



Prof. dr hab. Jacek W. Morzycki

ul. Ciołkowskiego 1K, 15-245 Białystok ☎ (85) 738 82 60, fax: (85) 738 80 52, e-mail: morzycki@uwb.edu.pl

Białystok, 15.02.2021 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgra Pawła Brzezińskiego

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

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgra Pawła Brzezińskiego została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Rafała R. Sicińskiego w Pracowni Stereokontrolowanej Syntezy Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Dysertacja ma formę klasyczną, której jestem zwolennikiem, czyli zawiera wstęp, zwięzły opis badań własnych wraz z dyskusją i podsumowaniem, szczegółową część eksperymentalną oraz spis cytowanej literatury. Praca liczy w sumie 156 ponumerowanych stron, napisana jest poprawnym językiem i ma przyjemną szatę graficzną. Znaczna część pracy została już opublikowana w dwóch artykułach w dobrych czasopismach *Bioorg. Chem.* (IF 4,831) i *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* (IF 3,813). Doktorant jest w nich pierwszym autorem, a ponadto jest współautorem dalszych pięciu publikacji o zbliżonej tematyce w równie dobrych czasopismach (sumaryczny IF wszystkich siedmiu publikacji doktoranta wynosi prawie 29).

Praca doktorska mgra Pawła Brzezińskiego jest z zakresu chemii medycznej, a w szczególności chemii witaminy D. Chociaż tematyka ta jest bardzo stara, gdyż witamina D została odkryta przez McColluma już w 1922 roku, to ciągle odkrywane są nowe jej funkcje, a ostatnio zrobiło się głośno na temat możliwości wykorzystania pochodnych tej witaminy do redukcji ARDS (acute respiratory distress syndrome) u pacjentów z COVID-19. Przełomowym momentem w historii witaminy D było odkrycie w 1968 roku, że ulega ona metabolicznej aktywacji, która polega na dwukrotnej hydroksylacji, najpierw w pozycji 25, a następnie w pozycji 1 α . Powstający w ten sposób 1,25-dihydroksycholekalcyferol (kalcytriol) jest hormonem zwierzęcym kontrolującym gospodarkę wapniowo-fosforanową organizmu, powoduje zwiększenie absorpcji wapnia i fosforanów w układzie pokarmowym, wzmacnia resorpcję kości, co przyspiesza ich przebudowę, jest powszechnie stosowany w leczeniu hipokalcemii i osteoporozy. Ponadto uczestniczy w zjawiskach odpornościowych oraz różnicowaniu i proliferacji komórek. Odkrycie, że receptor witaminy D (VDR) znajduje się w wielu ludzkich tkankach spowodował wzrost zainteresowania pochodnymi tej witaminy. Wielu badaczy witaminy D, wśród nich prof. H. F. DeLuca z Uniwersytetu Wisconsin-Madison wraz z prof. R. R. Sicińskim z UW, przystąpiło do poszukiwań zmodyfikowanych pochodnych kalcytriolu o wysokim

powinowactwie do VDR, ale o niewielkim działaniu regulacyjnym metabolizmu wapniowo-fosforanowym. Związki takie mogłyby być wykorzystane w terapii nowotworowej. Wyniki tych badań, zarówno dotyczących syntezy pochodnych kalcytriolu jak i ich właściwości biologicznych, doktorant opisał zwięźle (43 strony) we wstępie do pracy doktorskiej. Przedstawił w nim również podstawowe informacje na temat biosyntezy witaminy D₃ oraz kalcytriolu, metabolizmu witamin D oraz budowy receptora (VDR). Analiza budowy VDR, a w szczególności domeny wiążącej ligand wykazała, że pierścień A kalcytriolu przyjmuje konformację krzesłową z ekwatorialną grupą 1 α -OH i aksjalną grupą 3 β -OH. Wszystkie trzy grupy hydroksylowe kalcytriolu zaangażowane są w tworzenie wiązań wodorowych z odpowiednimi aminokwasami. Znajomość sposobu ułożenia liganda w kieszeni wiążącej receptora pozwoliła zaprojektować analogi kalcytriolu, które znalazły zastosowanie terapeutyczne. Były to głównie analogi ze zmodyfikowanym łańcuchem bocznym, ale również zaproponowane przez R. R. Sicińskiego 19-noranalogi, takie jak 19-norkalcytriol, 2-metyleno-19-norkalcytriol i jego epimer na C20. Szczególne znaczenie wśród analogów mają związki o wydłużonym łańcuchu bocznym oraz analogi kalcytriolu posiadające rozdwojony na C20 łańcuch boczny (związki Gemini). W przypadku związków o wydłużonym łańcuchu nadmiarowe atomy węgla wystają poza kieszeń wiążącą receptora. Natomiast związki Gemini ulegają wiązaniu do receptora dzięki zmianie kształtu kieszeni z typowego dla kalcytriolu kształtu „L” na „Y”. Synteza tego typu analogów była przedmiotem badań mgra Pawła Brzemińskiego.

Synteza zaprojektowanych analogów prowadzona była według strategii konwergentnej polegającej na łączeniu poszczególnych części strukturalnych, otrzymanych na drodze osobnych syntez, przy wykorzystaniu różnych metod sprzęgania. Centralna część cząsteczki, obejmująca pierścienie C i D, otrzymywana była najczęściej z witaminy D₂ na drodze ozonolizy. Synton pierścienia A zazwyczaj w postaci tlenku fosfiny był konstruowany przez doktoranta z kwasu D(-)-chinowego w oparciu o wcześniej opracowaną procedurę. Została ona zmodyfikowana przez zastosowanie odczynnika Tebbego w celu wprowadzenia grupy metylenowej w pozycję C2 zamiast odpowiedniego ylidu fosforowego. Trzecim blokiem budulcowym był synton łańcucha bocznego zawierający odpowiednie grupy funkcyjne.

Pierwszym celem syntetycznym doktoranta była (25*S*)-2-metyleno-19-nor-witamina (**209**; omyłkowo ten sam numer ma geraniol) zawierająca w łańcuchu bocznym dwa atomy azotu (jeden aminowy i drugi w pierścieniu pirydynowym) zdolne do chelatowania jonów Pt(II). Wykorzystanie analogów kalcytriolu jako nośnika leku (typu cisplatyny) powinno doprowadzić do zwiększenia skuteczności terapii nowotworowej, gdyż stwierdzono obecność VDR w różnych komórkach nowotworowych. Długość łańcucha bocznego zaprojektowano w oparciu o modelowanie molekularne. Zoptymalizowane struktury analogów zostały zadokowane do kieszeni wiążącej receptora. Stwierdzono, że w przypadku odpowiednio długich łańcuchów (co najmniej 12 atomów węgla) utworzony kompleks Pt(II) wraz z atomami chloru wystaje poza domenę wiążącą receptora. Konwergentna synteza związku **209** obejmowała otrzymanie z witaminy D₂ fragmentu CD z grupą tosyłanową przy C22. Została ona następnie podstawiona karboanionem wygenerowanym z nitrylu,

przygotowanym z geraniolu na drodze 8-etapowej (!) syntezy. W kolejnym kroku usunięto grupę cyjankową, a dzięki obecności terminalnego wiązania podwójnego w otrzymanym związku było możliwe przedłużenie łańcucha bocznego o pięć atomów węgla na drodze metatezy krzyżowej. Po uwodornieniu wiązania podwójnego, grupę hydroksylową przy C8 utleniono do ketonu, który poddano reakcji Wittiga-Hornera z syntonem pierścienia A w postaci odpowiedniego tlenku fosfiny. Końcowe etapy syntezy związku **209** polegały na zamianie terminalnej grupy hydroksylowej w jodek, a ten z kolei został podstawiony 2-(2'-aminoetylo)pirydyną. Pomimo ogromnego wysiłku syntetycznego, przeprowadzone testy wykazały, że związek **209** bardzo słabo wiąże się z receptorem witaminowym (1000 razy słabiej od kalcytriolu). W tej sytuacji zaniechano syntezy jego kompleksu z platyną.

Niezrażony niepowodzeniem doktorant podjął się syntezy związku analogicznego do **209**, ale z dodatkowym łańcuchem na C20 (typu Gemini) licząc na jego lepsze ułożenie w kieszeni wiążącej receptora. Oczywiście synteza tego związku była jeszcze bardziej złożona ze względu na nowe centrum stereogeniczne na C20 tworzące się w jej trakcie. W celu wprowadzenia dodatkowego łańcucha 22-aldehyd będący produktem ozonolizy witaminy D₂ został zamieniony w nityl, którego anion w pozycji α był alkilowany bromkami (*R* i *S*) wywodzącymi się z geraniolu. Reakcje te zachodziły wysoce diastereoselektywnie prowadząc w obu przypadkach do produktów o konfiguracji 20*S* (25*R* lub 25*S*). Drugi łańcuch został wprowadzony przez redukcję nitylu DIBAL-em do aldehydu i jego olefinację metodą Petersona. Zachodzi tu jednak pytanie, czy nie dałoby się przeprowadzić tej syntezy bez manipulacji grupami funkcyjnymi (aldehyd w nityl, nityl w aldehyd). Końcowe etapy syntezy były identyczne (metateza, regioselektywne uwodornienie wiązania podwójnego, utlenienie alkoholu do ketonu, zamiana terminalnej grupy hydroksylowej w jodek i w końcu jego podstawienie 2-(2'-aminoetylo)pirydyną), tak jak w przypadku syntezy związku **209** z nierozgałęzionym łańcuchem. W tym skrótowym opisie pominąłem niezbędne etapy zabezpieczania i odbezpieczania grup funkcyjnych. Otrzymane zostały w ten sposób dwa związki typu Gemini o konfiguracji 25*R* (**232**) i 25*S* (**233**), które można było zastosować w charakterze ligandów do kompleksowania jonów Pt(II). Przedstawiony powyżej opis nie oddaje w pełni całej złożoności tej syntezy i licznych pojawiających się problemów, których pokonanie wymagało najwyższego kunsztu syntetycznego. Kwestie stereochemiczne przeprowadzonej syntezy nie budzą wątpliwości i nie są specjalnie złożone, ale doktorant niepotrzebnie je skomplikował przez błędy na Schemacie 37. Oczywiście sprawą jest, że silylowanie nie odwraca konfiguracji na odległym centrum stereogenicznym, czyli związek **249a** powinien mieć konfigurację 25*S*, a **249b** – 25*R*. Podobnie produkty metatezy: **250a** to związek o konfiguracji 25*S*, zaś **250b** – 25*R*. Uwodornienie wiązania podwójnego po metatezie też nie zmienia konfiguracji na C25, ale zmienia się wtedy ważność podstawników. Z tego powodu nienasycony substrat o konfiguracji 25*S* zmienia się w nasycony produkt o konfiguracji 25*R* i vice versa. Należy zaznaczyć, że jestem przekonany, że doktorant miał tego świadomość, bo w Części eksperymentalnej i w publikacji nie ma tego błędu. Drobniejszym błędem na Schemacie 37 jest brak związku **247a** (dwa razy jest **247b**). Są to jednak błędy natury technicznej, a nie merytorycznej.

Badania względnej siły wiązania związków **232** i **233** do receptora witaminy D dały wyniki w pełni satysfakcjonujące, ich wartość wyniosła 43,8% (**232**) i 46,1% (**233**) w porównaniu do kalcytriolu (100%). Pomimo dobrej wiązalności obu epimerów do VDR, tylko izomer 25*R* wykazywał słabą zdolność różnicowania komórek ludzkiej leukemii HL-60 (drugi izomer był nieaktywny). Zachęcony dobrymi wynikami wiązalności analogów Gemini doktorant postanowił wykorzystać jeden z otrzymanych wcześniej półproduktów do syntezy związku **261** z terminalną grupą aminową, do której przyłączył L-metioninę wiązaniem amidowym. Otrzymany związek (25*R*)-**259** wiązał się słabiej z VDR (16,6%) niż związki wcześniej badane. Oba otrzymane ligandy witaminowe o konfiguracji 25*R* (**232** i **259**) poddano reakcji kompleksowania z K₂PtCl₄. Kompleksy oczyszczono chromatograficznie i scharakteryzowano spektralnie. Czyste kompleksy Pt(II) oraz wolne ligandy poddano badaniom na cytotoksyczność względem trzech linii komórek raka oraz zdrowych fibroblastów. Nieoczekiwanie okazało się, że cytotoksyczność wolnych ligandów jest wyższa od ich kompleksów z Pt(II). Niestety, badane związki nie wykazywały selektywności względem komórek raka (były równie toksyczne wobec normalnych fibroblastów).

Wspomniana wyżej amina **261** (a nie **260** jak podano w tekście i Części eksperymentalnej) posłużyła również do syntezy pochodnych zawierających znaczniki fluorescencyjne. W tym celu poddano ją działaniu chlorku dansylu/Et₃N lub kwasu 1-pirenooctowego/DCC/HOBt. Interesujące, że wprowadzenie znaczników fluorescencyjnych w strukturę związku wpłynęło na zanik toksyczności względem zdrowych komórek przy zachowaniu znacznej cytotoksyczności w stosunku do badanych linii komórek raka.

Ostatnia część badań własnych dotyczyła syntezy analogów typu Gemini posiadających na końcu dłuższego łańcucha reaktywne ugrupowanie o charakterze akceptora Michaela, np. α,β-nienasycony keton, α,β-nienasycony sulfon lub maleimid. Tego typu układy mogą reagować z grupą S-H cysteiny znajdującej się w kieszeni wiążącej receptora. Przeprowadzone przez doktoranta modelowanie molekularne pozwoliło zaprojektować analogi, w których odległość końca łańcucha od grupy S-H cysteiny umożliwiła tworzenie się wiązania kowalencyjnego C-S. W syntezie zostały z powodzeniem wykorzystane półprodukty otrzymane w trakcie wcześniejszych prac. Pewnym problemem okazała się duża reaktywność układu α,β-nienasyconego ketonu, np. podczas odbezpieczania grup siliowych w zakwaszonym metanolu tworzył się produkt jego addycji do wiązania podwójnego. Mechanizm tej reakcji jest oczywisty i nie było potrzeby jego tłumaczenia (Rys. 29). Oczekiwałem raczej wytłumaczenia demetylacji amidu Weinreba do związku **285** w tych warunkach. Właściwości biologiczne nowych analogów kalcytriolu z reaktywną grupą na końcu łańcucha nie zostały jeszcze zbadane.

Wyniki uzyskane w ramach pracy doktorskiej zostały zwięźle przedstawione w podsumowaniu. W rozdziale tym zostały zebrane wszystkie zakończone sukcesem syntezy oraz przypomniane wyniki badań biologicznych. Trochę szkoda, że wszystkie błędy, które wskazałem w recenzji w odniesieniu do Schematu 37, zostały przeniesione do Schematu 52 (zapewne w wyniku zastosowania techniki „copy-paste”).

Pracę doktorską Pawła Brzezińskiego kończy obszerna (50 stron) Część eksperymentalna, w której opisane zostały wykonane syntezy oraz przedstawiona charakterystyka otrzymanych związków. Wszystkie związki mają widma ^1H NMR z przypisaniem sygnałów, widma ^{13}C NMR (bez DEPT-ów), HRMS, niekiedy UV, czasem skręcalność (ale nie dla końcowych witamin). Żaden związek nie ma zmierzonej temperatury topnienia, chociaż sądząc na podstawie wzoru niektóre półprodukty powinny być krystaliczne (w kilku przypadkach postać związku określona jest mianem „półkrystaliczny”). Odnoszę wrażenie, że Pracownia Stereokontrolowanej Syntezy Organicznej nie posiada na wyposażeniu aparatu do pomiaru temperatury topnienia.

W recenzowanej pracy doktorskiej jest stosunkowo mało błędów, ale niektóre z nich, zwłaszcza wspomniane wcześniej błędy w numeracji związków, bardzo utrudniają rozumienie tekstu. Poniżej zamieszczam komentarze do niektórych sformułowań w tekście oraz wykaz zauważonych błędów (pomijam „literówki”):

Str. 18 i 43: w warunkach reakcji na schematach 6 i 13 powinien być synton **38** (jest **40**);

Str. 19: związek **58** to fosfonian, a nie fosfina; podobnie str. 29: związek **106** to fosfonian (jest tlenek fosfiny);

Str. 22: związek **70** nie jest estrem 25-karboksylowym;

Str. 28: w warunkach reakcji (f) na Schemacie 13 brak jest syntonu **93**;

Str. 45: na Rysunku 13 dwa związki mają ten sam wzór **192** (powinno być **192** i **193**);

Str. 46: jest „hydroksy dienyny **204**” (powinno być „hydroksy dieny **204**”);

Str. 55: „protonowanie rodnika B alkoholem *tert*-butylowym” – przenoszony jest atom wodoru a nie proton; wzór produktu homometatezy **224** jest błędny (powinien być symetryczny);

Str. 63: czy rzeczywiście duży podstawnik na C8 ma wpływ na reaktywność grupy aldehydowej przy C20?

Str. 64: brak wyjaśnienia w jaki sposób alkohol allilowy utlenił się do α,β -nienasyconego ketonu **251**;

Str. 65: dlaczego keton **254** nie ulegał sprzężeniu z **54**? Na Schemacie 38 błędy w warunkach reakcji (2 x (e));

Str. 77: powinno być „pochodna pirenoacetylowa” (jest „pochodna pirenooctanowa”);

Str. 87: w tekście brakuje odnośnika do Schematu 52; niezręczne sformułowanie: „wskazały na znaczną poprawę powinowactwa ... przy zaledwie dwukrotnie zredukowanym powinowactwie do VDR”;

Str. 101: produkt wodorowania **223** to związek **225** (**224** to produkt homometatezy);

Str. 109/110: reakcja odbezpieczenia grupy TES nie jest hydrolizą;

Str. 132: w pracy podano, że kompleks **265** był eluowany z kolumny układem DCM/metanol 98:2. Byłoby to niezgodne z wynikami analizy HPLC i brakiem rozpuszczalności w chloroformie. Przypuszczam, że jest to błąd – powinno być 92:8 (tak jak podano w publikacji doktoranta w *Bioorg. Chem.* **2020**, *100*, 103883).

Reasumując stwierdzam, że doktorant wykazał się znajomością nowoczesnej chemii organicznej. Praca została dobrze zaprojektowana, a uzyskane wyniki mają nie tylko wartość poznawczą, ale potencjalnie także znaczenie praktyczne. Doktorant jest współautorem siedmiu publikacji w dobrych czasopismach. Uzyskane wyniki prezentował na wielu konferencjach naukowych w kraju i za granicą.

Jestem przekonany, że oceniana praca spełnia z nadmiarem ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim. W związku z tym wnioskuję do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgra Pawła Brzezińskiego i dopuszczenie jej do publicznej obrony.

Stawiam również wniosek o wyróżnienie pracy. Uzasadnienie wniosku w załączeniu.

Jacek Morzycki



Prof. dr hab. Jacek W. Morzycki
ul. Ciołkowskiego 1K, 15-245 Białystok ☎ (85) 738 82 60, fax: (85) 738 80 52, e-mail: morzycki@uwb.edu.pl

Białystok, 15.02.2021 r.

Uzasadnienie wniosku o wyróżnienie pracy doktorskiej mgra Pawła Brzezińskiego

Recenzowana praca doktorska z zakresu chemii medycznej zatytułowana „Synteza analogów 2-metyleno-19-norkalcytriolu ze zmodyfikowanym łańcuchem bocznym” dotyczy poszukiwań pochodnych witaminy D o specyficznych aktywnościach biologicznych. Na podstawie modelowania molekularnego z zastosowaniem metody dokowania liganda witaminowego do miejsca wiążącego receptora, którego budowa jest znana, doktorant zaprojektował struktury kilku pochodnych kalcytriolu (hormon witaminowy) o oczekiwanej aktywności. Zamiarem doktoranta było, aby zaprojektowane związki dobrze wiązały się z receptorem, ale nie wykazywały, charakterystycznej dla witamin D, aktywności związanej z regulacją gospodarki fosforanowo-wapniowej. Doktorant oczekiwał, że te nowe pochodne kalcytriolu będą indukować różnicowanie i hamować proliferację komórek raka oraz posiadać działanie immunosupresyjne. W ramach swojej pracy doktorskiej mgr Paweł Brzeziński otrzymał dwukleszczowe ligandy witaminowe z pojedynczym łańcuchem bocznym oraz związki typu Gemini, które użył do kompleksowania jonów Pt(II). Atom platyny w tych związkach wystaje poza kieszeń wiążącą receptora. Otrzymane zostały również pochodne ze znacznikiem fluorescencyjnym w łańcuchu w celu śledzenia ich metabolizmu. Ponadto otrzymane zostały trzy związki z reaktywną grupą funkcyjną na końcu łańcucha (akceptory Michaela), które powinny wiązać się kowalencyjnie, zgodnie z wynikami modelowania molekularnego, z L-cysteiną obecną w miejscu wiążącym receptora. Wyniki prac syntetycznych i badań biologicznych (wykonanych w dużym stopniu samodzielnie przez doktoranta) zostały opisane w siedmiu publikacjach o łącznym IF ok. 29. Na szczególne wyróżnienie zasługuje umiejętność prowadzenia przez doktoranta trudnych, wieloetapowych syntez organicznych.

Jacek Morzycki