



Posudek na disertační práci Ing. Evy Horákové
„Syntéza biologicky aktivních dusíkatých derivátů tří- až pětičlenných karbocyklických sloučenin“

Disertační práci *Syntéza biologicky aktivních dusíkatých derivátů tří- až pětičlenných karbocyklických sloučenin* vypravovala Ing. Eva Horáková na ústavu organické chemie a technologie Univerzity Pardubice pod vedením doc. Pavla Drabiny. Podtémata řešená v rámci disertační práce spojuje snaha o stereokontrolu reakcí katalyzovaných měďnatými komplexy s chirálními 2-(pyridin-2-yl)imidazolidin-4-ony jako ligandy. Doktorandka připravila sérii nových 2-(pyridin-2-yl)imidazolidin-4-onů s dvěma centry chiraloty. U těchto ligandů syntetizovala vždy všechny čtyři stereoisomery pro otestování enantioselektivity katalyzátorů z nich připravených.

V první části práce doktorandka studovala intermolekulární asymetrické nitroaldolové kondenzace nitromethanu s různými aldehydy katalyzované měďnatými komplexy 2-(pyridin-2-yl)imidazolidin-4-onů. U nejuspěšnějších katalyzátorů bylo dosaženo enantiomerních přebytků 90 % i více. Výťažky nitroaldolových kondenzací zhruba korelovaly s elektrofilitou karbonylové skupiny použitého aldehydu. Kromě zmíněných intermolekulárních Henryho reakcí se doktorandka věnovala i intramolekulárním kondenzacím uvedeného typu. U tří různých 2-(2-nitroethyl)benzaldehydů studovala diastereoselektivitu kondenzace na 2-nitroindan-1-oly v závislosti na typu použité báze a rozpouštědla. Pokusy o enantioselektivní syntézy 2-nitroindan-1-olů katalyzované měďnatými komplexy chirálních 2-(pyridin-2-yl)imidazolidin-4-onů nebyly úspěšné. Úspěšné nebyly ani pokusy o enantioselektivní kondenzace katalyzované měďnatými komplexy (+)-sparteinu a kondenzace prováděné v přítomnosti β -cyklohextrinu.

V další části práce se doktorandka zaměřila na stereoselektivní cyklopropanace styrenu ethyl-diazoacetátem, opět s využitím měďnatých komplexů chirálních ligandů. Vzniklé stereoisomery ethyl-2-fenylcyklopropankarboxylátu hodlala doktorandka převést na karbamáty 2-fenylcyklopropanaminu, u nichž lze předpokládat inhibiční účinek na cholinestasy. Cyklopropanace styrenu ethyl-diazoacetátem katalyzovaná měďnatým komplexem chirálního 2-(pyridin-2-yl)imidazolidin-4-onu (**2R,5S**)-**8** neprobíhala enantioselektivně, proto doktorandka připravila potřebné stereoisomery ethyl-2-fenylcyklopropankarboxylátu za katalýzy měďnatými komplexy obou enantiomerů bisoxazolinových ligandů podle Evanse (cit. 197). Připravené ethyl-2-fenylcyklopropankarboxyláty (všechny čtyři diastereoisomery) byly převedeny na azidy a podrobeny Curtiovu odbourání v přítomnosti alkoholů potřebných pro vznik požadovaných karbamátů. U nich byly stanoveny: $\log P$, IC_{50} (pro AChE i BChE) a u některých i jejich cytotoxicita.

Konstatuji, že doktorandka vykonala velký kus práce, i když – jak se v chemii často stává – ne vždy se vše podařilo dle původního záměru. Nicméně byla získána řada poznatků, které bezpochyby ovlivní a nasměrují další výzkum v této oblasti Cíle práce jsou jasně a srozumitelně formulovány, práce je členěna logicky a je sepsána přehledně a srozumitelně. Výsledky práce byly předmětem několika původních sdělení v recenzovaných impaktovaných časopisech (4 vyšlé, 1 zasláno k uveřejnění). Zmíněné publikování dosažených výsledků lze považovat za nezávislé posouzení kvality disertační práce.

Dotazy a komentáře oponenta k předložené práci:

1. *Chiral switch* je bezesporu cesta k léčivům s vyššími hodnotami terapeutického indexu. Nicméně přestože k racemickému salbutamolu (je používán při akutních záchvatech astmatu a stal se předlohou pro salmeterol) existuje enantiomerně čistý levarbuterol ((*R*)-salbutamol), k jeho užívání existuje jistá skepse (<https://en.wikipedia.org/wiki/Levosalbutamol>). (*R*)-Salmeterol, pokud je mi známo, není dosud nikde registrován (což samozřejmě není argument proti hledání způsobů jeho syntézy). V některých případech, jako je např. antihypertenzivum labetalol s dvěma centry chiraloty, se léčivo vyrábí jako směs všech čtyř diastereoisomerů. Jeho 1'*R*,1*R* isomer je β -antiadrenergikum, 1'*R*,1*S* isomer je α -antiadrenergikum (synergicky působící sympatolytická

aktivita) a zbývající isomery ($1'S,1R$ a $1'S,1S$) jsou sice bez účinku na adrenoreceptory, nicméně údajně potlačují hepatotoxicitu isomerů $1'R,1R$ a $1'R,1S$. Je známo něco o účinnosti jednotlivých stereoisomerů moxapridinu (jsou také čtyři)? V literatuře jsem nic nenalezl. Proto bych byl opatrný ve volbě uváděných příkladů... Největší cena nalezeného způsobu enantioselektivní Henryho reakce spočívá v tom, že vůbec existuje. Konkrétní využití se vždy najde. (Co například kondenzace piperonalu s nitroethanem, která by poskytla nitroalkohol s konfigurací R v benzylové poloze?).

- Nemohou připravené ligandy, imidazolidin-4-ony, které mají v poloze 5 vodík, epimerizovat?
- Str. 23, Schéma 10: výchozí 6-nitrohexanoát se připravuje Michaelovou adicí nikoliv 4-brombutyrátu (to by jistě nešlo!), nýbrž organokovového činidla (Zn, Cu) z něj připraveného, takže jakási variace na Reformatského syntézu.
- Str. 95, Tab. 1. Co znamenají záporná znaménka u ee ve druhém řádku tabulky? Enantiomerní přebytek je vždy kladné číslo.
- Vzorec rivastigminu na str. 117 (a ještě další vzorce na jiných místech disertace:



Správné zobrazení respektující valenční úhly sp^3 hybridizace:

Toto vypadá hrozně. Jde přece o sp^3 uhlík! Jaký by byl valenční úhel mezi vazbou směřující před nákresnu a za nákresnu? Valenční úhly jsou zde "znásilněny".



jde-li H dozadu

jde-li H dopředu

- Na str. 105 (a též v příslušných tabulkách) je pro cyklizaci látky **20** uvedena $k_{obs} = 0.163 \text{ s}^{-1}$. Z toho vyplývá hodnota $\tau_{1/2} = 4.25 \text{ s}$. To by byla reakce téměř u konce za cca 21 s (ani by nešla naměřit NMR spektra!). Nemá tam být spíše jednotka min^{-1} ? S časy uvedenými v tabulkách by to lépe korespondovalo.
- Str. 123: jestliže se u „polyolových“ karbamátů předpokládá jejich aktivní transport přes BBB pomocí GLUT proteinů, je významná hodnota jejich $\log P$?

Některé korekce, většinou formálního charakteru, jsem provedl tužkou přímo do disertační práce; nebylo jich ostatně mnoho.

Uvedené připomínky a komentáře nikterak nesnižují kvalitu předložené práce. Závěrem rád konstatuji, že předložená práce rozsahem experimentů, závěry z nich vyvozenými i formou zpracování splňuje nároky na disertační práce kladené. Ing. Eva Horáková prokázala, že je schopna samostatné vědecké činnosti ve výzkumu i ve vývoji.

Doporučuji proto disertační práci Ing. Eva Horákové k obhajobě.

V Praze dne 11. května 2019

doc. Ing. František Hampl, CSc.



POSUDEK OPONENTA DIZERTAČNÍ PRÁCE

Autor práce: Ing. Eva Horáková

Název práce: Syntéza biologicky aktivních dusíkatých derivátů tří až pětičlenných karbocyklických sloučenin

Typ práce: disertační práce

Studijní obor: Organická chemie

Vedoucí závěrečné práce: Doc. Ing. Pavel Drabina, Ph.D.

Rok odevzdání: 2019

Oponent: Prof. Ing. Pavel Hradil, CSc.

Pracoviště: Katedra organické chemie, Univerzity Palackého Olomouc

Kontaktní email: pavel.hradil@upol.cz

Slovní vyjádření, komentáře a připomínky oponenta:

Předložená disertační práce se věnuje syntéze biologicky aktivních dusíkatých derivátů tří až pětičlenných karbocyklických sloučenin. V podstatě se autorka věnuje asymetrickým syntézám. V úvodní části autorka na řadě případů vysvětluje na praktických důležitost opticky aktivních látek, kterými se ve vlastní práci následně zabývala.

V teoretické části se autorka zabývá rozborem publikací zabývajících se asymetrickou Henryho reakcí a využívanými katalyzátory. Toto je stěžejní část rešeršní práce. V druhé části této kapitoly je stručně pojednáno o inhibitech cholinesteráz. Jedná se o kapitolu kde je za pomoci odkazů vysvětlena funkce cholinergního systému a funkce cholinesteráz a stanovení inhibiční aktivity a rozdělovacího koeficientu.

Jako cíl si práce klade připravit nové ligandy, jejichž měďnaté komplexy by následně byly studovány jako katalyzátory asymetrické Henryho reakce různých aldehydů s nitroalkany. Druhým



stěžejním cílem bylo připravit karbamáty odvozené od léčiva tranlycyclopromin, studovat jejich inhibiční schopnosti k cholinesterázám a vliv substituce na tuto aktivitu.

Následuje experimentální část s přesnými popisy pracovních postupů a poté diskuse. V té se věnuje studiu asymetrické Henryho reakce, kdy si připravila katalyzátor. Jako katalyzátor slouží komplex měďnaté soli s ligandy, kterými jsou deriváty imidazolidin-4-onů. Tyto látky jsou pak použity jako katalyzátor při asymetrických adicích nitromethanu na vybrané aldehydy a při intramolekulární Henryho reakci.

Druhá část práce se zabývá syntézou glykosylovaných *N*-cycloalkylkarbamátů jako potenciálních inhibitorů cholinesteráz. Většina těchto látek je odvozena od 1-amino-1-fenylcykloproanu, 1-amino-1-fenylcyklobutanu případně fenylkarbamátů. U všech látek byla stanovena hodnota rozdělovacího koeficientu *P* a také inhibiční aktivita vůči cholinesterázám. Interakce některých látek s receptorem byla matematicky modelována.

Obě tyto poměrně rozdílné kapitoly spojuje to, že se při nich používají asymetrické reakce. Asymetrické cyclopropanace se autorce podařily, ale jen za použití již popsané metodiky. Použití vlastních katalyzátorů nebylo příliš úspěšné.

Rozsah práce je 154 stran + 3 stránky příloh NMR a publikované články. To odpovídá požadavkům kladeným na disertační práce.

Vlastní práce je členěna maličko odlišně, než bývá zvykem, to znamená za teoretickou částí následuje experimentální část a teprve poté diskuse, většinou je řazení opačné, ale není důvod proč by to nemohlo být i takto. Jen jsou některé výsledky málo srozumitelné, než se člověk dostane k diskusi, kde je vysvětlení. V části literatura je uváděno 359 citací, což hodně překračuje počet citací v podobných pracích.

Práce je psaná srozumitelně a bez překlepů. Rovněž literatura je psaná jednotně a co jsem kontroloval tak jsou odkazy správné.



K vlastní práci mám několik připomínek:

- V práci je uveden seznam zkratk, abecedně řazený a pěkně se v něm orientuje.
- Autorku musím rovněž pochválit, že u dříve připravených látek uvádí v experimentální části odkaz na původní literaturu. Mohla by být ještě s literaturou srovnána t.t. a ta by mohla sloužit k potvrzení struktury, ve všech případech by se pak možná nemuselo dělat NMR
- Bohužel číslování odkazů na literaturu v publikaci je přeházené, takže se špatně hledá konkrétní odkaz.
- Ve schématu 20 na straně 28 je chyba. Výchozí indandion podle původní literatury 185 není na aromatickém jádře substituován aryl nebo thienyl (skupina R¹) ale pouze vodíkem.
- Z hlediska čtivosti by bylo výhodné, pokud by všechny diskutované nebo připravené sloučeniny byly číslované. Týká se to jak rešeršní části, tak experimentální části. Usnadnilo by to diskusi.
- Souhlasím, že acetylcholin je významný a hodně studovaný neurotransmitter, ale není první popsany neurotransmitter (str. 34). Autorka uvádí citaci z roku 1914, ale histamin byl zmíněn již v roce 1910.
- Je pravdou, že při Alzheimerově chorobě je snižená hladina acetylcholinu. Zaujalo mne ale tvrzení autorky na straně 34, že nízká hladina acetylcholinu v cholinergních synapsích je způsobena zvýšenou aktivitou cholinesteráz. Toto jsem v citaci 29 nenašel. Nenašel jsem to ani v literatuře 224 (str. 38) kde je podobné tvrzení. Tam jsem naopak našel informaci, že starší lidé mají sníženou aktivitu cholin acetyl transferázy apod. Obdobně jsem pro toto tvrzení nenašel oporu ani v literatuře 223. (možná jsem špatně hledal).
- Tvrzení na straně 38, kde se píše, že „mezi inhibitory ChEs **schválené** jako farmaka pro léčbu AD patří“, s odvolávkou na různě staré časopisové informace mi připadá příliš odvážné. U takto znějící informace by měl být odkaz na schvalovací dokumentaci a konkrétní úřad. Např. fysostigmin byl sice v USA v minulosti používán, dnes všichni 4



výrobci s registrovaným DMF tuto registraci stáhly a ani stránka FDA nepotvrzuje jeho současnou registraci. Huperzin A se používá jako potravní doplněk, jako léčivo jsem ho nenašel. V rámci disertační práce není tato informace příliš významná. Protože autorce stačí, že tyto látky tuto aktivitu mají a jedná se jen o přesný výklad termínů. V případě komerčního výzkumu by ale podobný přístup byl problém.

- V práci jsem zaznamenal některé názvoslovné problémy. Některé názvy nejsou optimální např. butan-1-amin (str. 54), nebylo by lepší použít název 1-aminobutan, případně 1-butylamin? Obdobně 1-fenylcyklopropan-1-amin, 1-fenylcyklobutan-1-amin (str. 130). Toto se v práci vícekrát opakuje.
- Jak byla kontrolována optická čistota látek (S)-3, (S)-5 a (S)-6?
- Zápis experimentální části – kapitola 3.3 – str. 49 mi nepřipadá optimální. Spíš bych preferoval doplnit k dané látce vedle charakterizace doplnit tabulku, kde by byl použitý ligand, výtěžek a enantioselektivita. Bez kapitoly diskuse je takto prezentovaný výsledek nesrozumitelný a nepoužitelný.
- V práci jsem pozoroval, že autorka má problém s psaním závorek v názvech sloučenin např. str. 47, 59, 63, 64, 67. Možná by pomohlo, kdyby v případě většího množství kulatých závorek použila rovněž závorky hranaté.



Případné otázky při obhajobě a náměty do diskuze:

- Na základě čeho byly zvoleny studované struktury karbamátů (proč zrovna tyto látky).
- Rád bych se zeptal, zda nebyly pro cyclopropanační reakce (str. 121) zkoušeny vlastní katalyzátory, popisované v první části práce
- Proč se používala AChE z elektrického úhoře? Liší se nějak od lidské?

Práce přináší řadu nových originálních poznatků. Za nejvýznamnější považuji nové katalyzátory pro asymetrickou Henryho reakci, jejichž příprava není obtížná a mohly by nalézt použití i v jiných syntézách. Za zajímavé považuji také nově připravené karbamáty.

Cíle práce byly splněny. **Práci považuji za zdařilou a doporučuji ji k obhajobě.**

V Olomouci dne 17.4.2019

Prof. ing. Pavel Hradil, CSc.

Katedra organické chemie, PŘF-UP Olomouc