

Oponentský posudek na doktorskou disertační práci Ing. Elišky Drabinové:

**„Syntéza a charakterizace konjugátů substituovaných poly(ethylenglykolů)
s vybranými léčivy“**

V předložené disertační práci se autorka zaměřila na přípravu konjugátů používaných léčiv jako je amfotericin B, nystatin a prednisolon s funkcionalizovanými poly(ethylenglykoly). Cílem práce bylo navrhnout a připravit transportní formy uvedených léčiv, které budou mít vhodné vlastnosti pro směrované uvolňování léčiva v organismu. Disertační práce má obvyklé členění, je sepsána pečlivě s minimem chyb a překlepů. V úvodní kapitole jsou přehledně shrnuty dosavadní poznatky z dané oblasti diskutované na základě obsáhlé rešerše. Těžiště práce nalezne čtenář v kapitole „Výsledky a diskuse“. Připravené konjugáty byly odpovídajícím způsobem charakterizovány fyzikálně-chemickými metodami a dále byly testovány za podmínek simulujících podmínky fyziologické. V druhé části práce byly připraveny, náležitě charakterizovány a testovány konjugáty cholesterolu s cílem připravit systémy, které budou schopny působit jako lapače volného cholesterolu z vodného prostředí. Z tohoto hlediska je nepochybné, že zadané téma disertační práce představuje velice aktuální a velmi užitečný základní výzkum s vysokým aplikačním potenciálem. V případě konjugátů amfotericinu B a nystatinu autorka navrhla originální způsob cíleného uvolnění léčiva z nosiče. Presentovaný princip uvolnění účinné substance je založen na prvotním odštěpení molekuly glukózy z konjugátu. Po úvodní reakci následuje sekvence dvou po sobě jdoucích rychlých reakcí končící uvolněním původně kovalentně vázaného amfotericinu B resp. nystatinu. Odštěpení glukózy je specificky katalyzováno β -glukosidázou. Tento enzym není běžně přítomen ve zdravé tkáni, ale je přítomen v enzymové výbavě mnoha fungálních patogenů způsobujících systemické infekce. To znamená, že k uvolnění léčiva dojde cíleně působením β -glukosidázy, tj. v místě kde je přítomen patogen. V případě konjugátů prednisolonu byly konjugáty konstruovány tak, aby k uvolnění léčiva došlo v tkáni bohaté na esterázu (cíleno do jaterní tkáně), nebo v tkáni zánětlivé tj. v tkáni s patologicky sníženou hodnotou pH. Funkčnost všech připravených konjugátů byla ověřena za podmínek *in vitro*, což je v souladu se zadáním disertační práce. V případě esteráza senzitivních konjugátů prednisolonu autorka připravila jejich modulární set, u kterých je rychlost enzymatické hydrolyzy řízena charakterem molekulární spojky umístěné mezi makromolekulou poly(ethylenglykolu) a prednisolone. Jako velmi nadějně se také jeví připravené konjugáty cholesterolu, které ve vodě vytvářejí nanoagregáty (pravděpodobně

micely). Vzniklé micely díky nekovalentním interakcím mezi navázaným fragmentem cholesterolu v konjugátu a cholesterolem volným jej z okolního prostředí pohlcují, čímž postupně zvětšují svou velikost. Autorka zde využila i své znalosti biochemie, které jí umožnily nalézt originální řešení pro cílenou, farmakologicky čistou a fyziologicky účinnou dopravu léčiva do postiženého orgánu, nebo tkání. Rovněž i idea vychytávání volného cholesterolu z vodného roztoku je obdobou fyziologického transportu cholesterolu z tkání do jater pomocí lipoproteinů HDL. Velkou neznámou je ale finální eliminace těchto cholesterolem obohacených „nefyziologických“ micel z organismu.

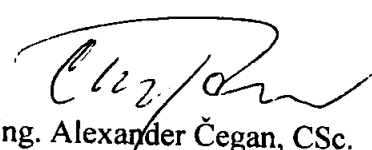
K práci mám několik dotazů:

1. Jaké jsou nejnovější poznatky týkající se biokompatibility poly(ethylenglykolů).
2. Byla ověřena možnost sledovat uvolňování diskutovaných léčiv jinými analytickými metodami než jakou je HPLC.
3. V případě katalýzy β -glukosidázou předpokládáte její inter- nebo intracelulární působení.
4. Jaký je další osud připravených konjugátů? Mám na mysli, zda bylo provedeno nebo je plánováno jejich další testování.
5. Nebyla ověřována možnost pohlcování cholesterolu z jiného reálnějšího systému, než jakým je voda? Jak by autorka odstraňovala micely s cholesterolem ze živého organismu?

S potěšením shrnuji: autorka odvedla solidní práci, prokázala tvůrčí přístup při řešení, realizovala množství syntetických prací a provedla řadu měření s jejich interpretacemi. Z příložených údajů vyplývá, že převážná část výsledků disertační práce prošla náročným recenzním řízením a stala se předmětem 5 vědeckých prací uveřejněných v zahraničních impaktovaných časopisech: Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters; Organic and Biomolecular Chemistry; Current Pharmaceutical Design a dvakrát v International Journal of Pharmaceutics, u čtyř uvedených publikací byla první autorkou.

Závěrem konstatuji, že vytčené cíle disertační práce byly beze zbytku splněny a autorka prokázala schopnost samostatné vědecké práce. Z uvedených důvodů jednoznačně **doporučuji** přijmout předloženou disertační práci Ing. Elišky Drabinové k obhajobě, jako podklad pro získání vědecké hodnosti **Ph.D.**

V Pardubicích 22.4.2014


prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.

Posudek disertační práce

Autor: Ing. Eliška Drabinová
Název: Syntéza a charakterizace konjugátů substituovaných poly(ethylen glykolů) s vybranými léčivy

Disertační práce Ing. Elišky Drabinové je členěna na čtyři základní kapitoly. V krátkém úvodu jsme seznámeni s vybranými makrocyclickými polyenovými antimykotiky - s amfotericinem B a nystatinem, dále následuje seznámení s glukokortikoidem prednisolonem a jeho analogy.

V následující teoretické části nám autorka představuje současný stav v daném oboru a rešerše zahrnuje celou řadu polymerních proléčiv, způsoby přípravy polymerních konjugátů se zaměřením na prednisolon a nystatin. obsahuje také krátkou kapitolu o konjugátech prednisolonu s cyklodextriny a dendrimery.

Z experimentální části je zřejmé, že autorka vynaložila značné syntetické úsilí při syntéze zamýšlených molekul, tedy polymerních konjugátů s nystatinem a prednisolonem, které byly modifikovány různými spojkami za účelem získání makromolekulárních proléčiv s různým způsobem uvolňování aktivní látky. Pro tyto účely byly použity více méně standardní postupy.

Získané výsledky jsou diskutovány srozumitelnou formou, teoretická i experimentální část práce je zpracována na odpovídající úrovni, a podobně je tomu (až na výjimky) i s interpretací získaných výsledků. Za zjevnou slabinu ovšem považuji práci s literaturou, viz problematika syntézy prednisolon-hydrazonu, a částečně také charakterizaci některých nově připravených sloučenin.

Mám několik málo poznámek a připomínek do diskuze:

1. Nebývá zvykem, aby experimentální část obsahovala schémata syntézy jednotlivých látek. Očekával bych, že Schémata 24, 25 a 26 budou spíše součástí následující kapitoly „Výsledky a diskuze“, např. v rámci podkapitoly, popisující syntézu výchozích polymerů? V této souvislosti pak působí trochu nelogicky, že část schémat se opravdu v následující kapitole opakuje (např. schéma 26 se ještě jednou objeví jako část schématu 32).
2. Zaujala mě syntéza hydrazonu prednisolonu na ketoskupině v poloze 20 (Schéma 32). Jak to jde dohromady např. s publikací Peng, Shiqi; Qiu, Xuecai; Wang, Chao; Zhao. Ming Bioorg. Med. Chem. 2004, 12, 4403-4421, která popisuje vznik hydrazonu (s N-substituovaným hydrazinem) selektivně na ketoskupině v poloze 3 (výtěžek 80%)? Další publikace Barton, Derec H. R.; Choi, Lewis S. L.; Lister-James, John; Hesse, Robert H.; Pechet, Maurice M. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 1982, 11, 2599-2606 popisuje reakci s jiným N-nukleofilem (N-methylhydroxylaminem) také v poloze 3.

Protože jsou to jediné dvě publikace, popisující reakci prednisolonu s N-nukleofily, považují za zásadní nedostatek, že v disertaci není tento rozpor vůbec nijak komentován. Zajímalo by mě, jak moc lze považovat strukturu sloučeniny **20** za prokázanou? Zvláště vezmeme-li v úvahu, že v poloze 3 podle literatury reagují i jiné podobné skelety (hydrokortison) obsahující dvě ketoskupiny 3 a 20 (viz. patent: WO2013/74910 A1, 2013 nebo Steroids, 1981, 37, 303 – 314). Jak je to tedy vlastně s regioselektivitou reakce prednisolonu s N-nukleofily a jak byla určena struktura látky **20**?

V této souvislosti mi přijde pikantní, že autorka vznik hydrazonu v poloze 3 popisuje ve schématu 11 v úvodní teoretické části (odkaz 100), aniž by jakkoliv zaznamenala popř. komentovala zjevný rozpor s jejími vlastními výsledky?!

3. Termín „vykyselení reakce“ je velmi neobvyklý (str. 93) a doporučuji jej dále nepoužívat.
4. Necítím se být odborníkem v oblasti farmakokinetiky, proto se chci zeptat, zda poločas uvolňování u nystatinového derivátu **11**, tedy 88 sekund, lze nějak smysluplně využít?
5. Mám připomínky k charakterizaci výchozích sloučenin **1a**, **1b**, **2a**, **2b**, **3a**, **3b**, **4**. Pokud jde o látky známé, chybí jakékoliv porovnání s literaturou. Pokud jde o látky nové, změření obyčejného ^1H NMR nepovažují za charakterizaci molekuly, přestože jde o polymery.

Přes vznesené připomínky mohu konstatovat, že disertační práce Ing. Elišky Drabinové obsahuje množství zajímavých výsledků. Autorka prokázala schopnost samostatné vědecké činnosti a splňuje tak podmínky § 47, odst. 4 zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách. Na základě výše uvedeného **doporučuji** proto disertační práci Ing. Elišky Drabinové k obhajobě.

V Praze dne 12. května 2014



prof. Ing. Pavel Lhoták, CSc.
Ústav organické chemie
VŠCHT Praha