



Białystok 08.02.2021

### Recenzja

*pracy doktorskiej Pana mgr Adriana Fabisiaka pt. Synteza analogów 1 $\alpha$ ,25-dihydroksy-19-norwitaminy D<sub>3</sub> ze zmodyfikowanym pierścieniem A*

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Adriana Fabisiaka pt. Synteza analogów 1 $\alpha$ ,25-dihydroksy-19-norwitaminy D<sub>3</sub> ze zmodyfikowanym pierścieniem A została wykonana w Pracowni Stereokontrolowanej Syntezy Organicznej Zakładu Chemii Organicznej i Technologii Chemicznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Rafała R. Sicińskiego.

Rozprawa doktorska mgr Fabisiak wpisuje się we wciąż aktualne i ważne poszukiwania analogów kalcytriolu o wysokiej, selektywnej aktywności biologicznej. Jest ona częścią systematycznych badań nad pochodnymi witaminy D<sub>3</sub> prowadzonych przez Profesora Rafała Sicińskiego i jego grupę. Główne założenia pracy bazują na wcześniejszych kluczowych odkryciach tego zespołu dotyczących 19-norwitamin D. Związki te cechuje ograniczone działanie kalcemiczne przy jednoczesnym wysokim powinowactwie do receptora VDR. Biorąc pod uwagę te właściwości 19-norkalcytriolu, w pracy zaproponowano nowatorskie podejście zakładające syntezę C-2 zmodyfikowanych pochodnych 19-norwitaminy D<sub>3</sub> jako „nośników” jonów platyny(II) do komórek nowotworowych, charakteryzujących się nadekspresją jądrowego receptora witamin D. Zaprojektowane kompleksy platyny mogą charakteryzować się mniejszą toksycznością w porównaniu do obecnie stosowanych leków platynowych. Dodatkowo, w przypadku pochodnych 19-norkalcytriolu wykazujących właściwości przeciwnowotworowe można spodziewać się synergistycznego efektu dwóch farmakoforów. W tym świetle tematyka rozprawy wydaje się jak najbardziej uzasadniona i ciekawa, a wyniki przeprowadzonych badań poszerzają dotychczasową wiedzę na temat zależności aktywności od struktury (SAR) dla 1 $\alpha$ ,25-dihydroksywitaminy D<sub>3</sub>.

Oceniana dysertacja została przygotowana w formie tradycyjnej. Zawiera 165 stron i ma typowy układ dla tego typu opracowań. Zasadnicze części pracy to: przegląd literaturowy (55 stron), badania własne połączone z rozdziałem wyjaśniającym cel i założenia podjętych badań (44 stron) oraz część eksperymentalna (41 stron). Rozprawę uzupełniają opis dorobku naukowego Doktoranta, streszczenie w języku angielskim, lista stosowanych skrótów, podsumowanie, oraz spis literatury cytowanej (126 pozycji).

Na początku części literaturowej Autor przedstawia krótkie uzasadnienie wyboru tematyki badawczej, a następnie zapoznaje czytelnika z historią odkrycia witaminy D i jej metabolitów, omawia

krótko biosyntezę, przekształcenia metaboliczne oraz biologiczną rolę tych związków. Kolejne dwa rozdziały zostały poświęcone budowie i oddziaływaniu receptora witaminy D z kalcytriolem i jego pochodnymi z uwzględnieniem wpływu konformacji pierścienia A tych związków na wiązanie się z receptorem i w konsekwencji na ich aktywność biologiczną. W głównej części przeglądu literaturowego Doktorant opisuje najważniejsze metody syntezy 19-norkalcytriolu oraz otrzymywanie i właściwości biologiczne jego analogów posiadających podstawniki w pozycji 2. Uważam, że przegląd literaturowy jest napisany interesująco i przede wszystkim dzięki trafnie wyselekcjonowanym informacjom w pełni spełnia swoją rolę - uzasadnia podjęte przez Doktoranta zadania badawcze, ułatwia czytelnikowi zrozumienie problematyki przedstawionej w badaniach własnych oraz pokazuje jej miejsce na tle światowych badań w dziedzinie syntezy aktywnych analogów witamin z grupy D.

Mam kilka niewielkich uwag dotyczących materiału zawartego w tej części pracy.

- W większości opisów syntez pochodnych witaminy D<sub>3</sub> i na schematach Autor nie podaje wydajności z jaką powstawały żądane produkty. Informacja ta ułatwiłaby porównanie zamieszczonych różnych metod otrzymywania 19-norkalcytriolu.
- Str. 33, schemat 11: w przekształceniu nitylu **54** w aldehyd **47** nie potrzebny jest etap utleniania po reakcji z DIBALH.
- Str. 35 (na schemacie 13 i w opisie): do otrzymania estru **61** w reakcji Reformatskiego został użyty 2-(bromometylo)akrylan etylu nie 2-(bromoetylo)akrylan etylu, jak zostało podane.

W następnej części rozprawy Autor omawia wyniki badań własnych. Na początku tego rozdziału Doktorant jasno i zwięźle przedstawia cel badań. Głównym założeniem niniejszej pracy była synteza koniugatów platyny(II) z odpowiednio C-2 zmodyfikowanymi pochodnymi 19-norkalcytriolu. Kolejny cel pracy to otrzymanie syntonu pierścienia A do syntezy analogów 19-norwitaminy D<sub>3</sub> posiadających różne podstawniki w pozycji 3.

Realizując pierwszy cel badawczy mgr Fabisiak opierając się na wcześniejszych doniesieniach o korzystnych właściwościach biologicznych pochodnych 2-alkilideno-19-norkalcytriolu postanowił wykorzystać właśnie takie pochodne jako szkielet do syntezy dogodnych ligandów do koordynowania Pt(II). Tworzenie kompleksu z metalem miało zapewnić wprowadzenie ugrupowania L-metioniny lub kwasu bursztynowego na końcu łańcucha ω-aminopropylidenowego w pozycji 2 19-norkalcytriolu. Doktorant przed przystąpieniem do prac syntetycznych przeprowadził modelowanie dokowania zaprojektowanych struktur do kieszeni wiążącej receptora VDR. Dogodnym intermedialem do syntezy zaplanowanych związków okazała się pochodna 2-(3'-hydroksypropylideno)-19-norkalcytriolu **145**. Do jej otrzymania Autor wykorzystał opracowaną w zespole prof. Sicińskiego metodę przekształcenia kwasu D-chinowego w odpowiednio sfunkcjonalizowany synton pierścienia A – 3,5-di-*t*-butylo-dimetylosililoksy-4-alkilidenocykloheksanon. Kluczem do otrzymania zaplanowanych przez mgr Fabisiaka związków było odpowiednie zabezpieczenie grup hydroksylowych pozwalające w dalszych etapach syntezy na selektywne przekształcenia grupy OH w łańcuchu bocznym pierścienia A. Mając to na uwadze, mgr

Fabisiak zsyntezował 3,5-di-*t*-butylo-dimetylosililoksy-4-(3'-piwaloksypropylideno)cykloheksanon (**143**), który następnie poddał sprzęganiu z syntonem pierścieni C i D metodą Julia otrzymując mieszaninę izomerów 2E i 2Z żądanej pochodnej 1 $\alpha$ ,25-dihydroksy-19-norwitaminy D<sub>3</sub> posiadającej w pozycji 2 3-piwaloksypropylidenowy łańcuch. Dalsze etapy syntezy mające na celu zamianę grupy piwaloksy w łańcuchu propylidenowym na grupę NH<sub>2</sub> zostały zrealizowane dla obu otrzymanych izomerów z wykorzystaniem znanych przekształceń prowadząc do żądanych aminopochodnych z dobrą wydajnością. Reakcja mieszaniny otrzymanych izomerycznych amin z 4-chloro-4-oksobutaniem metylu lub z zabezpieczoną L-metioniną w obecności DCC i następne odbezpieczenie grup aminowych i hydroksylowych w otrzymanych produktach amidowania doprowadziło do syntezy żądanych ligandów. Po sprawdzeniu stopnia wiązalności z VDR otrzymanych pochodnych okazało się, że wykazują one dużo niższe powinowactwo do tego receptora niż hormon witaminowy. Porównanie aktywności czterech otrzymanych pochodnych względem VDR ujawniło, że silniej z receptorem oddziałują związki posiadające fragment L-metioniny. Dodatkowo, zestawienie wiązalności obu izomerów konfiguracyjnych z VDR dla danego typu ligandów pokazało, że powinowactwo izomerów E jest ok. 10-krotnie wyższe niż Z izomerów, co potwierdza tendencję opisaną wcześniej w literaturze. Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki badań biologicznych, mgr Fabisiak zaplanował syntezę kolejnych ligandów do syntezy kompleksów z platyną(II), posiadających L-metioninę lub 2-(2-aminoetylo)pirydynę przyłączone do łańcucha alkilidenu w pozycji 2 poprzez dodatkowy fragment polieterowy, oddalając tym samym miejsce wiązania metalu od miejsca rozpoznania hormonu witaminowego. Jako łącznik został wybrany tri- i tetraetylenoglikol. Autor postanowił także zmienić sposób syntezy 2-(3'-hydroksypropylideno)-19-norkalcytriolu, intermediatu do otrzymania zaplanowanych pochodnych tak, aby selektywnie powstawał tylko izomer E. Ta zmiana strategii syntetycznej wiązała się z wykorzystaniem reakcji Wittiga-Hornera do sprzęgania bloków budulcowych i co za tym idzie przygotowaniem odpowiedniego syntonu pierścienia A w postaci tlenku fosfiny. Autor poszukując metody syntezy żądanego tlenku difenylofosfiny sprawdził dwa różne podejścia syntetyczne. W pierwszym, które zakończyło się niepowodzeniem, kluczowym etapem była metateza krzyżowa odpowiedniej metylidenu pochodnej cykloheksanonu otrzymanej z ketonu **143** z tlenkiem allilodifenylofosfiny. Druga, dłuższa droga wykorzystywała reakcję olefinacji Petersona ketonu **143** z trimetylosililooctanem metylu i następnie selektywną redukcję octanu w obecności piwalanu do odpowiedniego alkoholu allilowego. Otrzymany alkohol został następnie przekształcony w żądany tlenek fosfiny w 3-etapowej syntezie obejmującej syntezę tosyłanu, jego reakcję z solą litową difenylofosfiny i utlenienie. Reakcja Wittiga-Hornera tak przygotowanego tlenku fosfiny z pochodną ketonu Windausa-Grundmanna pozwoliła Doktorantowi uzyskać selektywnie E-izomer odpowiednio sfunkcjonalizowanej 19-norwitaminy D<sub>3</sub> – kluczowego intermediatu w syntezie zaplanowanych związków z 65% wydajnością. Po redukcyjnym usunięciu piwaloilowego ugrupowania otrzymany alkohol, po żmudnej optymalizacji warunków, został przekształcony w zaplanowane polieterowe pochodne w reakcji Williamsona z ditosyłanem tri- lub tetraetylenowego glikolu

i poddany odbezpieczeniu wszystkich grup hydroksylowych obecnych w cząsteczce. Następne etapy mające na celu wprowadzenie ugrupowania zdolnego kompleksować jony platyny(II) polegały otrzymaniu odpowiedniego jodku i jego reakcji z 2-(2-aminoetylo)pirydyną bądź jego przekształceniu w terminalną aminę wykorzystując klasyczne metody i następnie reakcji amidowania z pochodną L-metioniny w obecności czynnika sprzęgającego. Odbezpieczenie grupy aminowej we wprowadzonym fragmencie aminokwasu prowadziło do utworzenia żądanej pochodnej. W opisany sposób Doktorant otrzymał 4 ligandy różniące się między sobą długością polieterowego fragmentu i ugrupowaniem mającym za zadanie koordynować platynę(II). Wszystkie związki zostały użyte do syntezy kompleksów platyny(II) opisaną w literaturze metodą. Kompleksy platyny(II) z ligandami posiadającymi resztę L-metioniny tworzyły się w reakcji z tetrachloroplatinianem potasu z dobrymi wydajnościami. Ich budowa została potwierdzona metodami spektroskopowymi. W przypadku zastosowania ligandów posiadających 2-(2-aminoetylo)pirydynę próby otrzymania kompleksów platyny(II) zakończyły się niepowodzeniem. Dla wszystkich otrzymanych ligandów oraz ich kompleksów z Pt(II) zostało zbadane powinowactwo do receptora VDR oraz ich aktywność cytotoksyczną w stosunku do wybranych linii komórek rakowych. Wszystkie związki charakteryzowały się zmniejszoną wiązalnością z receptorem VDR w porównaniu do kalcytriolu. W badaniach aktywności cytotoksycznej tych związków nie zaobserwowano zakładanej większej selektywności działania otrzymanych kompleksów platyny(II) ani samych ligandów w stosunku do komórek rakowych i zdrowych w porównaniu do właściwości wykazywanych przez cisplatinę.

Odrębnym zadaniem było otrzymanie nowego syntonu pierścienia A do syntezy C-3 zmodyfikowanych pochodnych  $1\alpha,25$ -dihydroksy-19-norwitaminy  $D_3$  metodą Suzuki-Miyaura. Analiza znanych metod otrzymywania 19-norkalcytriolu i jego pochodnych oraz wstępne eksperymenty pomogły Doktorantowi zaprojektować odpowiednią ścieżkę syntezy żadanego bloku budulcowego z kwasu D-chinowego. Strategia opierała się na dwóch kluczowych intermediatach - 3-*t*-butylodimetylosililoksy-5-hydroksycykloheksanonie (**200**) i 3-*t*-butylodimetylosililoksy-5-winylocykloheks-2-enonie (**216**). Pierwszy z nich został otrzymany w 7-etapowej syntezie, której sukces zapewniła odpowiednia manipulacja grupami ochronnymi oraz zastosowanie reakcji Bartona-McCombi do usunięcia jednej z grup hydroksylowych obecnych w cząsteczce kwasu D-chinowego. Otrzymana pochodna cykloheksanonu po eliminacji wody została przekształcona w enon, który poddano reakcji Grignarda z bromkiem winylomagnezowym prowadzącej do III-rzędowego alkoholu. Jego utleniające przegrupowanie pod wpływem katalitycznej ilości TEMPO i metanadjudanu osadzonego na żelu krzemionkowym doprowadziło do powstania pochodnej 5-winylocykloheks-2-enonu. Przekształcenie go w żądany synton pierścienia A wymagał wprowadzenia grupy hydroksylowej w pozycję 5 oraz ugrupowania bromowinyloвого w pozycję 1. Pierwszy cel został osiągnięty poprzez regio- i stereoselektywne epoksydowanie wiązania podwójnego w pierścieniu i następnie jego reduktywne otwarcie za pomocą  $LiAlH_4$  przeprowadzone po reakcji Wittiga prowadzącej do otrzymania bromowinylowej pochodnej. Tą 14-etapową syntezę żadanego syntonu pierścienia A  $3\alpha$ -winylo-19-norkalcytriolu zakończył

etap zabezpieczenia grupy hydroksylowej w otrzymanym bromku winylowym **220**. Przekształcając bromek winylowy w pinakoloboranową pochodną Doktorant przygotował także alternatywny blok budulcowy do sprzęgania w reakcji Suzuki-Miyaura.

W części eksperymentalnej Autor skrupulatnie opisał wszystkie przeprowadzone syntezy oraz podał charakterystykę otrzymanych związków. Zamieszczone procedury i analiza produktów w pełni dokumentują otrzymane rezultaty. Pracę kończy rozdział zawierający zwięzłe podsumowanie otrzymanych wyników. Poniżej przedstawiam moje uwagi do omówionych dwóch rozdziałów pracy.

- Na schematach brakuje informacji z jaką wydajnością otrzymano poszczególne produkty. Nie zawsze można odnaleźć te dane w zamieszczonym w badaniach własnych opisie, co utrudnia ocenę danej syntezy.
- Str. 69: moje wątpliwości budzi sformułowanie „...L-metioniną, w której grupa  $\alpha$ -aminowa zabezpieczona została w postaci 9-fluorenylometoksy karbonylu...”.
- We wzorach polieterowych pochodnych, np związku **152**, **159**, **171**, **172**, **179**, **182**, **190**, część powtarzalna została niewłaściwie pokazana.
- Str. 85: zastanawiam się, dlaczego nie przeprowadzono bezpośredniej hydrolizy tosylianów **181** i **182**, aby otrzymać związki **152** i **153**.
- Str. 97: wydaje się, że nazwa cykloheksadienon w stosunku do związku **216** nie jest poprawna.
- Str. 107: Lepiej byłoby użyć nazwy utleniające 1,3-przegrupowanie alkoholi alilowych, a nie 1,3-utleniające przegrupowanie.
- Część produktów, np związki **141a**, **141b**, **148a**, **148b**, **149a**, **149b**, **133a**, **133b**, **150a**, **150b**, została nazwana niepoprawnie.

Zakres badań przeprowadzonych przez mgr Fabisiaka obejmujący wieloetapowe syntezy pochodnych 19-norkalcytriolu i syntonu pierścienia A z winylowym podstawnikiem, identyfikacje otrzymanych produktów metodami spektroskopowymi oraz modelowanie dokowania pochodnych  $1\alpha,25$ -dihydroksy-19-norwitaminy  $D_3$  do kieszeni wiążącej receptora VDR oceniam bardzo wysoko. Świadczą one niewątpliwie nie tylko o ogromnym zaangażowaniu Doktoranta w wykonywaną pracę, ale także o wiedzy teoretycznej, umiejętnościach preparatywnych oraz znajomości różnych technik takich jak NMR, UV-VIS, FT-IR, ESI-MS czy technik obliczeniowych. Warto zwrócić uwagę, że także część badań biologicznych została wykonana samodzielnie przez Kandydata. Rozprawa, biorąc pod uwagę zarówno aspekt merytoryczny jak i stronę edytorską została przygotowana bardzo starannie. Jest ona napisana poprawnym językiem, można znaleźć bardzo nieliczne błędy literowe czy niezręczności stylistyczne.

Podsumowując stwierdzam, że praca doktorska pana mgr Adriana Fabisiaka zawiera wymagane w rozprawach doktorskich elementy nowości naukowej, co zostało dodatkowo udokumentowane trzema artykułami opublikowanymi w czasopiśmie z listy JCR, w których Doktorant jest pierwszym autorem. Wyniki badań przedstawionych w rozprawie doktorskiej stanowią ważny wkład w dziedzinę syntezy

aktywnych analogów witaminy D oraz wnoszą nowe informacje do badań wpływu budowy tych związków na aktywność biologiczną.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wszystkie wymagania zwyczajowe i wymogi obowiązującej ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym. Z pełnym przekonaniem składam do Rady Dyscypliny Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego wniosek o dopuszczenie mgr Adriana Fabisiaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę wysoką ocenę recenzowanej rozprawy, w tym wartość merytoryczną przeprowadzonych badań oraz fakt opublikowania znacznej części wyników, a także wysoki poziom edytorski rozprawy i bardzo dobry dorobek naukowy Kandydata wnoszę o jej wyróżnienie.

A. Wojtkiewicz



dr hab. Agnieszka Wojtkielewicz, prof. UwB

ul. Ciołkowskiego 1K, 15-245 Białystok ☎ (0-85) 738 80 43, e-mail: a.wojtkielewicz@uwb.edu.pl

Białystok 08.02.2021

*Wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej Pana mgr Adriana Fabisiaka pt. Synteza analogów 1 $\alpha$ ,25-dihydroksy-19-norwitaminy D<sub>3</sub> ze zmodyfikowanym pierścieniem A*

Po zapoznaniu się z pracą doktorską i po analizie dorobku naukowego Kandydata wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Adriana Fabisiaka.

Poniżej, przedstawiam w punktach uzasadnienie mojego wniosku.

1. Tematyka badawcza rozprawy doktorskiej stanowi ważną część światowych badań nad syntezą aktywnych analogów witaminy D. W pracy zaproponowano nowatorskie podejście zakładające otrzymanie C-2 zmodyfikowanych pochodnych 19-norwitaminy D<sub>3</sub> jako „nośników” jonów platyny(II) do komórek nowotworowych. Badania biologiczne zsintezowanych ligandów i ich kompleksów z platyną(II) pozwoliły na uzupełnienie dotychczasowej wiedzy na temat zależności aktywności od struktury (SAR) dla 1 $\alpha$ ,25-dihydroksywitaminy D<sub>3</sub>. Ponadto opracowano wydajną metodę syntezy syntonu pierścienia A do konstrukcji C-3 zmodyfikowanych pochodnych 19-norkalcytriolu.
2. Rozprawa zawiera bogaty, oryginalny materiał eksperymentalny. Zakres badań przeprowadzonych przez Kandydata obejmował wieloetapowe syntezy pochodnych 19-norkalcytriolu i syntonu pierścienia A z winylowym podstawnikiem, identyfikacje otrzymanych produktów metodami spektroskopowymi (NMR, UV-VIS, ESI-MS) oraz modelowanie dokowania pochodnych 1 $\alpha$ ,25-dihydroksy-19-norwitaminy D<sub>3</sub> do kieszeni wiążącej receptora VDR. Także część testów biologicznych została wykonana samodzielnie przez Kandydata.
3. Wysoki poziom merytoryczny oraz kompletność badań potwierdza fakt, iż duża część wyników została już opisana w trzech artykułach opublikowanych w czasopiśmie z listy JCR, w których mgr Fabisiak jest pierwszym autorem. Wyniki swoich badań zaprezentował On także na sześciu konferencjach międzynarodowych.
4. Wysoki poziom edytorski rozprawy.
5. Bardzo dobry dorobek naukowy Kandydata. Oprócz wymienionych powyżej trzech prac, w których zostały opisane wyniki badań przedstawionych w rozprawie doktorskiej mgr Fabisiak jest współautorem czterech innych publikacji z listy filadelfijskiej. Należy podkreślić także fakt, że Doktorant kierował dwoma grantami własnymi finansowanymi przez NCN (grant ETIUDA 7 oraz PRELUDIUM 16) oraz uczestniczył w realizacji jednego projektu naukowego jako główny wykonawca.

Moim zdaniem praca doktorska mgr Fabisiaka zasługuje na wyróżnienie.

*A. Wojtkielewicz*