



Univerzita Karlova
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

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

V Hradci Králové 12. května 2023

Posudek oponenta na disertační práci Ing. Elišky Pilařové “Pokročilé deriváty biologicky aktivních salicylamidů“

Disertační práce Ing. Elišky Pilařové byla vypracována pod vedením prof. Ing. Aleše Imramovského, Ph.D., a zcela zapadá do kontextu předchozího výzkumu školitele i pracoviště. Téma práce je vysoce relevantní, neboť se zabývá dvěma oblastmi, kde existuje jasná potřeba nových léčiv, a to terapií nádorových onemocnění a infekčních chorob, zejména těch se získanou rezistencí. Přes doposud vyvinuté úsilí a dosažené pokroky zde existuje prostor pro inovace. Vzhledem ke studijnímu oboru pak její jádro spočívá v synteticko-technologickém přístupu a jeho optimalizaci v kombinaci s výsledky externího biologického hodnocení.

Členění práce je klasické – úvod, teoretická část, cíle práce, výsledky a diskuse, experimentální část, závěr a citace, celkem 123 číslovaných stran. Práci by jistě slušel i seznamu publikovaných prací s uvedením konkrétního podílu disertantky (na pracovišti oponenta je toto povinnou součástí disertační práce). Prosím o toto alespoň u obhajoby.

Teoretická část pojednává o proteasomu, jeho struktuře a funkci, klinicky používaných inhibitech (zde oceňuji uvedení molekulárních mechanismů účinku) i sloučeninách ve vývoji (kam patří i sloučeniny podstupující klinické hodnocení, které jsou v práci řazeny mezi klinické inhibitory), a to včetně přínosů Imramovský Research Group, dále vzhledem ke studijnímu programu poněkud detailněji popsané peptidové syntéze (metodika a technologie, která byla dominantně převzata ze zdroje 36), na závěr zmiňuje antimikrobní salicylanilidy. Zde bych obecně preferoval hlubší úroveň strukturování kapitol i jiné členění – např. vyvíjené inhibitory proteasomu bych začlenil hned za klinicky používané látky, ne až prakticky na konec celé části, mnohočetný myelom bych nezařazoval uprostřed pojednání o inhibitech proteasomu apod. Obecným problémem teoretické části je, že se snaží obsáhnout široké spektrum odlišných témat, což pak vede k tomu, že se žádné problematice nevěnuje do hloubky.

Cíle práce jsou definovány rešeršně i experimentálně. Výsledky a diskuse se nejprve věnují designu cílových molekul, obecnému postupu přípravy, výstižně popisují biologickou aktivitu a její vztah ke struktuře, a to jak inhibici proteasomu a cytotoxicitu, tak antimikrobní aktivitu. Disertantce se podařilo připravit cílové sloučeniny, antimikrobní deriváty *p*-CF₃-toluidinu a „anticancer“ tri- a tetrapetidy, nově s nefyziologickými aminokyselinami, vinylsulfonovou a akrylamidovou substitucí, řada z nich má slibnou biologickou aktivitu. Rozsáhlá experimentální část (do které bych ale nezařazoval design cílových molekul ani metodiku jejich přípravy) zahrnuje obecnou část a zejména pak postupy přípravy a charakterizaci sloučenin, závěr pak přehledně shrnuje dosažené výsledky. Literatura obsahuje 58 relevantních referencí, povětšinou recentních. U e-zdrojů by mělo být uvedeno datum citování.

Dojem z práce je zbytečně snižován řadou chyb jazykového (interpunkce, velká písmena, nesoulad rodů, standart, chybění částí vět – např. str. 47, 56, 62, 94 a 113) a formálního charakteru (předložky osamoceně na konci řádků, jednotka min se píše bez tečky, jednotka na jiném řádku než hodnota veličiny, nejednotný způsob psaní Weinrebova amidu, dolní a horní indexy, mezery mezi slovy, desetinné tečky místo čárek – např. tabulky 5 a 6, aj.), překlepy (namátkou „ne-ATPázových“,

„ubiquitin“, „Meffifiel“, „*p*-toluensulfoamidová“, „afitinib“, „trypsin“, „cyklon-hexan“ aj.) či rezidui angličtiny (mixture of rotamers, dry THF, resin, methicillin-resistantní, carfilzomib a ubiquitin namísto karfilzomib a ubikvitin). Připomínky lze mít i k českému názvosloví – jde jednak o anglikanismy typu etylene, lactone, *tert*-butyl, chlorotryl, morpholin, trifluorotoluidin, isoquinolin, vancomycin, phenyl aj., dále např. metyl, ethylacetát (místo ethyl-acetát), thiolesterová, nepsaní deskriptorů kursivou (*N,N*-dimethylakrylamid, *terc*-, *m*-chlorperoxybenzoová aj.), naopak deskriptor L- se kursivou nepíše, hydrát/hydrochlorid se neznačí pomocí symbolu *. Práci se nevyhnula chemická hantýrka („práce pod inertem“, „podmínky jsou natolik přísné“, „amorfní“, „rozpouštědlo se zahustilo“ atd.). Některé obrázky mají nižší kvalitu, u některých chybí zdroj (např. 5–8).

Další připomínky:

- seznam zkratk by bylo přehlednější seřadit abecedně; zkratky se pak v textu zpravidla neskloňují,
- str. 12 – na obr. 1 není salicylamid,
- schéma 1 – chybí formální náboj na atomu boru,
- str. 21, schéma 4 – neměly by být produkty 11 a 14 solemi?
- str. 24 – E. Fischer nedostal Nobelovu cenu za peptidy, ale za chemii sacharidů a purinu, jakkoli je jeho význam pro peptidovou chemii samozřejmě neoddiskutovatelný,
- str. 25 – je Vámi uvedená jednotka u velikosti „kuliček“ pro SPPS správná?
- vzorce chránicích skupin (str. 29 a násl.) jsou nakresleny poněkud matoucím způsobem (jako *N,N*-dimethylované deriváty),
- str. 29 – HBr v kyselině octové určitě není silná báze,
- str. 33 – rozsah teplot má být -30 až +70 °C,
- str. 36 – uvádíte, že jste zdokonalili přípravu pokročilých peptidových intermediátů, které pak pro Vás připravovala firma Apigenex. Podílela jste se sama na optimalizaci této přípravy? Přípravu těchto kyselin bych pak zařadil spíše do experimentální části.
- u biologického testování postrádám uvedení, kdo a kde provedl biologické testy – disertace působí dojmem, že jde o práci disertantky,
- tab. 1 – pokud se substituenty odkazují na přechozí, nečíslovaný obrázek, pak P₁ nebude L-Leu,
- tab. 8 – postrádám uvedení koncentrace inhibitorů, při které byla stanovena reziduální aktivita,
- tab. 11 – překvapuje mne vysoká MIC isoniazidu na lékově citlivý kmen *M. tuberculosis*, dále nepovažuji za vhodné použití ampicilinu jako standardu u MRSA kmenů, když jsou na něj rezistentní; v tabulce také chybí délka inkubace u bakteriálních kmenů – co znamenají dva řádky u všech testovaných sloučenin?
- str. 61 – co znamenají dvě hodnoty u výtěžku peptidu **73b**? Obecná struktura produktů **73** neodpovídá sloučeninám **73a** a **73b**.
- experimentální část – postrádám detaily o výrobcích/dodavatelích, u přístrojů nejsou mnohdy ani uvedeni; u některých sloučenin neodpovídá elementární analýza vypočteným hodnotám (např. **50**, **51a**, **51g**, **53a** a řada dalších); některé sloučeniny nemají v pořádku NMR spektra (např. interpretace **51h** je stejná jako u **51a**, u těchto prekursorů přiřazujete jeden vodík jako NH-CH-C=O, aniž by v molekulách tato skupina byla přítomná; popisované štěpení signálu *terc*-butylu u **45j**); neúplná charakterizace (např. **51j**, **73c**); u připravených sloučenin bych uvítal i české chemické názvy – názvy jsou jen u akrylamidů, navíc částečně anglické,
- str. 66 – u charakterizace známé sloučeniny bych použil standardní odkaz,
- str. 70 a násl. – u polypeptidů udáváte, že šlo rotamery, což bych uvítal okomentovat již v diskusi. Jak jste toto určila a jak konkrétně vypadají?

- str. 78 – u derivátů **45a** a **45g** uvádíte, že jde o komerčně dostupné látky – znamená to, že byly zakoupeny?
- str. 80 – u meziproductů **46** je uvedeno, že nebyly ani izolovány, ani charakterizovány, přesto jsou u nich uvedeny výtěžky – jak tomu rozumět, prosím?
- u sloučenin **62** a **63** mne překvapuje přítomnost pouze jednoho štěpení C-F u všech sloučenin,
- str. 111 – nekorespondující popis syntézy s reakčním schématem (jiné coupling činidlo), str. 112 – poněkud zmatečný popis syntézy,
- závěr – u mikrobu se obvykle hovoří o kmenech, u eukaryotických buněk o liniích, ne naopak.

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

- 1) Jak si vysvětlujete, že epoxyketony, ale i boronáty a další inhibitory proteasomu reagují s hydroxylovou skupinou threoninu a nikoli s aminoskupinou?
- 2) Nebylo by možné připravovat cílové vinylsulfony **53** z aldehydů **55**? Je tento postup realizovatelný, jaké by mohl mít výhody a nevýhody?
- 3) Prosím, okomentujte nízké výtěžky některých sloučenin **62**.

I přes tyto poznámky a kritické připomínky je předložená disertační práce Ing. Elišky Pilařové aktuální a relevantní prací z oblasti organické technologie potenciálně biologicky aktivních molekul. Reportuje nové a přínosné poznatky z pohledu technologicko-syntetického i biologického včetně identifikace vztahů struktura-biologická aktivita. Disertantka prokázala erudici v oblasti tématu disertační práce a technologie organických specialit obecně, dovednost pracovat ve vědeckém kolektivu, prezentovat výsledky ve vědeckých časopisech (prvoautorská publikace v recenzovaném časopise Scientific Papers of the University of Pardubice, Series A; tři spoluautorské práce v European Journal of Medicinal Chemistry, Bioorganic Chemistry a International Journal of Molecular Sciences).

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 technologie.



doc. PharmDr. Mgr. Martin Krátký, Ph.D.
 Katedra organické a bioorganické chemie
 Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
 Univerzita Karlova
 Akademika Heyrovského 1203/8
 500 05 HRADEC KRÁLOVÉ
 martin.kratky@faf.cuni.cz