

Warszawa, 01.03.2021

mgr Paweł Brzemiński
Pracownia Stereokontrolowanej
Syntezy Organicznej
Wydział Chemii
Uniwersytet Warszawski

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.

Synteza analogów 2-metyleno-19-norkalcytriolu ze zmodyfikowanym łańcuchem bocznym

Promotor: prof. dr hab. Rafał R. Siciński

Poszukiwanie nowych związków o korzystnym profilu terapeutycznym, zapewniającym niską toksyczność względem komórek prawidłowych, wciąż pozostaje wyzwaniem w obszarze chorób nowotworowych. Do ważnej grupy związków, z którymi wiąże się nadzieję w terapii antynowotworowej, należą sekosteroidy, a wśród nich witamina D₃ (cholekalcyferol), która na drodze dwustopniowych przemian enzymatycznych przekształcana jest w aktywną formę hormonalną – kalcytriol (1 α ,25-dihydroksycholekalcyferol), powszechnie uważany za czynnik przeciwrzywiyczny. Kalcytriol modyfikuje metabolizm i funkcje komórki, poprzez stymulowanie jej do wytworzenia określonych białek. W odróżnieniu od leków cytostatycznych jego działanie ma jednak charakter niedestrukcyjny. Odkrycie witaminowego receptora w większości tkanek ludzkich spowodowało wzrost zainteresowania tą grupą związków. Ustalono, że poza kontrolowaniem gospodarki wapniowej, naturalny hormon witaminowy przejawia zdolność indukcji różnicowania i proliferacji komórek nowotworowych. Potencjalne wykorzystanie kalcytriolu w terapii chorób nowotworowych i immunologicznych wiąże się jednak z zastosowaniem ponadfizjologicznych stężeń tego związku, co z kolei może prowadzić do występowania zjawiska hiperkalcemii. Z tego też powodu dąży się do uzyskania jego syntetycznych analogów o korzystniejszym profilu aktywności biologicznej.

Przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej badania pozwoliły na uzyskanie nowej grupy analogów 19-norkalcytriolu, charakteryzujących się znacznie wydłużonym łańcuchem bocznym, w obrębie, którego wyróżnić można ugrupowania: (a) zdolne do kompleksowania

jonów metali przejściowych, (b) stanowiące znaczniki fluorescencyjne czy też (c) zdolne do tworzenia wiązań kowalencyjnych. Otrzymane związki stanowią pierwszy przykład pochodnych o tak wydłużonym steroidowym łańcuchu bocznym, którego część może wystawać poza kieszeń wiążącą receptora witamin D (VDR).

Do syntezy poszczególnych bloków budulcowych wykorzystałem związki pochodzenia naturalnego. Synton steroidowego pierścienia A w postaci odpowiedniego tlenku fosfiny uzyskałem na drodze literaturowej syntezy z kwasu (1*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-chinowego, występującego naturalnie w ziarnach kawy. Do otrzymania fragmentów steroidowych łańcuchów bocznych wykorzystałem geraniol – naturalny terpen będący głównym składnikiem olejku różanego, natomiast synton pierścieni C/D uzyskałem z witaminy D₂. Strategię syntezy nowych analogów oparłem o reakcję Wittiga-Hornera pomiędzy tlenkiem fosfiny, a odpowiednim ketonem. W swojej pracy stosowałem również eksperymenty modelowania molekularnego oraz dokowania ligandów pozwalające na przybliżone określenie ułożenia nowego związku w kieszeni wiążącej receptora hVDR.

Realizując nakreślony plan syntezy, postanowiłem najpierw otrzymać analog 19-norkalcytriolu posiadający wydłużony łańcuch boczny, zakończony ugrupowaniem aminopirydynowym. Wstępne eksperymenty dokowania pozwoliły mi przypuszczać, że uzyskana pochodna ma szansę na silne oddziaływanie z receptorem VDR. Przeprowadzone badania biologiczne otrzymanego analogu wskazały jednak na spadek jego powinowactwa do jądrowego receptora o trzy rzędy wielkości. Z tego też powodu konieczne były dalsze modyfikacje strukturalne, pozwalające na uzyskanie związków o korzystniejszym profilu biologicznym.

Biorąc pod uwagę właściwości, jakimi charakteryzują się analogi *Gemini*, postanowiłem uzyskać serię dwułańcuchowych analogów kalcytriolu, które mógłbym wykorzystać do założonego celu. Miałem nadzieję, że zmiana architektury kieszeni wiążącej receptora VDR pozwoli na lepsze dopasowanie takiego rozgałęzionego i wydłużonego łańcucha bocznego. Kluczowym etapem w syntezie zaprojektowanych analogów było wprowadzenie dodatkowego łańcucha bocznego. W związku z niepowodzeniami, związanymi z zastosowaniem różnych odmian reakcji Wittiga, postanowiłem wykorzystać olefinowanie Petersona, które z wysoką wydajnością umożliwiło otrzymanie geometrycznego *E*-izomeru. Również i w tym przypadku do konstrukcji szkieletu witaminowego wykorzystałem reakcję Wittiga-Hornera. Uzyskane dwułańcuchowe 25*R*- i 25*S*-analogi, zakończone ugrupowaniem aminopirydynowym, wykazywały blisko 500-rAZY silniejsze powinowactwo do receptora witamin D niż pochodna jednołańcuchowa i tylko dwukrotnie słabsze w porównaniu

z naturalnym hormonem (kalcytriolem). Dodatkowym wykonanym badaniem było sprawdzenie właściwości antyproliferacyjnych uzyskanych analogów w stosunku do komórek ludzkiej białaczki HL-60. Ponieważ tylko analog o 25*R*-konfiguracji charakteryzował się umiarkowanymi właściwościami różnicującymi, w dalszych etapach pracy postanowiłem uzyskać pochodne o takiej konfiguracji.

Zachęcony wynikami wiązalności analogów pirydynowych, postanowiłem również wprowadzić do cząsteczki 19-norkalcytriolu naturalny aminokwas *L*-metioninę, a następnie uzyskać kompleksy tych związków z platyną(II). Otrzymane analogi zostały poddane badaniom mającym na celu określenie ich właściwości różnicujących komórki nowotworowe. Nieoczekiwanie jednak, pochodne nieskompleksowane jonami platyny charakteryzowała wysoka toksyczność w stosunku do komórek raka szyjki macicy, przy podobnej toksyczności wobec komórek zdrowych (BJ), natomiast kompleksy tych związków z Pt(II) charakteryzowały się jedynie umiarkowaną aktywnością wobec komórek nowotworowych, przy zmniejszonej toksyczności wobec komórek zdrowych. Żaden jednak z badanych związków nie wykazywał selektywności wobec komórek rakowych, wykazując niestety działanie toksyczne również względem komórek zdrowych.

Poszukując bardziej selektywnie działających związków, postanowiłem wprowadzić do cząsteczki 19-norkalcytriolu ugrupowania będące znacznikami fluorescencyjnymi w postaci dansylu i pochodnej kwasu 1-pirenooctowego. Przeprowadzone badania cytotoxyczości wskazały na zanik aktywności wobec komórek zdrowych. Ponadto pochodna dansylowa charakteryzowała się wysoką toksycznością wobec komórek nowotworowych – najwyższą w stosunku do komórek raka szyjki macicy. W przypadku pochodnej pirenowej pojawiła się znacząca toksyczność w stosunku do komórek raka piersi, jednak jej właściwości okazały się słabsze niż analogu zawierającego ugrupowanie w postaci dansylu. Z tego też powodu właśnie ta pochodna zostanie poddana dodatkowym testom z wykorzystaniem innych linii komórek nowotworowych, a także eksperymentom wykorzystującym zjawisko fluorescencji, które pozwoliłyby na śledzenie losów analogu w żywych komórkach.

Ostatnim etapem pracy doktorskiej była synteza analogów 2-metyleno-19-norkalcytriolu posiadających reaktywne ugrupowania zdolne do kowalencyjnego wiązania białka. Zostaną one poddane badaniom z wykorzystaniem spektrometrii mas, pozwalającym ustalić skuteczność tworzenia wiązania ligand-receptor, a także testom biologicznym określającym ich zdolność do różnicowania komórek nowotworowych.