatów na najważniejszych konferencjach międzynarodowych i licznych publikacjach w prestiżowych czasopismach naukowych, a także przeprowadzenie większej części badań w ramach własnych grantów NCN, składam do Rady Dyscypliny Naukowej Wydziału Chemii UW wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr. Adriana Fabisiaka.



Prof. dr hab. Andrzej Kutner