

Oponentský posudek k habilitační práci **Ing. Milana Jakubka, Ph.D.**

s názvem „**Nové farmakofory a jejich formulace v medicíně**“

Oponentský posudek vypracoval: *Doc. RNDr. Ivan Mazura, CSc.*

Předkládaná habilitační práce pana **Ing. Milana Jakubka, Ph.D.** s názvem „**Nové farmakofory a jejich formulace v medicíně**“ vznikala v několika posledních letech převážně v Biotechnologickém centru Vestec (BIOCEV), 1.LF-UK. Některé specializované přístrojové zázemí bylo využíváno i na Vysoké škole chemicko-technologické (VŠCHT), kde předkladatel habilitační práce působil dříve a působí jako pedagog dodnes (i náplň jeho současných přednášek pro pregraduální studenty VŠCHT s názvem „Design léčiv“, je náplní medicíně chemickou).

Formální stránka habilitační práce: Struktura předkládané habilitační práce je rozvržena do 12 kapitol, z nichž v krátkém „**Úvodu**“ (**kapitola 1**, strany 1-2) je v textu představen obor medicíně chemie, kterým se kandidát systematicky zabývá jednak jako experimentální pracovník, ale také jako vysokoškolský pedagog. Grafická prezentace situačního přehledu rozpracovanosti pěti předkládaných témat medicíně chemie je přehlednou rekapitulací (strana 2) jednotlivých stádií vývoje navržených chemických formulací v okamžiku odevzdání habilitační práce. Popis kroků a aktuální stav rozpracovanosti pěti zařazených témat je pak v práci rozdělen na **kapitoly 2-6** (strany 3-29), kde je možné soustavně sledovat proces vývoje od stanovení cíle a chemického popisu přes definici známé bioaktivity látky, formulaci navrhovaných chemických modifikací zakončené výsledky stability chemicky optimalizovaných formulací. S přehledem (i nadhledem) jsou předkládány mechanismy účinku originálně připravených formulí na jejich molekulární cíle. Kapitoly 2-6 se zabývají následujícími tématy: **kapitola 2** (strany textu 3-12) – **Kurkuminoidy**, **kapitola 3** (strany textu 13-20) – **Inhibitory signalizace IL-6/IL-6R/GP130**, **kapitola 4** (strany textu 21-26) – **Chelátory přechodných kovů**, **kapitola 5** (strana textu 27) – **Inhibitory TET1 proteinu**, **kapitola 6** (strany textu 28-29) – **Statiny**. Výsledkový přehled, včetně diskuse k připravovaným účinným látkám je prezentován v **kapitole 7** (na stranách textu 30-43). Na straně 44 (**v kapitole 8**) jsou přehledně a jednoznačně formulovány „**Závěry**“ k jednotlivým tématům zařazeným do habilitační práce. V **kapitole 9** „**Seznam publikací souvisejících s prací**“ je uveden seznam 9 publikací v zahraničních odborných časopisech s Impact Factorem (strany textu 45-46), v nichž autor habilitační práce je součástí kolektivu spolupracovníků: a) na prvním místě (přílohy č. 6, 7 a 9), b) na druhém místě (přílohy č. 2 a 5), c) osobou uzavírající autorský kolektiv (předposlední autor-příloha č. 3 a poslední autor-přílohy č. 1, 4 a 8). V **kapitole 10** je prezentován na stranách 47 a 48 „**Přehled zkratk**“ používaných v této habilitační práci. **Kapitola 11** je seznamem použité „**Literatury**“, na stranách textu 49-59 je uvedeno celkem 223 literárních odkazů, které byly v textu citovány. Na straně 60 začíná poslední **kapitola 12** této habilitační práce, „**Přílohy**“, která verifikuje ve stejném pořadí, jak je uvedeno v kapitole 9, úplné znění všech devíti publikací, které byly otištěny v letech 2015-2021 v zahraničních odborných časopisech (celkem kapitola obsahuje 9 příloh na ploše 88 listů a 163 stran textu, včetně schémat, tabulek, chemických vzorců a obrázků).

Protože každá ze zařazených kapitol 2-6 je v různém stádiu rozpracovanosti (prezentováno graficky autorem v kapitole 1), dovoluji si nyní krátká nahlédnutí do každé kapitoly samostatně.

Kapitola 2 – Kurkuminoidy. V této kapitole je čtenář práce uveden do problematiky kurkuminooidů, běžných potravinových doplňků a je velmi úsporně seznámen s komplexním pohledem na problematiku nových formulací kurkuminu. Strukturní znalost kurkuminu a jeho derivátů, stejně jako jejich fyzikálně chemické vlastnosti dovolily autorovi se zamyslet nad optimálními modifikacemi nutnými pro přípravu účinné substance i lékové formy. Znalost terapeutického potenciálu kurkuminooidů (včetně jejich bioaktivity v různých oblastech medicíny) je i s literárními odkazy prezentována v úvodu této kapitoly. Velmi cenná je pro finální úspěch jednak literární znalost pozic pro pozdější modifikace kurkuminu (obr.č. 6), ale zároveň také použití iontů přechodných kovů (např. dvojmocné kationty zinku, mědi a hořčíku) v komplexu pro zlepšení rozpustnosti kurkuminu. Tvorba derivátů kurkuminu, kurkuminooidů je alternativní cestou pro hledání nových forem terapeutických efektů (viz tab. 2 této práce, např. antinádorový či další efekty). Obsáhlá znalost systémů a technologických přístupů dodávaných léčiv je patrná v části 2.6, kde se autor zamýšlí nad vhodností jednotlivých excipientů a technologií pro zlepšení bioaktivity kurkuminu. Snahou navržené nanoformulace kurkuminu bylo zvýšení rozpustnosti ve vodném prostředí, čehož bylo dosaženo manitolem (str. 30 předkládané habilitační práce).

Odpověď na otázku, zda byla rozpustnost kurkuminového extraktu zvýšena, se nachází v bodě 2 „Závěry“ této práce, kde je konstatováno, že základní úvaha o nanoformulaci manitolem, byla správná. Formulace byla dotažena do komerčně aplikovatelného preparátu ve formě tablet a uvedena na trh s názvem NeoCurcumin. (Závěry, str. 44, bod č. 2, Publikace-Příloha č. 1, IF = 6,321, dle Scopus database byla práce citována celkem 3x, z toho v českých odborných časopisech 0x, v zahraničních odborných časopisech 3x).

Kapitola 3 - Inhibitory signalizace IL-6/IL-6R/GP130. Inhibitory signální dráhy Interleukinu 6 se autor zabývá nejen z důvodů významu interleukinu 6 jako prozánětlivého cytokinu vyvolávajícího tzv. cytokinovou bouři či účastnícího se chronických zánětlivých procesů, ale také proto, že se účastní v patogenezi řady onemocnění onkologického a neurodegenerativního charakteru. Autor kriticky hodnotí současný terapeutický přínos monoklonálních protilátek a zdůrazňuje stále větší význam inhibitorů s nízkou molekulovou hmotností, jejichž výhody spatřuje v malých nákladech, nízké antigenicitě a toxicitě a v možnosti orálního podávání. Literární popis a úvaha nad analogy madindolinu (zdroj *Streptomyces* sp.), estrogenovými analogy, deriváty bufadiendolidů či deriváty peptidů coby inhibitorů signalizace IL-6 jsou stručnou formou konstatovány v částech 3.1–3.5. Autor zaměřil svou pozornost hlavně na bazedoxifen, tzv. selektivní modulátor estrogenového receptoru třetí generace. Jeho navržená chemická formulace spočívá v tvorbě inkluzního cyklodextrinového komplexu. Optimální typ cyklodextrinu a jeho vhodná koncentrace pro bazedoxifen byly formulovány do patentové přihlášky, licencované Univerzitou Karlovou. V současné době se také nachází synteticky připravená cyklodextrinová formulace bazedoxifenu v testech klinických studií. (Závěry, str. 44, bod.č. 1, Publikace – Příloha č. 2, IF= 5,924, dle Scopus database byla práce citována celkem 18x, z toho v českých odborných časopisech 0x,

v zahraničních odborných časopisech 18x a Příloha č. 3, IF=5,924, dle Scopus database byla práce citována celkem 5x, z toho v českých odborných časopisech 0x, v zahraničních odborných časopisech 5x).

Kapitola 4 – Chelátory přechodných kovů. V kapitole chelátory přechodných kovů je hojně diskutován význam některých přechodných kovů (železo, měď, zinek či selen) jako kofaktorů řady významných enzymů ovlivněných dějů v lidském těle. Intracelulární hladiny těchto biologicky aktivních iontů jsou pod kontrolou řady transportních a skladovacích proteinů a působí jako dohled nad rovnováhou koncentrací. Autor zmiňuje správně velký význam přechodných iontů v regulaci některých neurodegenerativních a onkologických onemocnění. V této kapitole je naznačen možný synergický patogenetický efekt přechodných iontů a mutací nalézáných ve struktuře mitochondriální DNA (u neurodegenerativních poruch člověka). Pro budoucí čtenáře je přínosné autorovo zamyšlení nad zvýšenou bioaktivitou přírodních polyfenolických látek v komplexu s ionty přechodných kovů. Schématické znázornění synteticky připravených kofeinových derivátů (Schéma 1) je výsledkově hodnoceno v textu na str. 36 a je zde konstatováno, že nejúčinnější efekt byl pozorován na buněčných liniích T-lymfoblastické leukémie (pozorovaný efekt na inhibici syntézy DNA a RNA). Výsledky tvorby prazolových derivátů (inhibitorů protonové pumpy) s pomocí iontů přechodných kovů jsou prezentovány na str. 37-38 s akcentem zejména na ionty železa Fe³⁺, jejichž vyšší koncentrace může ovlivňovat dle autora patologické procesy onkologického, metabolického a neurodegenerativního charakteru. Tato kapitola je ve stadiu publikačního rozmachu a není dosud uzavřena. Je zřejmé, že publikovaná data jsou vědeckou komunitou hojně diskutována a že i v tomto směru výzkumu se autor blíží systematicky ke stanovenému cíli. (Závěry, str. 44, body č. 3 a 4, Publikace – Příloha č. 4 IF=4,913, dle Scopus database byla práce citována celkem 14x, z toho v českých odborných časopisech 0x, v zahraničních odborných časopisech 14x, Příloha č. 5 IF=5,275), dle Scopus database byla práce citována celkem 29x, z toho v českých odborných časopisech 0x, v zahraničních odborných časopisech 29x, Příloha č. 6 IF=1,688, dle Scopus database byla práce citována celkem 5x, z toho v českých odborných časopisech 0x, v zahraničních odborných časopisech: 5x, Příloha č. 7 IF=1,688, dle Scopus database byla práce citována celkem 2x, z toho v českých odborných časopisech 0x, v zahraničních odborných časopisech 2x a Příloha č. 8 IF=2,817, dle Scopus database práce dosud nebyla citována)

Kapitola 5 – Inhibitory TET1 proteinu. V kapitole „Inhibitory TET1 proteinu“ se autor zamýšlí nad chemickou podstatou mechanismu opravy excize bází při aktivní demethylaci působením TET enzymů. Uvažuje zde o možných souvislostech s nejrůznějšími nádorovými onemocněními jako jsou karcinom prsu a vaječníků či glioblastomy, kde jsou rovněž pozorovány procesy demethylace DNA. Akcentována je především (na straně 27 a stranách 38-40) změna hladin 5-hydroxy metylcytosinu a jejich role v patogenezi např. Rettova syndromu, akutní myeloidní leukémie, Alzheimerovy demence či Parkinsonovy nemoci. V této kapitole se autor práce zabývá synteticky připravenými inhibitory TET1, Fe²⁺ dependentního, proteinu. Pro splnění cílů této části práce byly navrženy heterocyklické hydrazony se speciálně upraveným zbytkem kyseliny cholové či benzoisothiazol-1,1-dioxidovou skupinou. (Obrázek 23, strana 39 a Schéma 2, strana 40).

Synteticky připravené chemické molekuly ukazují velkou afinitu chelátorů k iontům dvojmocného železa a předpokládanou inhibiční aktivitu proteinu TET1. (Závěry, str. 44, bod č. 5, Publikace – Příloha č. 9, IF=5,275, dle Scopus database byla práce citována celkem 3x, z toho v českých odborných časopisech 0x, v zahraničních odborných časopisech 3x).

Kapitola 6 – Statiny. V kapitole „Statiny“ se autor zamýšlí nad smysluplností cesty přípravy statinů z plísně *Monascus purpureus* a přípravy jejich syntetických derivátů. Vrací se myšlenkově tak jako v minulých kapitolách k možnosti využití těchto statinů v onkologické léčbě. V této části habilitační práce byl vypracován originální protokol pro chemickou syntézu biologicky aktivních látek, rubropunctatinu a monascorubrinu z hub *Monascus purpureus* (Obrázek 24, Schémata 3, 4 a 5 na stranách 41-43). Vlastní syntéza a různé chemické modifikace obou látek jsou tedy připraveny pro realizaci. Stabilita a biologická aktivita takto synteticky připravených látek (statinů) je v současné době detailně ověřována v laboratorních podmínkách. (Závěry, strana 44, dosud nepublikováno).

Shrnutí a závěr: S odkazem na „Předlohu 1.LF-UK k vypracování oponentského posudku na habilitační práci“ musím konstatovat, že zpracování pěti témat oboru medicíně chemie se opírá o hlubokou literární znalost jednotlivých problematik (citované prameny jsou hojné a zcela dostačující - souhrnný počet citací ke všem tématům je 223). Vědecká hodnota předkládaných řešení je dokumentována seznamem příložených 9 publikací v zahraniční odborné literatuře s IF v rozmezí 1,688 – 6,321 (Impact Factory periodik, stejně jako jejich citovanost jsou přílohy v závěru každého tématu, kapitoly 2-6, tohoto oponentského posudku). Silnou stránkou autorovy habilitační práce je metodické zázemí, z něhož vyzařuje zřetelná podpora ústavu, v němž se v současné době autor nachází, tj. v Biotechnologickém centru Vestec (BIOCEV). Pracoviště je vybaveno špičkovou přístrojovou technikou, kterou autor může a zřetelně umí cíleně využívat. To samozřejmě zvýrazňuje autorovu schopnost metodicky zvolit vhodnou technologii, jak pro vlastní syntézy nových modifikovaných molekul, tak pro následné hodnocení fyzikálně chemických či biologických parametrů nově vznikajících sloučenin. **Ze shora uváděných skutečností vyplývá, že kvalita docílených výsledků, měření a pozorování je provázena nejen systematickým úsilím autora vhodně identifikovat cíle výzkumu a formulovat chemickou změnu, ale také vybrat metodické zázemí. V neposlední řadě i je třeba vyzdvihnout houževnatou snahu autora o uplatnění nově vznikajících substancí v medicínské praxi. Komplexnost přístupu autora k jednotlivým tématům je s ohledem na jeho mládí velmi překvapující a dává naději, že zde vyrůstá v oboru medicíně chemie osobnost vysoce nadprůměrného významu.** Grafická zpracování chemických vzorců, schémat a chemických reakcí (včetně několika tabulek) je na úrovni, kterou nám v současnosti umožňuje špičková počítačová a reprografická technika, tedy vynikající. **Protože se autor předkládané práce věnuje soustavně oboru lékařská chemie a biochemie, chtěl bych na tomto místě vyzdvihnout aktuálnost a vysokou originalitu všech pěti témat práce. Přestože na první pohled se práce nezdá být monotematickou, pozorný čtenář brzy pochopí, že předkladateli jde především o přípravu a realizaci originálních postupů syntézy nových molekul s bioaktivním účinkem na vybraná onkologická, neurodegenerativní či zánětlivá onemocnění člověka.** Diskuse k jednotlivým

tématům je úsporná, ale věcná, což velmi pomáhá čtenáři se ve složité problematice chemických syntéz orientovat. Závěry práce jsou formulovány jasně a srozumitelně a literatura je v textu na svém místě. Na několika místech v textu jsou drobné překlepy (např. na straně 35 – poslední řádek - označeno Schéma 1, týkající se kofeinových hydrazonů je u vlastního schématu na straně 36 označeno jako Schéma 21). Tyto drobnosti nikterak nesnižují vysokou hodnotu habilitační práce a lze je odstranit např. vloženým erratem.

Při čtení habilitační práce mne napadala řada myšlenek a s tím spojených otázek, což je důkazem tvůrčího prostředí medicíně chemie, v němž se autor již několik let pohybuje a nalézá i nyní. Z mnoha myšlenek a úvah si dovoluji pouze dva doplňující dotazy:

1/ Na straně 36 jsou 2-N-heteroarylové deriváty kofeinových hydrazonů diskutovány jako účinnější a selektivnější v inhibici DNA a RNA (stejně jako v indukci apoptózy) než deriváty 2-hydroxyarylové stejných sloučenin. Je možné blíže definovat a detailněji popsat, v jakém smyslu je jejich působení selektivnější a které z chemických skupin se zdají být autorovi nejpoužitelnější pro praktické využití?

2/ V jakém stádiu vývoje se nachází syntézy rubropunctatinu a monascorubrinu? Zda jsou cesty syntézy pouze v empirické rovině či zda již probíhají laboratorní testy připravených sloučenin? Uvažuje se jejich pozdější využití i pro poruchy kardiovaskulárního systému?

Jak je zřejmé z textu i z diskuse, habilitační práce přináší zcela nové a originální vědecké poznatky a je velkou nadějí do budoucích let, že nejen ing. Milan Jakubek, PhD, ale také jeho výzkumná skupina, kterou kolem sebe shromáždil, dostane větší prostor pro svou plodnou vědeckou činnost. **Doporučuji proto práci přijmout v předložené formě a na jejím základě doporučuji udělit titul docent pro obor Lékařská chemie a biochemie.**

V Praze, dne 24.6.2022

Doc.RNDr.Ivan Mazúra,CSc.

oponent

