



Univerzita Karlova
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

500 05 Hradec Králové, Heyrovského 1203, Czech Republic, <http://www.faf.cuni.cz>
tel. +420495067111, fax +420495518002

V Hradci Králové 17. června 2020

Posudek oponenta na disertační práci Ing. Jana Duška "Návrh a syntéza nových potenciálně cytotoxicky aktivních salicylamidů"

Disertační práce Ing. Jana Duška byla vypracována pod vedením doc. Ing. Aleše Imramovského, Ph.D., a organicky zapadá do kontextu výzkumu školitele i pracoviště. Disertace se zabývá jednou z klíčových oblastí vývoje léčiv, látkami potenciálně využitelnými v léčbě zhoubného bujení. Boj proti rakovině patří k hlavním prioritám EU v oblasti zdraví, což je dáno především nárůstem v incidenci, a to z řady důvodů. Přes nesporné úsilí a dílčí úspěchy existuje velký prostor pro inovace. Téma je tedy vysoce relevantní „hot topic“. Vzhledem ke studijnímu oboru pak její jádro spočívá v syntetickém přístupu a jeho optimalizaci, doplněném výsledky biologického hodnocení.

Členění práce je klasické – spíše popularizační úvod, teoretická část, cíle práce, výsledky a diskuse, závěr, experimentální část, literatura, přílohy a seznam publikovaných prací, kde bych uvítal uvedení konkrétního podílu práce disertanta, celkem 216 číslovaných stran.

Teoretická část podává přehled versatilní biologické aktivity salicylanilidů (opravdu ještě nejsou zcela prozkoumány) a (alifatických) salicylamidů s důrazem na antimikrobní aktivitu. Přehledně a výstižně diskutuje také možnosti jejich přípravy. Dále se věnuje různým aspektům peptidové syntézy. Tato podkapitola je na jednu stranu velmi rozsáhlá, na druhou musí být z podstaty neúplná. Domnívám se, že cíl shrnout používaná činidla pro peptidovou syntézu, chránící skupiny, syntézu peptidů v roztoku a na pevné fázi (včetně instrumentace) plus problematiku racemizace a jejího řešení je na tento typ práce přespříliš ambiciózní. Osobně bych se zaměřil pouze na činidla a přístupy, které byly v rámci experimentů využívány a jejich modifikace, a věnoval bych se jim podrobněji. Velký prostor je věnován syntéze na pevné fázi (vyvinuté již v raných 60. letech, nikoli až v 70. letech). Také bych nejspíš vynechal řadu detailních příkladů z literatury (i s obrázky), které se týkají separace konkrétních peptidů. Naopak postrádám alespoň zmínku o scavengerech řešících mj. zmiňovaný problém s uvolněním *terc*-Bu⁺. U coupling činidel autor nepřístupuje k detailnímu popisu reakčního mechanismu konzistentně, někde ho uvádí (CDI, fosfoniové soli), jinde nikoli (karbodiimidy, aminiové/uroniové soli). Naopak pojednání o proteasomu a jeho inhibitorech je výstižné a přehledné, snad jen bych ze sérií ilustroval pouze nejúčinnější inhibitory. Design cílových molekul je popsán logicky a přehledně.

Následují cíle práce, které jsou jednak experimentální, jednak rešeršní. Výsledky (nikoli výsledky) a diskuse zdařile postupně popisují retrosyntetickou analýzu cílových derivátů, optimalizaci přípravy amidů (zde by se nabízelo i využití HOAt či Oxyma Pure® jako aditiv) a jejich modifikací, vlastní syntetické procedury a výsledky externího biologického hodnocení, a to jak v případě di- a triamidů, tak i potenciálních inhibitorů proteasomu. Podařilo se – přes jisté komplikace – připravit cílové molekuly a z nich identifikovat nadějně deriváty z hlediska inhibice nádorových buněčných linií i proteasomu. Diskutovány jsou vztahy mezi strukturou a biologickou aktivitou. Zajímavé by nepochybně bylo i stanovení aktivity vůči bortezomib-rezistentním liniím. Přejde mi však zvláštní v této části reportovat detailně výsledky práce, na které se doktorand nepodílel (lit. 300). Pojednání o Weinrebově (asi lépe než Weinreb) amidu bych zařadil spíše do teoretické části. U tabulek

s aktivitou bych uvítal alespoň minimální statistickou analýzu, nikoli jen konstatování, že výsledek je průměrem nejméně dvou měření.

Delší závěr přehledně shrnuje výsledky práce, následuje rozsáhlá experimentální část zahrnující jak obecné chemické metody, tak dobře popsané postupy přípravy a charakterizaci sloučenin. Literatura obsahuje úctyhodných 326 referencí, velké množství zdrojů je starších 20 let; daly by se jistě nahradit recentními.

Dojem z práce je však bohužel devalvován celou řadou chyb jazykového (interpunkce, shoda, nesoulad rodů typu „suchá THF“ či „suché DMF“, chybné pády, chybění slov) a formálního charakteru (předložky osamoceně na konci řádků, jednotka na jiném řádku než hodnota veličiny, psaní °C, procent, nerozlišování spojovníku a pomlčky, různé jednotky látkové koncentrace, nejednotný formát odkazování na literaturu, chybný křížový odkaz aj.) či desítky překlepů (namátkou „kyselina aspargová“, „pepzidů“, „regulačních“, „niklosmaid“, „transglycosylyzáza“, „pyrolsin“, „leuprolein“, „deptorekce“, „diasteromerů“, „triflouroctovou“, „Nehodgkingova“, „kapsáza“, „brotezomib“, „Valcade“ aj.). Připomínky lze mít i k českému názvosloví. Jde o anglikanismy typu *tert*-butyl, 5-chlorosalicylová, pentafluorofenol, phenyl aj., názvy typu „amid *O*-Bn kyseliny salicylové“, chybná pozice lokantů pro dvojnou vazbu, volné používání spojovníku (někde chybí – estery, jinde přebývají), nadbytečné mezery v názvech, používání pouze kulatých závorek, trimethylamin místo triethylamin, metyl, metoxy, dichlormetan, etylen, „Dess-Martinovo periodnanem“, (ne)psaní deskriptorů kursivou (N- a C-konec peptidu či Z-AMK se tak nepíše, naopak [*d*] v případě *ortho*-kondenzovaných cyklů, *terc*- či stereodeskripty *S* a *R*- ano). Chyby vznikly i transkripcí anglických názvů léčiv a molekul (česky mluvíme o oxyklozanidu, raklopridu, karfilzomibu či ubikvitinu). Místy je doslovný překlad z angličtiny až rušivý. Hojně se vyskytují nepřesné, méně vhodné až svérázné formulace, styl je občas vzdálen vědeckému (např. ochranná skupina místo chránicí skupina, rekombinovaný enzym místo rekombinantní, pro eukaryotní buňky se používá označení linie místo kmen; „nařízením doktorů“, „velmi potenciální látkou“, „syntetické automaty“, „léčit buňky nádorového bujení“, „schopné inhibitory“, „kvalitní inhibiční vlastnosti“, správná chemie či inhibice atd.). Tyto nedostatky jsou evidentní již v seznamu zkratk a úvodu, v dalších částech práce již ruší méně. V experimentální části se hojně vyskytuje chemická hantýrka („směs byla refluxována“, [organická fáze] „byla zahuštěna do žlutého oleje“, [roztok/produkt] „byl promyt vodou“ atd.). Dílčí nedostatky se vyskytují i v obrázcích (nízká kvalita obrázků v příloze, schémata 16 a 22 – v prvním reakčním kroku „mizí“ protony; obrázek 12 – ve vzorci TSTU chybí dusík, obr. 15 – chybná pozice linkeru u oximové pryskyřice; obr. 16 – chybí CO₂ jako reaktant; obr. 29 – substituent R⁵ nebude anilin, ale substituovaný fenylyl apod.). Místy ruší i neuvádění zdrojů přímo u popisu obrázků, ale je nutno je „lovit“ jinde v textu. Některé obrázky (např. instrumentace SPPS) jsou pak zcela bez zdroje. Podnadpisy by měly být důsledně číslovány. Chyby a nejednotnosti se vyskytují i v literatuře. V seznamu zkratk se vyskytují i chemické vzorce (fosgen, halogenovodíkové kyseliny), „ne-zkratky“ (typu *in situ*), jiné zkratky jsou nestandardní (HVC místo běžně používaného HCV). Mnohé zkratky užívané v textu nejsou v seznamu.

Zde bych rád podotknul, že erudovaný chemik musí být zdatný nejen v laboratoři, ale měl by umět prezentovat své výsledky na úrovni. Nedbalé podání může velice uškodit i jinak kvalitní práci.

U některých referencí se mi nepodařilo nenalézt fakta, na která se text odkazuje, viz např. mechanismus CDI či využití (nejen) fenylylhydrazinové pryskyřice. U pryskyřice chyba vznikla v.s. převzetím tabulky ze zdroje 156, aniž by ovšem byl na tomto místě citován, a mechanickým okopírováním zde uvedených odkazů bez další kontroly.

Další připomínky:

- zdráhal bych se paušálně označovat deriváty kyseliny 2-methoxybenzoové či 2-benzyloxybenzoové za salicylanilidy, jakkoli autorovi rozumím,
- autor poměrně volně nakládá s pojmy salicylamidy, alifatické salicylamidy a salicylanilidy,

- jinde se je naopak snaží striktně rozlišovat,
- podobné přecházení mezi pojmy nacházíme u cytotoxicity, antiproliferativní aktivity a indukce apoptózy; zde bych poprosil o jasné vysvětlení,
 - autor opakovaně nesprávně interpretuje nízké hodnoty IC_{50} jako „nízkou cytotoxicitu“,
 - str. 17 – teoretická část obsahuje takřka identický odstavec jako úvod, navíc bez referencí; tinea capitis je název choroby, nikoli mikroorganismu, proto se nepíše ani kursivou, ani s velkým písmenem; musí být aromatický amin vždy anilin, jak uvádíte?
 - str. 18, obr. 1 – nejedná se jen o salicylanilidy, jak uvádíte; analogicky na obr. 5 či obr. 9 nejsou výhradně alifatické salicylamidy,
 - str. 18 – u mechanismu účinku salicylanilidů postrádám zmínku o uncoupling aktivitě, mechanismus interakce s TCS byl již v zásadě objasněn,
 - str. 22 – „běžný“ kmen *Staphylococcus aureus* bych lépe označil za citlivý; chybně uvedeno *S. epidermis* místo *epidermidis*, podobně *Desulfovibrio* je *piger*, nikoli *diger*; zkratka sp. se nepíše kursivou,
 - str. 24 – NS5B je enzymem HCV viru s polymerázovou aktivitou, nikoli kmen viru mající vlastní enzymy,
 - str. 30, schéma 7 – jaký je rozdíl mezi produkty posledních dvou reakčních kroků? Neměla by být po kroku ii produktem sůl?
 - str. 31 – podléhají cyklizaci na benzoxazepin deriváty odvozené jak od (*R*)-, tak i (*S*)-alaninu?
 - str. 33, schéma 11 – chybí výpis substituentů R^1 , u R^2 jsou nadbytečné znaky,
 - str. 36 – vyjadřují deskriptory (*R*) a (*S*) opravdu optickou otáčivost, jak uvádíte?
 - str. 40 – při alternativním mechanismu B uvádíte tranzitní stav se čtyřčlenným kruhem za současného narušení aromaticity imidazolu, v odkazované literatuře jsem však tento reakční mechanismus nenalezl, zato je k nalezení na Wikipedii. Jsou nějaká experimentální data podporující tento mechanismus?
 - str. 42 – nelze paušálně tvrdit, že vznikající močoviny jsou špatně rozpustné, neboť jejich rozpustnost závisí na výchozím karbodiimidu (DCC vs. EDC či DIC),
 - str. 47 – nesouhlasím s tvrzením, že pryskyřice pro SPPS jsou rozpustné v DCM, DMF a THF,
 - str. 68 – jedná se o ketoamidy, nikoli diketoamidy,
 - str. 102 – počty připravených originálních sloučenin neodpovídají údajům ze str. 110,
 - experimentální část – postrádám detaily o výrobcích/dodavatelích, u přístrojů nejsou mnohdy ani uvedeni,
 - str. 157 – chybné označení produktů kódy.

Ačkoli si jsem vědom, že se jedná o disertaci v oboru organická chemie, nemohu si odpustit „farmaceutické“ poznámky. Niklosamid se v humánní terapii ve vyspělých zemích již prakticky nevyužívá a uváděné účinky jsou založeny převážně na datech získaných *in vitro*, nikoli verifikované v klinických studiích. Tři „lead“ inhibitory proteasomu (tabulka 3) jsou již schváleny a užívány (tj. nejsou již v klinickém hodnocení, resp. jde o fázi IV). U biologicky aktivních molekul se místo počas rozpadu používá pojem biologický (či eliminační) počas, místo slova lék je vhodnější termín léčivý přípravek. Toto neuvádím jako výtku, ale k rozšíření obzorů disertanta.

Kromě výše uvedených poznámek vznáším k obhajobě následující dotazy k diskusi:

- 1) Pro syntézu cílových diamidů a triamidů by se nabízelo využít paralelní syntézu či Vámi zmiňovanou syntézu na pevné fázi. Neuvažoval jste o nich, resp. proč nebyly využity? Jaké má Vámi zvolený postup výhody?
- 2) Na základě čeho byly designovány alifatické substituenty pro salicylamidy řad N a O?
- 3) V některých Vašich cílových molekulách (ale i jiných *in vitro* zkoušených inhibitech proteasomu) je přítomná volná aldehydická skupina. Ta je chemicky reaktivní a metabolicky

poměrně nestabilní. Jak jsou tato fakta v souladu s eventuálním využitím Vašich molekul jako léčiv? Jak je to obecně s přítomností aldehydové skupiny v používaných léčivech?

- 4) Pro přípravu aldehydických inhibitorů jste využil osvědčenou redukci Weinrebova amidu pomocí $\text{Li}[\text{AlH}_4]$, a to bez ochranné atmosféry a s molárním přebytkem redukčního činidla. Proč za daných podmínek nevzniká z amidu amin, resp. z aldehydu alkohol?

Přes výše uvedené kritické připomínky a komentáře platí, že předložená disertační práce Ing. Jana Duška je aktuální a relevantní prací z oblasti medicínální organické chemie. Přináší nové a zajímavé poznatky z pohledu syntetického i biologického včetně nově popsanych vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou. Student prokázal příslušnou erudici v oblasti tématu disertační práce a organické chemie obecně, dovednost pracovat ve vědeckém kolektivu, prezentovat své výsledky na vědeckých setkáních a také je publikovat v mezinárodních časopisech (oceňují zejména dvě práce v *European Journal of Medicinal Chemistry*).

Závěrem konstatuji, že předložená práce splňuje požadavky kladené na disertační práci a podle § 47, odst. 4, zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ji doporučuji k obhajobě a dalšímu řízení. Po jejím úspěšném obhájení pak souhlasím s udělením titulu Ph.D. v oblasti organické chemie.

doc. PharmDr. Mgr. Martin Krátký, Ph.D.
Katedra organické a bioorganické chemie
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Univerzita Karlova
Akademika Heyrovského 1203
500 05 Hradec Králové
martin.kratky@faf.cuni.cz