



Open Research Biopharmaceutical Internship Support

Prof. dr hab. Andrzej Kutner
Współkoordynator i Kierownik Projektu ORBIS
Horyzont 2020, MSCA, RISE 2018-2022
Instytut Farmaceutyczny

Warszawa, 30 listopada 2018

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr Marcina Szybińskiego
p.t. „Synteza analogów 1 α ,25-dihydroksywitaminy D₃”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Marcina Szybińskiego została wykonana pod kierunkiem Prof. dr hab. Rafała Sicińskiego, jako promotora. Zespół Profesora Sicińskiego jest jednym z 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. Atsushi Kittaka z Teikyo University. Wysoki poziom prac syntetycznych doktoranta, opisanych w rozprawie doktorskiej, jest również w znacznym stopniu wynikiem prowadzenia jego badań w zespole naukowym o światowej renomie. W zespole Prof. Sicińskiego prowadzone są od wielu lat syntezy analogów witamin D zmodyfikowanych w starannie wybranych miejscach cząsteczki cholecalciferolu. Badania te doprowadziły m.in. do odkrycia szczególnie korzystnej modyfikacji w pierścieniu A, polegającej na formalnym przeniesieniu egzocyklicznej grupy metylenowej z położenia przy C-10 do położenia przy C-2 cholecalciferolu. Modyfikacja ta wynikała z analizy strukturalnej domeny receptora witaminy D wiążącej ligand witaminowy i ze stwierdzenia niszy hydrofobowej w otoczeniu C-2. Wypełnienie tej niszy grupą metylenową znacznie poprawiło powinowactwo tak zmodyfikowanych analogów do receptora i w konsekwencji doprowadziło do opracowania substancji czynnej leku. Z tego typu przełomowych wyników badań zespołu korzystał również doktorant w celu powiązania nowych modyfikacji strukturalnych, ze zmianami strukturalnymi odkrytymi już poprzednio w tym zespole, w celu uzyskania addytywnego efektu aktywności biologicznej nowych analogów.

Badania doktoranta dotyczą nowego fragmentu strukturalnego cholecalciferolu, który nie był dotychczas wystarczająco poznany i który od pewnego czasu jest obiektem zainteresowania szeregu zespołów badawczych. Badania doktoranta są więc ułożone w bardzo ważnym obszarze o wysokim poziomie nowości naukowej i istotnym znaczeniu dla rozszerzenia wiedzy w dziedzinie zależności struktura-aktywność w tej grupie związków, jako potencjalnych substancji czynnych leków o zróżnicowanym profilu aktywności terapeutycznej. Zakres i temat rozprawy doktorskiej został odpowiednio wybrany i lokuje przeprowadzone badania w samym centrum światowych zainteresowań w tej dziedzinie.

Rozprawa ma klasyczny układ i zawartość. Poprzedza ją spis publikacji doktoranta, w których zostały częściowo opisane wyniki jego badań. Doktorant jest współautorem pięciu publikacji związanych z tematem pracy i opublikowanych w najważniejszych czasopismach w swojej dziedzinie, o wysokim współczynniku oddziaływania, takich jak *Journal of Medicinal Chemistry* (IF 6,3) oraz *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* (IF 4,1) i *International Journal of Molecular Sciences* (IF 3,7), w których są publikowane, m.in., publikacje ze światowych konferencji „Vitamin D Workshop” oraz liczne konferencje on-line w dziedzinie syntezy i aktywności biologicznej witamin D. Wartość badań syntetycznych doktoranta jest tym większa, że zsyntetyzowane przez niego analogi zostały przebadane w jednym z najważniejszych na świecie zespołów biochemicznych Prof. Hectora F. DeLuca na *University of Wisconsin Madison*, a ostatnio również w znanym na świecie zespole Prof. Ewy Marcinkowskiej na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Doktorant jest pierwszym autorem trzech publikacji oraz drugim autorem dwóch publikacji. Dołączenie do rozprawy kopii tych publikacji oraz ich *Supplementary Information*, mogłoby znacznie poprawić jej walory naukowe, z korzyścią dla czytelników i recenzentów.

Dla porządku należy odnotować, że sama rozprawa ma bardzo rozsądne rozmiary i właściwe proporcje. Przedstawiono ją na 182 stronach, z czego główne części: „Wstęp” na 62 stronach, „Badania własne” na 58 stronach, „Podsumowanie” na 10 stronach oraz „Część eksperymentalna” na 55 stronach. Na początku rozprawy, bardzo dogodnie, doktorant zamieścił wykaz stosowanych skrótów. Właściwą rozprawę poprzedza, jak się można domyśleć, bo brak tytułu, streszczenie, napisane w bardzo poprawnym i fachowym języku angielskim. Streszczenie starannie podsumowuje wszystkie kolejne fragmenty pracy, od

Open Research Biopharmaceutical Internship Support

wstępu, poprzez krótką analizę literaturową i na jej podstawie dokonanie wyboru kolejnych obiektów syntetycznych, projekt i realizację syntezy oraz zarysowanie zakresu i wyników badania aktywności biologicznej otrzymanych analogów, aż do podsumowania. W tej części rozprawy doktorant nie zaznaczył wystarczająco wyraźnie, czy i w jakim stopniu uczestniczył w badaniach biologicznych swoich analogów, chociaż jest to odpowiednio dokładnie przedstawione w części 3.1.6 Badań biologicznych. Pewna niezręczność pojawiła się na samym początku tego streszczenia. Osiemnastego wieku sięga raczej historia odkrycia działania i istnienia samej witaminy D. Odkrycie samego calcitriolu to już oczywiście historia drugiej połowy dwudziestego stulecia. W krótkiej diagnozie przyczyn występowania tzw. choroby angielskiej, czyli krzywicy, zabrakło w opisie, publikowanej ostatnio coraz szerzej, informacji, że zdiagnozowanie przyczyn choroby angielskiej i podanie sposobów jej zapobiegania i leczenia zawdzięczamy Jędrzejowi Śniadeckiemu, który dokonał tego na pół wieku przed ponownym odkryciem tych przyczyn przez lekarza brytyjskiego. Również, w uzasadnieniu hormonalnego działania calcitriolu zabrakło ważnej informacji, podawanej wielokrotnie przez cytowanego przez doktoranta Prof. H.F. DeLuca, że 1,25-dihydroksycholecalciferol jest uznawany za hormon nie tylko dlatego, że wyraża swoje działanie poprzez receptor ulokowany w jądrze komórkowym, ale i dlatego, że powstanie calcitriolu następuje w sposób „hormonalny”, czyli w wyniku aktywacji nieczynnej witaminy D w innych miejscach organizmu (komórki kanalikowe nerek i mikrosomy komórek wątroby) niż te, w których powstaje sama witamina D. Już z samego streszczenia angielskiego wynika, że doktorant zastosował w swojej pracy nowoczesne, noblowskie, metody syntezy, takie jak asymetryczna epoksydacja Sharplessa czy reakcja Sonogashira kondensacji triflanu i dienynu. W streszczeniu doktorant bardzo klarownie uzasadnił przyczyny wyboru analogów witamin D zmodyfikowanych w pierścieniu D, jako obiekty swoich badań.

W ogólnym Wstępie (cz. 1) doktorant przedstawił krótką historię badań nad witaminami D, drogi ich metabolicznej aktywacji i deaktywacji, według stanu wiedzy na koniec poprzedniego stulecia. Zabrakło nieco bardziej współczesnej informacji o specyficznej drodze hydroksylacji na C-21, odkrytej również dzięki badaniom krajowego zespołu. We wstępie szczegółowym (cz. 2.1) doktorant podsumował wszystkie znane modyfikacje cząsteczki witaminy D w interesującym go fragmencie cząsteczki, od analogów ze zmodyfikowanym centrum stereogenicznym na C-13 i C-14 do analogów całkowicie pozbawionych pierścienia D (*des-D* analogi). Opisał nieoczekiwany wpływ nienaturalnej

Open Research Biopharmaceutical Internship Support

konfiguracji na C-14 na odwrócenie równowagi pre-witamina – witamina i jej potencjalny wpływ na aktywność. Doktorant opisał również syntezę innego polskiego zespołu, Profesora Jerzego Wichy, prowadzące do otrzymania fragmentu *ent*-indanu w roku 2001 oraz 17-*epi* analogu. Nie wspomniał jednak o tym, że kilka lat później (Pol. J. Chem 2005) ten sam zespół otrzymał tzw. *ent*-calcitriol, o odwróconej konfiguracji absolutnej na prawie wszystkich (sześciu) centrach stereogenicznych, w tym również w pierścieniu A. Doktorant opisał również syntezę ważnych biologicznie 16-dehydro analogów witamin D, syntetyzowanych w zespole Milana Uskokovica w firmie Hoffman-La Roche, o wysokim potencjale terapeutycznym. Przedstawiono też syntezę 17(20)-dehydro calcitriolu z zespołu Martina Calverley'ego z duńskiej firmy Leo Pharmaceuticals, prowadzącej badania nad lekami z grupy witamin D oraz syntezę analogicznych związków, z grupą metylenową przy C-2 zamiast przy C-10. Odpowiednio dużo uwagi poświęcił doktorant syntezom analogów ze zmodyfikowanym pierścieniem D, z zespołu Vandewalle – De Clercq, z Catholic University of Leuven oraz University of Gent oraz ze współpracującej z nimi firmy Theramex. Doktorant opisał szczegółowo syntezę *D-homo* calcitriolu i jego znaczącą aktywność przeciwnowotworową. Przedstawił również liczne syntezę firmy Leo Pharmaceuticals analogów podstawionych w na C-16 w normalnym pięcioczłonowym pierścieniu D.

Aktualne poglądy niektórych badaczy, w tym i samego Dino Moras, istotnie odbiegają od pierwotnej koncepcji tego autora, przedstawionej przez doktoranta w części 2.5.2, i dotyczącej wiarygodności modelu receptora VDR z usuniętym ogromnym fragmentem wiążącym ze sobą dwie główne domeny receptora. Daje tu znać o sobie brak odwołania do publikacji samego Moras z ostatnich lat jego badań, tzn. 2010-2014 oraz późniejszych prac jego głównej współpracownicy, Natachy Rochel.

Sporo uwagi poświęca doktorant syntezom *des*-D analogów, z zespołu Vandewalle-De Clercq, w strukturze których pierścień D jest symulowany za pomocą jego fragmentu, w postaci chiralnej grupy metylowej lub grupy metylenowej. Analogi te zachowały wysokie powinowactwo do VDR i podwyższoną, w stosunku do calcitriolu aktywność przeciwnowotworowa *in vitro*. Doktorant obszernie opisuje ciekawostkę syntetyczną i zastosowanie przegrupowania [3,3]-sigmatropowego Eschenmosera-Claisena w syntezie 19-*nor* analogów CF-spiro cyklicznych, wykonanych w zespole Vandewalle-De Clercq, o budowie analogicznej do steroidowego spironolaktonu. We wstępie doktorant przedstawił syntezę obejmujące ogromną ilość ponad 180 związków pośrednich i końcowych analogów witamin D. Nowością jest, autorskie posumowanie przez doktoranta podstawowej aktywności

Open Research Biopharmaceutical Internship Support

biologicznej siedemnastu analogów witamin D, z interesującego doktoranta obszaru analogów zmodyfikowanych w części CD-indanu. Podsumowanie to ciekawie porządkuje przedstawiony materiał literaturowy i może być pewnym wskazaniem w projektowaniu przez doktoranta nowych struktur. Niestety, przyjęte przez doktoranta założenie, że „właściwości antynowotworowe są powiązane z powinowactwem związków do VDR” nie znajduje potwierdzenia w ostatniej literaturze do tematu, a faktyczne korelacje nie są tak proste jak te przedstawione w Podsumowaniu. Brak ścisłej korelacji pomiędzy powinowactwem do VDR i faktyczną aktywnością na modelach *in vivo* stanowi obecnie główne wyzwanie w badaniach w tej dziedzinie. Niemniej jednak, co jest wartościowe i unikalne w pracach doktorskich, w rozprawie doktoranta zachodzi ścisła korelacja pomiędzy Wstępem a badaniami własnymi, tzn. pomiędzy wynikami krytycznej analizy literatury we Wstępie, a projektami syntez w badaniach własnych. Z analizy literatury tematu doktorant wyciąga logiczne wnioski i konsekwentnie projektuje obiekty do swoich syntez. Wstęp, w wersji angielskiej, mógłby stanowić interesujący artykuł przeglądowy, przedstawiający badania nad analogami witamin D zmodyfikowanymi w unikalnym fragmencie cząsteczki (pierścień D). Pracy takiej brakuje w literaturze, od czasu syntez zespołu Prof. Moritsa Vandewalle i Prof. Pierre De Clercq oraz od chwili ukazania się ostatnio publikacji przeglądowej N. Bolla i współpracowników, a dotyczącej, w pewnym stopniu, modyfikacji cząsteczki witaminy D w obrębie układu hydrindanu 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. Zestawił struktury dwóch aromatycznych analogów w pierwszej serii swoich analogów i struktury pięciu nowych *seko*-D analogów calcitriolu, w których podstawniki przy C-14 i C-17 skutecznie, jak się okazało, naśladują pierwotną strukturę pierścienia D calcitriolu. W bardzo żywym opisie badań własnych doktorant przedstawia dyskusję wybranych metod syntezy oraz nie tylko wyniki pozytywne, ale też i niekorzystne wyniki syntez, z których wyciąga odpowiednie wnioski tak, aby zmienione metody i drogi syntezy doprowadziły do zamierzonego celu. Ciekawym uzupełnieniem prac syntetycznych doktoranta jest przeprowadzone przez niego modelowanie dokowania otrzymanych struktur do kieszeni wiążącej receptora (LBD-VDR), niezależnie od tego, jak wiarygodny jest użyty w tym celu

Open Research Biopharmaceutical Internship Support

model fragmentu receptora. Dogodne jest zebranie w Podsumowaniu wszystkich schematów syntez oraz krótkich do nich komentarzy. Doktorant opisuje i przedstawia kolejno ponad piętnastoetapowe syntezy totalne dwóch analogów aromatycznych z wyjściowego α -tetralonu. W syntezie tej doktorant wykorzystał zarówno metody dotychczas stosowane w syntezie analogów witamin D jak i nowe, w tej dziedzinie, metody syntezy stereoselektywnej. Nie zaskakuje natomiast brak interesującej aktywności biologicznej analogów z aromatycznym pierścieniem D i usztywniona tym samym orientacją łańcucha bocznego. Znacznie ciekawsze, pod względem syntetycznym i biologicznych okazały się pary diastereomerycznych *seko*-D analogów z podstawnikami winylowymi przy C-14, o tej samej ilości atomów węgla w szkielecie, co naturalny calcitriol. W syntezie tych analogów doktorant wykazał się szeroką znajomością nowoczesnych metod syntezy związków o geminalnych centrach stereogenicznych. W uzupełnieniu syntez analogów witamin D doktorant opracował też nowe metody syntezy fragmentów strukturalnych, dehydropochodnych indanu i dekaliny, które mogą być wykorzystane w kolejnych syntezach analogów witamin D. Napotkane trudności syntetyczne, jak np. z zastosowaniem klasycznej reakcji Wittiga do łączenia fragmentów strukturalnych, doktorant pokonał poprzez zastosowanie alternatywnej sekwencji addycji acetonitrylu i kolejnej dehydratacji. Szereg metod syntezy półproduktów zostało zoptymalizowanych, w celu zapewnienia wystarczającej ilości materiału do wieloetapowych syntez. Niektóre fragmenty strukturalne doktorant uzyskał o tak wysokiej czystości, że udało się otrzymać ich monokryształy, odpowiednie do badań rentgenostrukturalnych, za pomocą których można było potwierdzić ich struktury. Interesującą ciekawostką są dobre zdjęcia otrzymanych monokryształów.

Część eksperymentalna jest przygotowana również bardzo starannie. Doktorant opisał bardzo szczegółowo warunki prowadzenia syntez i wykonania analiz oraz charakterystyk otrzymanych związków. 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 oraz HRMS. Interpretacja widm ^1H 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.

Open Research Biopharmaceutical Internship Support

W osobistym przekonaniu recenzenta grupa otrzymanych przez doktoranta *seko-D* analogów wyznacza najbardziej obiecujący obecnie kierunek badań struktura-aktywność w tej grupie związków. Ponadto, co ciekawe, aktywność biologiczna najbardziej obiecujących *seko-D* analogów potwierdza przyjętą przez doktoranta uproszczoną zasadę przewidywania aktywności *in vivo* poprzez porównanie dwóch wybranych aktywności *in vitro*, powinowactwa do VDR i aktywności różnicującej na linii HL-60.

Bibliografia jest niezbyt obszerna (105 pozycji), ale obejmuje starannie wybrane najważniejsze publikacje związane z tematyką pracy, głównie z ostatniej dekady ubiegłego stulecia. Nieliczne są zaś cytowane publikacje z pierwszej dekady tego stulecia, a całkowicie brak odnośników do publikacji z ostatnich kilku lat, za wyjątkiem publikacji własnych doktoranta.

Rozprawę doktorską mgr Marcina Szybińskiego czyta się z ogromnym zainteresowaniem i prawdziwą przyjemnością, jako relację z ciekawych badań i skutecznego pokonywania rozlicznych trudności, świadczącej o rozległej wiedzy syntetycznej i determinacji młodego badacza w osiąganiu zamierzonych celów. W podsumowaniu należy stwierdzić, że przedstawiona do oceny rozprawa opisuje bardzo obszerny zakres starannie zaprojektowanych, wykonanych i opisanych prac syntetycznych i modelowych i spełnia wysokie standardy stawiane tego typu przedsięwzięciom.

Z tego względu z pełnym przekonaniem stwierdzam, że dorobek publikacyjny doktoranta oraz przedstawiana do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Przedstawiam więc Wysokiej Radzie Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego mój wniosek o dopuszczenie mgr Marcina Szybińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Andrzej Kutner