

## Oponentský posudek doktorské disertační práce "Syntéza a design potenciálně antimikrobiálně aktivních sloučenin" vypracované Mgr. Jánem Kozicem

Předložená doktorská disertační práce se zabývá chemií, strukturou a antituberkulotickou aktivitou derivátů benzanilidu a thiobenzanilidu, což je téma na pracovišti uchazeče dlouhodobě studované. S ohledem na čím dál častěji se objevující lékovou rezistenci různých kmenů tuberkulózy vůči stávajícím antituberkulotikům tak lze výzkum nových látek s odlišnou či modifikovanou strukturou považovat za žádoucí a stále aktuální.

Samotná práce je členěná na 9 kapitol včetně příloh a seznamu publikovaných prací. V prvních dvou jednostránkových kapitolách (Úvod a Cíl práce) je stručně a výstižně nastíněna motivace disertační práce. V kapitole nazvané "Současný stav řešené problematiky" autor vyčerpávajícím způsobem seznamuje čtenáře s problematikou onemocnění tuberkulózou a doposud známými a používanými farmaky při její léčbě. Krátce je pojednáno i o strukturálních aspektech molekul derivátů benzanilidu a thiobenzanilidu. Tato část je podle mého názoru zpracována velmi zdařile a prakticky k ní nemám žádnou připomínku. Po ní následuje rozsáhlá experimentální část, popisující syntézu a charakterizaci celkem 100 derivátů benzanilidu a thiobenzanilidu, z nichž drtivá většina nebyla v literatuře doposud popsána, a dalších výchozích látek nutných pro jejich přípravu.

Získané výsledky jsou komentovány v klíčové kapitole 4 (Výsledky a diskuse), v níž jsou v logickém sledu shrnuty jak aspekty syntézy studovaných látek, tak i stanovená biologická aktivita vůči vybraným kmenům tuberkulózy. Přestože studované látky vykazují významnou inhibiční aktivitu (a to zejména vůči kmenům rezistentním vůči isoniazidu), jejich potenciál je nižší než u analogických demethylovaných salicylanilidů a thiosalicylanilidů. Rovněž vysoká cytotoxicita připravených látek a jejich nízký index selektivity je pravděpodobně diskvalifikují z dalšího testování na živých modelech (*in vivo* experimenty). Přesto je nutné konstatovat, že i tak jsou získané výsledky důležité pro správné pochopení vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou a přispívají k celkové představě o fungování této třídy antituberkulotik. Poslední část diskuse se věnuje strukturálním aspektům části připravených látek – konkrétně derivátům 2-methoxy-2'-hydroxythiobenzanilidu (**11**). Na základě jednoduchých i pokročilejších NMR experimentů je prokázáno, že tyto látky existují ve formě konformačních isomerů *E* a *Z*, jejichž existence je podmíněna zejména omezenou rotací okolo vazby C–N thioamidické skupiny.

Po závěrečném jednostránkovém shrnutí následují přílohy obsahující NMR spektra vztahující se ke studiu konformační isomerie látky **11i**, seznam publikovaných prací a výčet použité literatury.

Osobně se domnívám, že by bylo vhodné (z důvodu velkého rozsahu např. v elektronické podobě na příložením CD) i zařazení IR a NMR spekter připravených látek, která by prokázala identitu a čistotu připravených sloučenin. Tento postup je v mnoha prestižních časopisech považován za standard publikování výsledků výzkumu.

K jednotlivým kapitolám mám následující formální i faktické připomínky a dotazy:

1) V práci jsem našel minimum překlepů, což svědčí o pečlivosti autora při sepisování práce. Rovněž počet případů chybného názvosloví, chyb ve vzorcích a dalších drobných prohrěšků je minimální. Jako příklad mnou nalezených formálních nedostatků uvádím:

- V celém textu (a zejména v Experimentální části) je průběžně užíván název "benztioamid", což neodpovídá slovenské, české a ani anglické nomenklatuře. Správně se jedná o "tiobenzamid" resp. "thiobenzamid" nebo "thiobenzamide".
- Citace více číselných literárních odkazů pomocí horního indexu se uvádí bez mezer mezi číslem a oddělovací čárkou. Větší počet bezprostředně po sobě jdoucích odkazů se cituje jako rozsah (např.<sup>80-83</sup> nikoliv<sup>80, 81, 82, 83</sup>) a čísla se řadí konsekutivně (tedy<sup>24,30</sup> a nikoliv<sup>30, 24</sup>). Na str. 27 se objevuje chybné opakování citace<sup>53</sup> (tj.<sup>53, 52, 53</sup>).
- Chemické posuny v <sup>13</sup>C NMR spektrech se neuvádějí na dvě ale pouze na jedno desetinné místo. Autor si sám může ověřit, že měření provedená na jiném přístroji, při jiné koncentraci resp. i teplotě se projeví změnou minimálně na druhém desetinném místě.
- Na str. 66 je atom síry ve vzorci thiobenzamidu jiným fontem, než zbytek molekuly.
- Jednotka aktivační entropie (str. 93) je J·mol<sup>-1</sup>·K<sup>-1</sup>, nikoliv J·mol<sup>-1</sup>.
- Znaménko minus (zejména v indexu) není pomlčka. Vkládá se pomocí klávesové kombinace Alt+0150.

2) Výpočet *Gibbsovy* aktivační energie pro rotaci okolo C–N vazby u látky **11i** je podle mého názoru příliš zjednodušený. Autor vychází ze zjednodušené rovnice pro rychlostní konstantu při teplotě koalescence ve tvaru  $k = (\pi/\sqrt{2})\delta\nu$ , která ovšem přibližně platí pro stejně populované soubory konformačních isomerů (tj. při zastoupení isomerů *E*:*Z* = 1:1), u nichž oba relevantní signály mají stejnou pološířku a nemění se jejich multiplicita (ideálně singlety). Druhá podmínka je sice formálně splněna pro aromatické vodíky nepodléhající chemické výměně (autor uvádí jako příklad vodík H6), avšak změna chemického posunu tohoto vodíku u *E* a *Z*-isomeru již neodráží pouze bariéru rotace okolo C–N vazby ale také vzdálenost tohoto vodíku od této vazby. Je zřejmé, že čím budou odpovídající vodíky dále od původce konformační isomerie, tím bude jejich stínění méně ovlivněno změnou konformace a  $\delta\nu$  bude limitovat k nule. Podobná situace nastává i u prochirálních vodíků vedle centra chiraloty. Na atomech bezprostředně vedle centra chiraloty se tyto vodíky liší svým chemickým posunem výrazně, kdežto chemické posuny vodíku nacházejících se dále jsou již ovlivněny jen velmi málo. Pro určení relevantnější hodnoty frekvence rotace okolo C–N vazby by tak byl vhodnější substituent (např. CH<sub>3</sub>) přímo na dusíku. Vodík na dusíku, u něhož je rovněž patrný rozdíl v chemických posunech je bohužel nevhodný, protože podléhá chemické výměně s rozpouštědlem, jež ovlivňuje jak chemický posun, tak i pološířku signálu. V souvislosti s výpočtem

*Gibbsovy* aktivační energie také autor zaměřuje entropickou změnu rotace okolo vazby s entropickou změnou rotace celé molekuly okolo jedné z os. Je známo, že na každý stupeň volnosti (tzv. "vnější") rotace připadá příspěvek cca  $40 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ , kdežto na "vnitřní" stupně rotace okolo jednotlivých vazeb to je pouze okolo  $18 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ .

3) Ze spekter látky **11i** při různých teplotách uvedených v příloze je patrné, že při zahřívání pravděpodobně docházelo i k cyklizaci na benzoxazoly **12**, což je ostatně zmíněno i při diskusi přípravy thiobenzanilidů **11** resp. při jejich čištění krystalizací nebo chromatografií. Jak tedy byly látky nakonec připraveny v čistém stavu, nutném pro biologické testování? Nedochozí v určité míře k nežádoucí cyklizaci i při těchto dlouhodobých testech?

4) Uvažoval autor o aplikaci moderních metod kombinatoriální syntézy, která se používá pro přípravu rozsáhlých knihoven strukturně podobných látek?

5) Jak si autor vysvětluje neexistenci intramolekulární (třístředové) vazby u látek **11**? Jejich nepřítomnost je pouze konstatována na základě NOESY experimentu.

6) Na straně 86 autor vysvětluje zvýšenou ochotu cyklizace thioamidů na benzoxazoly zvýšenou elektrofilitou thiokarboxylové skupiny. Které další faktory mohou tuto reakci usnadňovat? Lze obdobně cyklizovat i amidy – pokud ano, za jakých podmínek?

Přes uvedené připomínky musím závěrem konstatovat, že předložená disertace obsahuje původní výsledky z oblasti chemie benzanilidu a thiobenzanilidu, které jsou ve většině případů odpovídajícím způsobem prezentovány a zhodnoceny. Autor při řešení uvedené problematiky prokázal své tvůrčí schopnosti a disertační práce tak splňuje požadavky nutné pro její obhajobu v oboru organické chemie.

V souladu s §47 odst. 4 zákona č. 111/1998 Sb. disertační práci **d o p o r u č u j i** přijmout jako podklad k dalšímu řízení a po její úspěšné obhajobě k udělení titulu Ph.D.

V Pardubicích dne 3.5. 2013

-----  
doc. Ing. Jiří Hanusek, Ph.D.  
Ústav organické chemie a technologie  
FChT, Univerzita Pardubice