

# OPONENTSKÝ POSUDEK

na disertační práci

## „Stanovení disociačních konstant vybraných léčiv“

---

Autor disertační práce: **ing. Zuzana Ferenčíková**

Oponent: prof.RNDr.Petr Solich, CSc.

Studium acidobazických vlastností biologicky aktivních látek zaujímá důležitou roli při vývoji a výzkumu nových lékových struktur; acidobazické vlastnosti ovlivňují adsorpci, distribuci i eliminaci látek z organismu. Informace z takto získaných údajů jsou cíleně využívány při vývoji nových léčiv, protože mají důležitý vliv na farmakokinetiku a farmakodynamiku léčivých látek. Hodnocení acidobazických vlastností léčivých látek se neobejde bez využití spolehlivých a dostupných analytických metod jako je potenciometrická titrace, spektrofotometrie, lze ale využít i separační chromatografické či elektromigrační metody.

Disertační práce ing. Zuzany Ferenčíkové je předložena jako soubor 14 původních originálních experimentálních prací autorky, publikovaných v období 2010-2013, doplněných teoretickou částí a dostatečně rozsáhlým komentářem k uvedeným pracím. Cílem disertační práce ing. Zuzany Ferenčíkové, která se skládá celkem ze šesti kapitol včetně Úvodu a Závěru, bylo využití vybraných instrumentálních metod (potenciometrické titrace a spektrofotometrické titrace) ke studiu termodynamických parametrů (disociačních konstant, změny entalpie, entropie a Gibbsovy energie) u vybraných 16 biologicky aktivních látek. V úvodní části se autorka zabývá obecně vybranými skupinami léčivých látek, použitými instrumentálními metodami a problematice disociačních konstant. Tato část je sepsána stručně, ale výstižně a autorka jasně specifikuje hlavní problémy při získávání údajů.

V experimentální části práce jsou kromě použitých chemikálií a instrumentace stručně shrnuty hlavní poznatky a výstupy z již publikovaných prací, s odkazem na detaily v uvedených pracích. V rozsáhlé Příloze jsou přiloženy původní originální vědecké práce publikované v odborné literatuře. Všechny práce – až na jednu – již byly publikovány či alespoň akceptovány pro publikaci, většinou ve velmi solidních zahraničních časopisech (Spectrochimica Acta A, J.Chem.Thermodynamics, Fluid Phase Equilibria, apod.), 13 z nich je publikováno v časopisech s Impakt faktorem větším než 1 a celková suma IF je přes 17. Je

ale škoda, že i přes velmi rozsáhlou publikační aktivitu není autorka disertační práce ani na jedné z publikovaných prací uvedena jako první autor. Mohlo by to vyvolat úvahu, jak intenzivně byla zapojena do sepisování rukopisů.

Předložená disertační práce je co do počtu stran velmi rozsáhlá – přes 100 stran vlastní práce a téměř 150 dalších stran příloh, a obsahuje velké množství experimentálních dat, statistických údajů a výsledků. Vzhledem k tomu, že všechny práce autorky předložené v disertační práci již byly řádně oponovány před akceptací do vědeckých časopisů, je prakticky obtížné najít a vytknout nějaké připomínky. Formální úprava práce je velmi pečlivá a plně vyhovuje požadavkům kladeným na disertační práce. Práce přináší řadu původních poznatků do problematiky acidobazických vlastností nových struktur léčivých látek a je dokladem přínosu autorky v uvedené oblasti výzkumu.

Disertační práce je sepsána pečlivě, přehledně a prakticky bez chyb (např. str. 11 – Spektrofluorometrie). K práci mám tyto připomínky či dotazy:

- s.14 – Souhrn - proč byly dvě léčivé látky (risedronát a capecitabin) zařazeny do obou skupin – „ve vodě dostatečně rozpustných“ i „ve vodě slabě rozpustných“ léčivých látek ?
- str.22 – Butamirát (Sinecod) je látkou používanou v terapii již nejméně dvacet let. Proč u takto známé léčivé látky byly měřeny disociační konstanty, ty nebyly známy již předtím ?
- str. 33 – co máte na mysli pod pojmem „stabilita kolon“ ? Existují kolony, které by byly stabilní v širokém rozsahu pH ?

Závěrem mohu konstatovat, že ing. Zuzana Ferenčíková předložila velmi kvalitní disertační práci, obsahující velké množství experimentálních výsledků publikovaných v kvalitních odborných časopisech. Posuzovaná práce dokazuje vysokou vědeckou aktivitu autorky a splňuje všechna kritéria kladená na disertační práce, proto ji doporučuji přijmout k obhajobě a dalšímu řízení o udělení vědecké hodnosti Ph.D..

Hradec Králové 22.5.2013



Prof.RNDr.Petr Solich, CSc.

## Oponentský posudek

### na doktorskou disertační práci Ing. Zuzany Ferenčíkové „Stanovení disociačních konstant vybraných léčiv“.

Oponovaná doktorská disertační práce se zabývá stanovením termodynamických disociačních konstant 16 dodaných léčiv ve vodě. Všechna studovaná léčiva jsou chemicky složité organické sloučeniny, které ve své molekule obsahují jedno nebo více bázičických center, jeden nebo více kyselých vodíků, popřípadě kombinaci obojího. Komplikujícím faktorem je navíc malá rozpustnost některých léčiv ve vodě. Stanovení disociačních konstant takovýchto sloučenin je proto velmi obtížné. Podle povahy a rozpustnosti léčiva ve vodě uchazečka použila ke stanovení techniku potenciometrické nebo spektrofotometrické titrace a precizně změřená experimentální data zpracovala sofistikovanými matematickými a matematicko-statistickými programy. Objem vykonané experimentální práce s následným zpracováním experimentálních dat je nepochybně velký a zaslouží uznání. Výsledky byly publikovány ve 14 původních sděleních v časopisech s recenzním řízením, u nichž je Ing. Ferenčíková spoluautorkou, ani v jenom případě však ne jako první autor.

#### **Dotaz: Jaký je podíl uchazečky na publikacích týkajících se předmětu disertační práce?**

Práce je členěna do sedmi kapitol a doplněna Seznamem publikovaných prací s jejich plnými texty v přílohách. Věcně je disertační práce tvořena dvěma bloky. První zahrnuje kapitolu s názvem Literární část s popisem studovaných léčiv, kapitolu s názvem Teoretická část zaměřenou na danou problematiku a metodiku jejího řešení, a velmi stručnou kapitolu s názvem Experimentální část s obecným popisem provedených experimentů. Druhý blok zahrnuje kapitolu Výsledky a jejich diskuse, která je z větší části kompilátem připojených publikací v řazení podle jednotlivých léčiv, s důrazem na vyhodnocení experimentálních dat.

#### **K oponované doktorské práci mám následující dotazy a připomínky:**

V Kap. 3.3 jsou diskutovány termodynamické aspekty disociační, tedy rovnovážné konstanty.

#### **Dotaz: V Tab. 3 je použit výraz „Reakce probíhá ...“. Jedná se o proces ustanovování rovnováhy? Souvisí spolu poloha rovnováhy vyjádřená rovnovážnou konstantou a rychlost ustanovování rovnováhy závisící na rychlostní konstantě?**

Kap. 3.5 je nazvána Kvantově-chemická predikce disociačních konstant na základě struktury molekuly. Název kapitoly je zavádějící, neboť popsání metody predikce disociačních konstant jsou založeny na databázích experimentálních hodnot a na vztazích podobnosti (Hammettova rovnice, Taftova rovnice), popřípadě na dalších empirických vztazích. Kvantově-chemická predikce by byla založena na kvantově-chemickém výpočtu energií disociované a nedisociované formy dané chemické sloučeniny, přičemž zásadním problémem je zahrnutí vlivu prostředí, což je velice obtížný a pro velké molekuly v současné době zřejmě neřešitelný problém.

V Kap. 3.9.2 je diskutována aplikace faktorové analýzy na určení počtu částic v roztoku. Ve schématu na Obr. 20 je u symbolu  $E$  uvedeno, že se jedná o matici chyb.

**Dotaz: Maticí chyb v Obr. 20 jsou míněny experimentální chyby? Byla k výpočtu skutečně použita faktorová analýza (FA), nebo se jednalo o metodu hlavních komponent (PCA)? Jaký je mezi nimi rozdíl a jak se aplikace obou metod projeví ve správnosti určení počtu částic v roztoku?**

Kap. 5 Výsledky a jejich diskuse se podrobně zbývá zejména popisem vyhodnocení jednotlivých experimentů. Postrádám však srovnání stanovených disociačních konstant se známými hodnotami tam, kde existuje strukturální podobnost mezi částmi molekuly léčiva a jinou vhodnou molekulou. Rozhodně by to potvrdilo správnost výsledků.

**Dotaz: Proč nebylo uvedené porovnání alespoň u některých léčiv provedeno? Mohla by uchazečka uvést alespoň jeden případ studovaného léčiva, na kterém by porovnání prezentovala?**

Některá studovaná léčiva jsou ve formě solí se slabými kyselinami (např. Fyzostigmin salicylát, Sildenafil citrát, Butorfanol tartarát, Butamirát dihydrogencitrát) a stanovení disociačních konstant zahrnuje jak hodnoty pro samotné léčivo, tak i doprovodnou kyselinu. V některých případech lze ale stanovené hodnoty  $pK_a$  doprovodných kyselin snadno přiřadit.

**Dotaz: Proč nebyla stanovená  $pK_a$  porovnána se známými hodnotami  $pK_a$  doprovodných kyselin? Mohla by uchazečka předvést alespoň jedno takové srovnání?**

Některá studovaná léčiva mají ionizovatelné karboxylové skupiny (např. Methotrexát) nebo protonovatelné atomy dusíku (např. Rasagilin, Fyzostigmin salicylát, Butorfanol tartarát, Butamirát dihydrogencitrát) nezapojené do konjugovaného systému. Acidobázické procesy na těchto centrech se nemohou projevit významnými změnami v UV-VIS oblasti, neboť se jedná o  $n-\pi^*$  přechody s malými hodnotami molárních absorpčních koeficientů. Karboxylové kyseliny vykazují slabou absorpci při cca 205 nm, protonace alifatické aminoskupiny nezapojené do konjugace se spektrálně v měřené oblasti zřejmě neprojeví vůbec. Přes tyto skutečnosti byly indikovány změny v UV-VIS oblasti a stanoveny disociační konstanty, jejichž hodnoty lze přiřadit disociaci či protonaci na uvedených centrech.

**Dotaz: Skutečně byly u Butorfanol tartarátu spektrofotometrickou titrací nalezeny dvě disociační konstanty s blízkými hodnotami? Jedna z nich zcela jistě odpovídá disociaci fenolické hydroxyskupiny. Čemu odpovídá druhá?**

**Dotaz: Mohla by se uchazečka vyjádřit ke spektrofotometrickému stanovení  $pK_a$  léčiva Rasagilin, které obsahuje pouze jednu protonovatelnou alifatickou aminoskupinu nezapojenou do konjugace? Zjištěná hodnota  $pK_a = 7.13$ , resp.  $7.07$ , je značně netypická pro alifatické sekundární aminy ( $pK_a$  dimethylaminu ve vodě je 10.64).**

Kap. 5.10 se zabývá termodynamickými parametry disociačního procesu. V této kapitole lze nalézt řadu chybných tvrzení, která nelze nechat bez komentáře. Věta „Protonační energii, definovanou jako rozdíl mezi celkovou energií protonované a neutrální formy, lze považovat za ukazatel síly vodíkové vazby (...) a lze ji proto užít k určení správné lokalizace nevhodnějšího místa vodíkové vazby.“ ukazuje na naprosté nepochopení rozdílu mezi pojmy Brønstedova kyselina (její disociace je podstatou všech měření v disertační práci) a vodíková vazba. Rovněž pojem QSAR je chápán mylně, v práci žádný vztah tohoto typu není použit (Obr. 44 jen dokumentuje platnost vztahu (5)). Interpretace článku [151] (nepochopitelně přisuzovaného Grunwaldovi) týkajícího se vztahu mezi enthalpií a entropií ve znění „Podle jeho teorie může být korelace způsobena dvěma typy interakcí, a

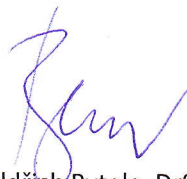
to buď přeuspořádáním roztoku, nebo molárním posunem“ je zcela nesrozumitelná. Vztah mezi enthalpií a entropií je definován tzv. isokinetickým vztahem  $\Delta H = \beta \Delta S$ , přičemž jak přesvědčivě ukázal Exner (zejména v článku „How to get wrong results from good experimental data: A survey of incorrect applications of regression.“, J. Phys. Org. Chem. **1997**, *10*, 797-813, případně též v knize Exner O., Korelační vztahy v organické chemii, SNTL Praha, 1981, str. 108), nelze isokinetickou teplotu  $\beta$  určit ze závislosti  $\Delta H$  vs  $\Delta S$  získaných výpočtem ze stejných experimentálních dat. Závislost na Obr. 43 bude ze své podstaty vždy lineární, ale fyzikálně nesprávná, a její interpretace je tedy nesmyslná. Překvapivé je, že uvedená analýza prošla recenzním řízením a je předmětem publikace (Příloha P14, v článku je dokonce odkaz na výše uvedenou Exnerovu práci), když je založena na dávno známém omylu.

Oponovaná práce má z mého pohledu i formální chyby a nedostatky. V disertační práci bych očekával jednotně a formálně bezchybně vysázené chemické vzorce. Např. ve vzorci Fyzostigminu na str. 15 chybí vazba, v některých vzorcích, např. Methotrexátu na str. 13 nebo Sitagliptin fosfátu na str. 19 chybí vyznačení absolutní konfigurace na chirálním centru. V Kap. 2.1.2, Kap. 2.7.1, Kap. 2.7.2 a Kap. 2.8.1 chybějí symboly  $pK_a$ . Chemické názvy alkoholů se píší správně methanol, ethanol, název isopropanol je zcela chybný. Podobně správně má být psáno Crohnova, Myasthenia gravis, nikoliv Cronova choroba, Myastenie gravis. Zarážející jsou neobratné formulace, jako „Jsou-li k dispozici pouze dvě různé teploty“ (str. 26), „jsou odebrány ty vlnové délky, u kterých nedochází k dostatečnému ovlivnění chromoforu“ (str. 35), „reakční směs je tvořena molekulou léčiva a protony“ (str. 38), „Rovnovážná směs vzniká titrací reakční směsí“ (str. 38), „Cílem faktorové analýzy je proto sumarizace dat a jejich redukce“ (str. 39), „porovnání zbytkové reziduálové chyby“ (str. 40), „Disociace vardenafilu poskytuje čtyři protonační konstanty“ (str. 66), apod. Některá uvedená tvrzení jsou ve sporu, např. na str. 14 je uvedeno, že Rasagilin je rozpustný ve vodě, na str. 56 je naopak uvedeno, že tento typ léčiv je velmi omezeně rozpustný ve vodě (a to lze na základě chemické struktury očekávat).

#### Závěr:

Přes nepochybně velký objem vykonané práce jsem nucen na základě uvedeného hodnocení přistoupit k závěru, že doktorskou disertační práci Ing. Zuzany Ferenčíkové doporučuji k obhajobě s výhradami, a očekávám, že při obhajobě přesvědčivě vysvětlí problematické části své práce.

V Pardubicích 10. května 2013



prof. Ing. Oldřich Pytela, DrSc.