

Oponentský posudek na doktorskou disertační práci pana Ing. Karla Pauka "Syntéza a biologická aktivita *N*-aryl/alkyl-salicylamidů a jejich prekurzorů"

Ing. Karel Pauk se ve své disertační práci zaměřil na amidy substituovaných kyselin salicylových, kde jako „amin“ vystupovaly *N*-arylamidy L-aminokyselin. Tyto látky, pracovně nazývané jako diamidy **1**, studoval z celé řady hledisek. Svoji pozornost zaměřil zejména na: (i) mechanismus vzniku diamidů **1** přesmykem esterů L-aminokyselin s *N*-arylsalicylamidy **3**, (ii) alternativní syntézy diamidů **1** a (iii) biologickou aktivitu diamidů **1** a jejich prekusorů.

Vznik diamidů **1** přesmykem esterů **3** již dříve popsala Vinšová se spolupracovníky (*Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 5007-11, *ibid.* **2010**, *51*, 23-6). Ve druhé z citovaných prací předpokládají autoři, že intermediátem přesmyku je imidazobenzoxazinový derivát vzniklý synchronním dvojnásobným nukleofilním atakem (karboxamidu volnou aminoskupinou aminokyseliny a esterové skupiny amidickým dusíkem), který po postupném otevření dihydrooxazinového a tetrahydroimidazolového cyklu poskytne diamid **1**. Uvedený mechanismus disertant oprávněně zpochybnil s poukazem na malou pravděpodobnost synchronního ataku dvou rozdílně elektrofilních skupin dvěma rozdílně nukleofilními skupinami. Navrhl pravděpodobnější několikastupňový mechanismus: vznik benzoxazinového intermediátu nukleofilním atakem esterové skupiny deprotonovaným amidovým dusíkem následovaný otevřením dihydrobenzoxazinového cyklu, nukleofilním atakem amidového karbonylu volnou aminoskupinou L-aminokyseliny a otevření takto vzniklého tetrahydroimidazolového cyklu na diamid **1**. Výsledky kinetických studií (závislost pozorované rychlostní konstanty přesmyku na koncentraci triethylaminového pufru v sérii esterů **3** a z nich odvozené hodnoty Hammettovy reakční konstanty ρ pro cyklizaci) podporují navrženou hypotézu. Přesmykem esterů **3** bylo připraveno 12 různých diamidů **1** (vesměs dosud nepopsaných sloučenin), což svědčí o tom, že popsaná reakce je obecná.

Vzhledem k tomu, že výtěžky diamidů **1** získaných výše popsaným přesmykem esterů **3** nebyly vysoké, disertant navrhl dvě další alternativní syntézy diamidů **1** a prověřil je. V prvním případě byl nejprve syntetizován amid L-aminokyseliny, který byl po deprotekcí aminoskupiny kondenzován s *O*-acetylovanou kyselinou salicylovou, ve druhém případě šlo o konsektivní výstavbu „diamidové“ části cílové struktury na *O*-acylované salicylové kyselině.

U připravených sloučenin (salicylamidů **2**, esterů **3** a diamidů **1**) byla studována jejich antimikrobiální účinnost. Obecně lze konstatovat, že nejvyšší antimikrobiální účinnost vykazují původní *N*-arylsalicylamidy. Diamidy **1** byly rovněž testovány jako potenciální antiproliferativní agens; jejich cytotoxicita vůči některým typům nádorových buněk se zdá být slibná.

Výsledky z disertační práce byly podkladem pro 5 publikací v recenzovaných časopisech (*J. Comb. Chem.*, *Mini-Reviews in Org. Chem.*, *Crystals*, *Eur. J. Med. Chem.*, *Bioorg. Med. Chem.*); tuto skutečnost lze považovat za nezávislou kontrolu významu a kvality dosažených výsledků. Množství dosažených výsledků a jejich interpretace rovněž odpovídá požadavkům kladeným na disertační práci. Potud tedy vše v pořádku.

Velmi nespokojen jsem však byl se stylem disertační práce. V této oblasti se má disertant ještě mnoho co učit. Studium textu disertační práce místy představovalo spíše luštění rébusu. Kromě stylistických nedostatků snižujících srozumitelnost textu se vyskytovaly i chyby v číslování vzorců, pravopisné chyby a chyby v názvosloví. Světlou výjimkou je oddíl 3.5 věnovaný kinetickým studiím. Ten je na rozdíl od ostatních částí disertace sepsán poměrně srozumitelně a s minimem chyb, kromě chybně uvedených čísel látek v obr. 17 a 18.

Jednotlivé chyby stylistické, pravopisné a názvoslovné v posudku neuvádím; jejich výčet by zabral více stran. Vyznačil jsem je pouze tužkou ve výtisku disertace. Víím, že tyto

chyby lze považovat do jisté míry za formální, nicméně pokud by disertant zaslal rukopis této kvality do nějaké redakce, nejspíš by mu jej okamžitě vrátili k důkladnému přepracování.

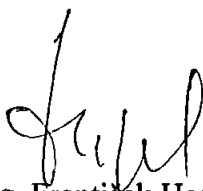
Dotazy a připomínky:

- V části Výsledky a diskuse postrádám zhodnocení a porovnání alternativních postupů pro syntézu diamidů 1, v textu označovaných jako CESTA II a CESTA III.
- Deprotonace aminoskupiny anilinu BuLi (str. 9, schéma 5) se opravdu provádí při teplotě 80 °C?
- Jak souvisí u léčiv efektivní koncentrace (EC) s jejich toxicitou (str. 19)?
- Na základě jakých informací vybíral disertant rozpouštědla méně toxická než DMF (str. 29)? Kromě ethyl-acetátu, který je skutečně poměrně málo toxický, jsou ostatní uvedená rozpouštědla buď srovnatelně toxická s DMF, nebo dokonce výrazně toxickejší (acetonitril, dichlormethan, toluen).
- Na str. 45 disertant uvádí, že: „...podmínkou pro možnost použití UV-Vis spektrofotometrie pro sledování průběhu reakce je, aby spektra výchozí látky a produktu nebyla překryta absorpčním pásem rozpouštědla či pufrem. Tato podmínka však byla splněna pouze v chloroformu a nikoliv ve vodě....“ To je zvláštní, vždy jsem se domníval, že voda prakticky v celé UV oblasti transparentní a je proto jedním z použitelných rozpouštědel pro tuto oblast...
- Co znamená červená barva u některých řádků v tabulkách uvádějících výsledky biologického hodnocení připravených sloučenin (odd. 3.6)? Nikde jsem nenašel vysvětlení.

Přes uvedené výhrady konstatuji, že disertační práce Ing. Karla Pauka obsahuje původní výsledky, z nichž některé již byly publikovány v recenzovaných časopisech. Uchazeč prokázal, že je schopen samostatné vědecké činnosti a splňuje tak podmínky § 47, odst. 4 zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách.

Doporučuji proto disertační práci Ing. Karla Pauka k obhajobě.

V Praze dne 27. ledna 2014


doc. Ing. František Hampl, CSc.

Oponentský posudek disertační práce Ing. Karla Pauka

Syntéza a biologická aktivita *N*-aryl/alkyl-salicylamidů a jejich prekurzorů

Disertační práce Ing. Karla Pauka je strukturována obvyklým způsobem. V teoretické části autor uvádí čtenáře do problematiky salicylanilidů a jejich derivátů. Zabývá se mj. způsoby jejich přípravy, přípravy celé řady derivátů, které jsou od nich odvozeny, nebo které ve své molekule obsahují substrukturální fragment salicylamidu. V další části jsou zformulovány cíle, jichž se snažil doktorand dosáhnout. V části Výsledky a diskuse autor rozebírá syntetické cesty a jejich úskalí, se kterými se potýkal při přípravě finálních sloučenin. V této části je rovněž studován přesmyk hydrobromidů aminokyselin *N*-fenylsalicylamidů na finální diamidy. Studium tohoto mechanismu je podpořeno kinetickými studiemi. V této kapitole disertační práce je také diskutována biologická aktivita některých připravených sloučenin, se snahou o hledání vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou. V kapitole Závěr práce jsou shrnuty výsledky, kterých ing. Pauk v rámci svého doktorského studia dosáhl. V experimentální části, jsou poté uvedeny laboratorní postupy a charakteristiky připravených sloučenin. Práce je zakončena seznamem použité literatury, čítající 103 odkazů a rovněž separáty pěti publikovaných prací.

Práce je sepsána pečlivě, přesto se však autor nevyvaroval několika překlepů, které jsem vyznačil v textu. Mám k ní rovněž několik připomínek a dotazů.

Na str. 4 je nepřesná formulace, ze které vyplývá, že mebendazol je směs benzimidazolového anthelmintika s klozantem. Rovněž formulace, že *N*-fenylsalicylamidy jsou známy hlavně jako léčiva mikrobiálních infekcí je řekněme hodně optimistická.

Na str. 5 je uvedeno, že látky strukturně podobné *N*-fenylsalicylamidům jsou dnes používány jako inhibitory enzymů protein kináz. Chybí mi zde literární odkaz. Může autor toto vyjádření konkretizovat?

Na str. 7 je u výčtu bakterií chybně uvedeno „*Chlamydia Schigella* spp.“.

V kapitole 1.2 a 1.3 autor ve většině případů uvádí dosažené výtěžky, v řadě případů (např. na str. 11, 15) tyto údaje chybí. Když se autor rozhodl tyto údaje v práci uvádět, měly by být uvedeny na všech místech, kde se o nich zmiňuje.

Na str. 16 je uvedeno: „Byly vybrány některé lipofilní aminokyseliny, jako glycin, (R nebo S)-alanin ...“. Jsou tyto aminokyseliny opravdu lipofilní?

Na str. 19 je uvedena ne zcela jasná formulace „Aktivita derivátů *N*-fenylsalicylamidů byla testována a srovnána se samotnými *N*-fenylsalicylamidy ...“. Je pouze jeden *N*-fenylsalicylamid; s jakými sloučeninami byla aktivita srovnávána?

Na str. 19 jsou rovněž zmíněny modifikace fenolické skupiny u kyseliny salicylové, o jaké modifikace se jednalo?

V experimentální části vyjma tří látek (2l, 2m, 2n) postrádám přípravu a charakterizaci sloučenin řady 2. Na str. 26 je zmíněno, že tyto látky byly dříve publikovány, nicméně autor je musel připravovat a musel je charakterizovat, alespoň teplotou tání, což měl, dle mého názoru v práci uvést.

Na str. 28 je odkaz na schema 20 na str. 18. Schema 20 se nachází na str. 17.

Na str. 29 je zmíněna toxicita DMF a z tohoto důvodu odkaz na další rozpouštědla, např. 1,4-dioxan, acetonitril, THF apod. Jaký je rozdíl v toxicitě zmíněných rozpouštědel?

U popisovaného přesmyku při absenci báze vznikal vždy cyklický produkt? Nebo byla připravena pouze sloučenina 5a. Z jakého důvodu tato látka nebyla testována na biologickou aktivitu?

Na str. 32 je zmíněna inhibiční aktivita derivátů *N*-fenylsalicylamidů, o jakou aktivitu se jedná?

Čím si autor vysvětluje nižší výtěžky u reakcí, viz. schema 35 (str. 32,33)?

Na str. 44 je chyba v názvu u sloučeniny 5.

Ze substituentů v obrázku 24 na str. 55 byla vyloučena nitroskupina, byl v tom nějaký záměr?

Na str. 55 je zmíněna nutnost přítomnosti halogenu na salicylovém kruhu; v tab. 3 ale jiné deriváty uvedeny nejsou. Tzn., že deriváty s jinými substituenty testovány nebyly? Proč nebyly připraveny sloučeniny i s jiným halogenem než chlorem (substituent R¹)?

V závěru postrádám shrnutí, kolik sloučenin bylo v rámci disertační práce připraveno a kolik z nich je dosud v literatuře nepopsaných.

Na str. 65 je uveden výtěžek reakce 20-60 %, ale hned první látka v seznamu byla připravena ve výtěžku 5 %. Podobně na str. 73 byl deklarován výtěžek 90-98%, a sloučenina 4h byla připravena ve výtěžku 59 %.

Z jakého důvodu nebyla změřena optická otáčivost i u látek ze skupiny 4 (str. 73-81).

¹³C NMR spektrum sloučenin obsahující CF₃ skupinu (sloučenina 4k str. 77, resp. 1k str. 87) je popsáno nesprávně.

Na str. 89 u sloučeniny 6k nesouhlasí počet aromatických vodíků v ¹H NMR spektru.

Na str. 115 u sloučeniny 21a je popsáno šest vodíků odpovídající dvěma methylovým skupinám při chemickém posunu δ 2.26 ppm a jako štěpení u tohoto signálu je uveden multiplet, s takto popsáním štěpením nelze souhlasit.

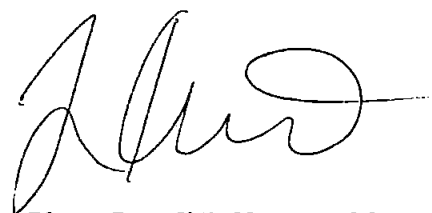
Vzhledem k tomu, že signály vodíků v ¹H NMR spektrech jsou v alifatické oblasti přiřazeny, nebylo by od věci provést přiřazení vodíků i v aromatické oblasti. Podle mého názoru by to bylo možné u převážné většiny látek a to i bez nutnosti měření 2D experimentů.

V práci jsou používány slangové, popř. neobvyklé výrazy, jako např. ... reakce běžela... (str. 29), ... do baňky byla předložena HBr sůl ..., vzniklá sraženina se zfiltrovala a několikrát rozplavila v EtOAc (str. 92) apod.

Závěrem bych rád podotkl, že pravděpodobnost využití derivátů salicylanilidu v humánní medicíně není příliš vysoká. Vzhledem k jejich toxicitě a dráždivosti se mi tyto látky příliš perspektivními nejeví. Odhlédnu-li od této záležitosti, musím konstatovat, že ing. Pauk ve své práci vykonal veliký kus práce. Provedl značné množství syntéz a připravil poměrně rozsáhlou knihovnu sloučenin. Řada získaných výsledků je rovněž součástí publikovaných prací v časopisech s IF.

Předložená disertační práce splňuje v celém rozsahu požadavky na tyto práce kladené, a proto ji **doporučuji** přijmout jako podklad k získání vědecké hodnosti Ph.D..

V Hradci Králové 14. ledna 2014



Doc. PharmDr. Jiří Kuneš, CSc.