



CHARLES UNIVERSITY  
Faculty of Pharmacy  
in Hradec Králové

V Hradci Králové, dne 9. 4. 2019

**Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Jana Němečka**

Název práce: Syntéza substituovaných dusíkatých heterocyklů jako potenciálních antituberkulotik

Oponovaná práce, zabývající se designem a syntézou nových antimykobakteriálně účinných pětičlenných heterocyklů (tetrazolů a oxadiazolů) obsahujících 3,5-dinitrofenylový substituent, popř. 3-amino-5-nitrofenylový substituent, přináší celou řadu sloučenin s vynikajícími hodnotami MIC (až 0,03  $\mu\text{mol/l}$ ) vůči *Mycobacterium tuberculosis*, rovněž i na rezistentní kmeny. Práce staví na pěti publikacích, z nichž jedna je prvoautorská, u ostatních je Mgr. Jan Němeček členem autorského kolektivu. Většina připravených sloučenin byla výzkumnou skupinou rovněž patentována ve 4 českých patentech, jedné patentové přihlášce a ve dvou mezinárodních patentech.

V krátkém úvodu je nastíněna incidence tuberkulózy, její léčba, včetně multilékově rezistentních forem s přehledem nových léčiv v preklinickém a klinickém stadiu vývoje. Následuje stručný přehled typů sloučenin, které se staly výchozími strukturami pro design dalších sérií a jsou součástí předložené práce. Cílem práce bylo připravit 5 sérií obsahujících oxadiazolovou část molekuly a 4 série s tetrazolovým cyklem, rovněž kombinace všech třech částí (tetrazol, oxadiazol a 3,5-dinitrofenylový substituent). Z důvodu špatné rozpustnosti pro *in vivo* testy byly připraveny ještě tři deriváty obohacené o piperazinový a morfolinový cykl za účelem tvorby ve vodě rozpustné soli. Zde by mne zajímal výběr tohoto substituentu. Následující část označená jako výsledky a diskuze, na 32 stránkách přináší přehled připravených sérií s reakčními schémata syntézy a s tabulkami výsledků měření antimykobakteriálních, antibakteriálních a antifungálních testů, tj. MIC, popř. cytotoxicitou nejúčinnějších derivátů. Tato část je víceméně popisná, zasloužila by si podrobnější rozpracování. Chybí např., čím byl inspirován výběr jednotlivých substituentů, pokud se hovoří o lipofilitě, proč nejsou uvedeny alespoň hodnoty  $\log P$ ? V experimentální části jsou prezentovány postupy přípravy a charakterizace jednotlivých sloučenin. Vzhledem k vyšlým publikacím a patentům, které tyto sloučeniny také obsahují, je tato část práce zbytečná. Možná má ukázat, které sloučeniny doktorand připravil sám, není to však nikde řečeno.

K práci mám následující připomínky, popř. dotazy:

Tabulka prezentující seznam substituentů na straně 28 označuje substituenty jako R<sup>1</sup>, na několika následujících stránkách jsou však substituenty R, jinde R<sup>1</sup>, asi by stačilo označení pouze R, protože žádný další substituent molekuly neobsahují. Orientace v substituentech vzhledem ke vztahu struktura a aktivita je dost obtížná, čtenář se musí stále vracet na str. 28, aby si udělal představu, který substituent aktivitu zvyšuje a který ji snižuje, diskuze tímto směrem pokulhává. Je to škoda, protože získané výsledky aktivit jsou opravdu velmi nadějně. Na str. 22 píšete, že atom síry není pro antimykobakteriální aktivitu nezbytný a je ho možné nahradit za jiný chalcogen, ale u tetrazolů 1 nebo 2 substituovaných, nebo oxa či selena analogů síra v heterocyklu není, thiadiazoly se v práci nevyskytují. Byla připravena celá řada účinných derivátů s MIC až 0,03 μmol/l, proto by bylo vhodné zaměřit se na studium možného mechanismu účinku. Na str. 23 je napsáno, že studium mechanismu účinku neprokázalo účinnost na DprE1. Jakými testy byl tento mechanismus sledován? Máte představu, jakým jiným mechanismem by tyto sloučeniny mohly působit? Jaké budou další směry v jejich výzkumu, byly sloučeniny již testovány *in vivo*?

Chtěla bych se zeptat jakou vypovídající hodnotu má test na buněčných liniích CHO-K1 a T3T, hodnoty se mnohdy liší i řádově (např. hodnoty u série 11, str. 56 jsou v rozmezí 8,7-140 a je u nich poznámka, že neovlivňují viabilitu savčích buněk), u hodnot T3T, které jsou 27,0 a 27,4 (str. 35) je napsáno, že sloučeniny 8f a 8g vykazaly určitý toxický efekt. Co to je „určitý“, prosím o vysvětlení, i výběru tohoto testu.

V cíli práce, kde jsou sloučeniny průběžně číslovány, chybí sloučeniny 15-27, 30-32 a 34.

Jakou má antimykobakteriální aktivitu tetrazol č. 38?

Byla připravena sloučenina 9b? Její aktivita v tabulce č. 7 chybí. Sloučenina 9a opravdu dosáhla nejnižších hodnot MIC, jak je uvedeno v textu na str. 36? Sloučenina 9a by neměla mít podle tabulky na str. 28 methyl, v textu ho však má.

Jakým způsobem bylo určeno, zda substituce u tetrazolových derivátů byla do polohy 2 nebo 1?

Je celkem zbytečné psát do tabulek standardy, které nebyly pro měření použity, viz vankomycin / gentamycin.

Diskuze typu „Nejvyšší aktivitu dosáhly sloučeniny 9j-r a 9x...je k ničemu, hodnoty MIC °si člověk v tabulce přečte, ale co je to za látky, jaké mají substituenty, musí hledat a sám si je vypsat, aby si udělal představu o příspěvku a rozdílu jednotlivých substituentů. Rovněž postrádám porovnání účinku mezi sériemi vzhledem ke změnám poloh substituentů, zvětšení molekuly, logP, která změna vedla k vyšším či nižším aktivitám. Tato část by si rozhodně zasloužila lepší, podrobnější zpracování.

Drobné překlepy, i když jich není mnoho, jsem označila přímo v textu.

I přes některé připomínky mohu konstatovat, že práce je sepsána pečlivě a přináší celou řadu nadějných molekul, selektivně účinných, které by mohly být v budoucnu využity. Oponovaná Ph.D. práce splňuje všechny požadavky kladené na tento druh odborných prací a proto ji **doporučuji k obhajobě.**



prof. RNDr. Jarmila Vinšová, CSc.

Farmaceutická fakulta UK

Hradec Králové