

Posudek habilitační práce PharmDr. Martina Krátkého, Ph.D.

Pan PharmDr. Martin Krátký, Ph.D. předložil habilitační práci nazvanou Vztahy mezi strukturou a aktivitou malých antimikrobně aktivních molekul a tuftsinových nosičů. Práce je souborem 42 článků, publikovaných v renomovaných vědeckých časopisech s impact factorem, 2 patentů a 1 monografie a 1 kapitoly v monografii, doplněným společným úvodem a komentářem k jednotlivým článkům, či spíše průvodcem tematikou jednotlivých článků. Úvodní část habilitační práce se stručně věnuje zdůvodnění, proč jsou zapotřebí stále nové systémově účinné antimikrobní a antifungální látky. Těžiště práce představují kapitoly 3. Vývoj v oblasti malých molekul a 4. Peptidové nosiče pro antimykobakteriální léčiva na bázi tuftsinu. Kapitola 3. se věnuje obměnám tradiční protin vazivní struktury salicylanilidu. Za pozornost zde stojí zejména estery různých substituovaných salicylanilidů s karboxylovými kyselinami včetně substituovaných  $\alpha$ -aminokyselin, benzensulfonovou kyselinou, karbamovými a thiokarbamovými kyselinami a kyselinou fosforečnou nebo thiofosforečnou, jejichž další dva hydroxyly byly esterifikovány ethylovými zbytky. Mezi těmito látkami vynikají aktivitou vůči mykobaktériím včetně multirezistentních (S)-4-chlor-2-[[4-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl]fenyl-2-acetamido-3-fenylpropanoát a jeho bromový isoster. Při přípravě esterů salicylanilidů a aminokyselinami prováděl autor kondenzaci salicylanilidu se Z-chráněnou aminokyselinou pomocí *N,N'*-dicyklohexylkarbodiidu (DCC). Při následných pokusech o deprotektaci bromovodíkem v kys. octové a následné převedení vzniklého hydrobromidu esteru aminokyseliny na bazi došlo k neočekávanému vzniku *N*-[(fenylkarbamoyl)methyl]-2-hydroxybenzamidů. Mechanismus jejich vzniku následně autor podrobně popsal. Estery halogenovaných salicylanilidů s benzoovou a 3-trifluormethylbenzoovou kyselinou se ukázaly jako antimykobakteriálně účinné, a to i proti multirezistentním (MDR) a extenzivně rezistentním (XDR) kmenům. Byly též připraveny estery salicylanilidů s pyrazin-2-karboxylovou kyselinou, míněné jako „mutual prodrugs“ salicylanilidů a pyrazin-2-karboxylové kyseliny, která je účinným metabolitem pyrazinamidu, avšak jako taková do mykobakteriálních buněk neproniká. Látky byly velmi účinné na MDR a XDR mykobaktéria, působily též na řadu *G*<sup>-</sup> bakterií a z *G*<sup>-</sup> na *Pseudomonas aeruginosa*. Estery 5-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny vynikaly zejména účinností na kmeny rezistentní na řadu běžných anti-tuberkulotik a u mykobakterióz užívaných antibiotik. Naproti tomu estery salicylanilidů s benzensulfonovou kyselinou nepřekonalily účinností karboxyláty. Estery salicylanilidů s deriváty kyselin fosforečné a thiofosforečné zaostaly v antimykobakteriálním působení za samotnými salicylanilidy. Vzhledem ke struktuře byly testovány na inhibici acetyl- a butyrylcholinesterasy, a vykazovaly účinnost minimálně srovnatelnou s rivastigminem a galanthaminem. Autor je přesvědčen, že mechanismus inhibice cholinesteras těmito látkami je odlišný, než u většiny inhibitorů organofosforového typu, a působí pseudoirreversibilně, podobně jako rivastigmin. Tyto struktury jsou patentovány a doplněny 2-substituovanými 3-difenyl-3-hydrobenzo[e][1,3,2]oxazafosfinin-4-on 2-oxidy, které vykazovaly vysokou aktivitu vůči MDR a XDR kmenům. Estery salicylanilidů s *N*-substituovanými a *N,N*-disubstituovanými karbamovými a thiokarbamovými kyselinami nebyly vůči mykobaktériím účinnější než parentní anilidy, ale měly dobrou aktivitu vůči stafylokokům včetně MRSA. Tyto látky inhibovaly též růst *Trichophyton menthagrophytes*. Látky vykazovaly též inhibiční aktivitu vůči cholinesterasám, některé z nich dokonce lepší než rivastigmin a galanthamin. *N*-monoalkylované karbamáty byly účinné vůči *Mycobacterium abscessus* a *Klebsiella pneumoniae*. Autor též pátral po cílových strukturách, s nimiž salicylanilidy na molekulární úrovni

interagují, a zjistil inhibiči isocitrátlyasy, methioninaminopeptidasy, L-alanindehydrogenay, lysin  $\epsilon$ -aminotransferasy a chorismát mutasy. V závěrečné části kapitoly 3.2 jsou ještě probírány modifikace a proléčiva izoniazidu, mezi nimiž vynikají deriváty semikarbazidu substitované zbytkem nikotinové kyseliny a alkylem nebo arylem (obr. 17) a jejich cyklizační produkty – deriváty 1,3,4-oxadiazolu, které však nevykázaly aktivitu. Kapitola 3.3 je věnována derivátům antibakteriálních sulfonamidů tvorbou Schiffových bazí s aromatickými aldehydy na jejich anilinové aminoskupině. Šlo hlavně o deriváty 5-chlorsalicylaldehydu. Dalšími modifikacemi bylo rozšíření anilinové aminoskupiny na močovínový fragment, substituovaných ještě alkylem na  $N^3$  močoviny, a imidazolidin-2,4,5-triony vytvořené na této aminoskupině. Zajímavým nápadem bylo zdvojení molekuly sulfamethoxazolu přes fragment kyseliny šťavelové, resp. oxaldiamidový fragment vytvořený na anilinových aminoskupinách obou molekul. Močoviny účinkovaly převážně antimykobakteriálně s nízkou aktivitou vůči jiným bakteriím a houbám, naopak Schiffovy báze a amidy mají širší spektrum účinku zahrnující  $G^+$  bakterie včetně MRSA a také některé kvasinky a vláknité houby. Kapitola 3.4 pojednává o přípravě derivátů rhodanin-3-octové kyseliny, které byly účinné vůči mykobaktériím a  $G^+$  kmenům, hydrazidy-hydrazony odvozené od izoniazidu, z nichž některé byly aktivní proti mykobaktériím a jiné proti  $G^+$  kmenům a houbám, a deriváty DL-fenylalaninu, které antiinfekční aktivity příliš nevykazovaly, ale inhibovaly choliesterasy.

Kapitola 4. nese název Peptidové nosiče pro antimykobakteriální léčiva na bázi tuftsinu. Tuftsin je tetrapeptid, uvolňovaný enzymatickou hydrolýzou z  $F_c$  fragmentu imunoglobulinu. Má svoje receptory na povrchu fagocytů. Navázání tuftsinu na receptor vede k internalizaci receptoru. Je-li tedy na tuftsin navázáno léčivo, může se tímto způsobem dostat do buňky. Tuftsin aktivuje některé složky imunitního systému včetně makrofágů a granulocytů, stimuluje fagocytózu, migraci imunitních buněk, má chemotaktický účinek na monocyty a je dobře rozpustný ve vodě. Autor ve spolupráci s kolegy z Maďarské akademie věd připravil konjugáty oligomerů tuftsinu s INH, přičemž tuftsinový oligomer byl k INH připojen svojí koncovou aminoskupinou přes karboxymethylový fragment ke druhému hydrazinovému dusíku. Konjugáty byly stabilní a srovnatelně účinné jako výchozí léčivo. Konjugát INH s palmitoylovaným tuftsinem se ukázal jako netoxický a perorálně dobře účinný na morčecím modelu tuberkulózy. Na základě literárních poznatků konjugoval autor s tuftsinem i vlastní aktivní molekuly. Tuftsinové nosiče byly pro tento účel připravovány syntézou na pevné fázi. Mezi molekulu léčiva a některou z primárních aminoskupin nosiče byly kromě spojovacího můstku vkládány též spacery – tetrapeptidy o sekvencích GF<sub>1</sub>LG, G<sub>2</sub> nebo GFYA. GF<sub>1</sub>LG byl navržen k vystupňovanému intracelulárnímu uvolňování léčiva z DDSs v lysozomech, neboť je specificky štěpen lysozomální proteasou kathepsinem B. Pro připojení antimykobakteriálních molekul bylo většinou třeba připravit jejich konjugabilní deriváty. Modifikace salicylanidů esterifikací 4-formylbenzoovou kyselinou a následné napojení peptidu pomocí Schiffovy báze bylo snadno proveditelné, benzoátové estery ale byly příliš rychle hydrolyzovány na výchozí anilidy, takže prakticky nešlo stanovit aktivity konjugátů. Estery salicylanidů s 5-chlorpyrazin-2-karboxylovou a 4-benzoylbenzoovou kyselinou se pro konjugaci rovněž příliš neosvědčily, a tak byly „konjugabilní“ skupiny (formyl, acetyl) zavedeny přímo na salicylanilidový skelet. Tímto způsobem byly modifikovány i struktury klasických antituberkulotik a dalších antibakteriálních léčiv; u mnoha takových derivátů ale došlo ke ztrátě účinku. K dobře konjugovatelným derivátům *p*-aminosalicylové kyseliny (PAS) naopak patřily *N*-[3-hydroxy-4-(methoxykarbonyl)fenyl]glycin a alkyl-2-hydroxy-4-[(4-

acetylphenyl)karbamoylamino]benzoáty. Spojení mezi peptidem a malou molekulou bylo realizováno pomocí oxim-etherové vazby nebo amidové vazby. Takto byly připraveny konjugáty s monomerním i oligomerním tuftsínem včetně heterooligomerů (liský/psí tuftsín), s a nebo bez GFLG spaceru a s volným karboxylem nebo karboxamidem jako C-koncem. Oproti původnímu očekávání nedošlo k hydrolytickému uvolnění konjugovaného léčiva z vazby na nosič v mikrosomech, místo toho probíhala postupná hydrolyza peptidového nosiče. I tak se ale konjugáty jeví jako perspektivní léčiva, zejména z hlediska poměru mezi aktivitou a cytotoxicitou.

V závěru práce autor konstatuje, že navržené směry výzkumu se jeví jako perspektivní, a to mj. z důvodu narůstající rezistence patogenů na dosud používaná léčiva, a proto má smysl v něm pokračovat, a to jak vývojem vysoce originálních látek, tak i tzv. „me-too“ analogů.

### Dotazy

1. Co přesně znamená pseudoirreversibilní mechanismus inhibice cholinesteras? Jak jste dospěl k závěru, že Vaše fosfátové a thiofosfátové estery salicylanilidů působí právě tímto mechanismem?
2. Struktura Vašich patentovaných 2-substituovaných 3-difenyl-3-hydrobenzo[e][1,3,2]oxazafosfinin-4-on-2-oxidů poněkud připomíná strukturu cytostatik cyklofosfamidu a ifosfamidu. Byly tyto látky testovány na cytotoxicitu?
3. Látky za skupiny 2-substituovaných 3-difenyl-3-hydrobenzo[e][1,3,2]oxazafosfinin-4-on-2-oxidů jsou zajímavé rovněž tím, že mají chirální centrum na atomu fosforu. Pokusili jste se separovat enantiomery těchto struktur?
4. Salicylanilidové deriváty jsou též tradičními anthelmintiky. Uvažujete o testování některých Vašich od salicylanilidu odvozených látek, popř. tuftsínových konjugátů, i na tuto aktivitu?

### Závěr posudku:

Z textu habilitační práce, jakož i z rozsahu a kvality publikovaných prací, k nimž je tento text komentářem, je zřejmé, že uchazeč je vysoce kvalifikovaným odborníkem v oblasti designu a syntézy nových protiinvazivních sloučenin – látek s aktivitou antimykobakteriální, antibakteriální s důrazem na G<sup>+</sup> kmény a antimykotickou, jakož i na konstrukci proléčiv moderního typu využívajících peptidové nosiče. Za tím účelem zvládá nejen metody klasické organické syntézy, ale i peptidové chemie na pevných nosičích. Habilitační práci shledávám na velmi vysoké odborné úrovni a jako takovou ji doporučuji k obhájení za účelem udělení vědecko-pedagogické hodnosti docent uchazeči.

V Brně dne 20. 2. 2019

doc. PharmDr. Oldřich Farsa, Ph.D.

