



Univerzita Karlova

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Akademika Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Česká republika

V Hradci Králové 15. února 2023

Posudek oponenta na disertační práci Filipa Kostelanského „Výzkum látek ovlivňujících teplotu tání oligonukleotidových sond“

Disertační práce Mgr. Filipa Kostelanského byla vypracována pod vedením školitele prof. PharmDr. Petra Zimčíka, Ph.D., a odborného konzultanta doc. PharmDr. Miroslava Miletína, Ph.D., ve slovenském jazyce a úzce navazuje na předchozí výzkum školitele/konzultanta i Azaphthalocyanine Group. Předložená práce se zabývá primárně designem, přípravou, charakterizací a hodnocením látek interagujících s oligonukleotidy na bázi akridinových derivátů, dále též oligonukleotidových sond včetně takových, které jsou modifikovány právě těmito deriváty. I přes pokroky zde existuje značný prostor pro inovaci, téma je aktuální, což doktorand dokládá i v úvodu disertační práce.

Práce vhodně kombinuje chemickou stránku – design, syntéza a charakterizace malých molekul i (modifikovaných) oligonukleotidových sond s jejich převážně fyzikálním hodnocením. Členění je klasické – cíl práce, přehled řešené problematiky, výsledky a diskuse, závěr, experimentální část, přehled výstupů (publikace, konferenční příspěvky, patenty), grantů a stáží, použitá literatura (solidních 224 odkazů) a přílohy (celkem 108 číslovaných stran).

Cíl práce je definován komplexně, avšak v minulém čase, včetně zdůvodnění jeho relevance. Přehled současného stavu je pojat poměrně široce, zabývá se řadou oblastí, které se týkají předmětu disertace, a to včetně historických aspektů: PCR, detekce a kvantifikace nukleových kyselin v PCR, kde se věnuje mj. fluoroforům a sondám, genotypizaci známých změn DNA a možnostem zvýšení termální stability krátkých DNA duplexů, nakonec pojednává o syntéze (značených) oligonukleotidů. Text je místy velmi hutný, někde detailnější, jinde spíše přehledový.

Výsledky a diskuse popisují syntézu cílových akridinových aj. derivátů, a to včetně vyskytnuvších se komplikací, modifikovaných oligonukleotidových sond a také fyzikální hodnocení (vliv na T_m duplexu DNA, interakce malých molekul s DNA, termální denaturace značených sond, studium interkalace). Práce reportuje řadu fyzikálních experimentů, u kterých autor uvádí, že byly provedeny ve spolupráci s kolegy z Generi Biotech. Zajímalo by mne proto, jaké testování prováděl autor sám a kdy šlo o ryze externí hodnocení. Stručný závěr shrnuje východiska, záměr práce a podstatná zjištění. Následuje experimentální část zahrnující jak obecné chemické metody, tak syntézy a charakterizaci malých molekul a oligonukleotidových derivátů a metodiku hodnocení.

Práce je sepsána na dobré úrovni, přesto se neubráníla některým chybám jazykového (zejména interpunkce, velká písmena) a formálního charakteru (předložky osamoceně na konci řádků, deskriptory *H*, *N*-, *O*- a *C*- či označení vazeb v *ortho*-kondenzovaných systémech a interakční konstanta *J* se důsledně píšou kursivou, chyby/nejednotnosti v literatuře, chybějící mezery mezi znaky, jednotka je na jiném řádku než hodnota veličiny, desetinné tečky vs. čárky, chybějící dolní indexy aj.), občas se objeví anglicismy či překlady (etylém, nukleotity, fosfortriesterová aj.). Drobné připomínky lze mít i k chemickému názvosloví – např. nesprávný název BCN či CpG v seznamu zkratkách či nedůsledné používání hranatých a složených závorek. V experimentální části se také občas vyskytuje chemická hantýrka („suchý fenol“, „správná hmota“, výraz oddestilování místo odpaření aj.). Nicméně tyto nedostatky v úhrnu neruší srozumitelnost sdělení.

Další připomínky:

- seznam zkratk je nekonzistentní – některé jsou jen anglicky, jiné přeložené, někde jen slovensky; některé zkratky nejsou definovány (např. MO), jiné nejsou definovány v textu (HFE), jiné zcela chybí v seznamu (BO),
- obr. 31 – chybí lokant *terc*-butylové skupiny,
- str. 32 a dále – opakovaně hovoříte o hydroxidu amonném – co to vlastně je hydroxid amonný?
- obr. 32 – chybný náboj na dusíku po reakci azidu s alkynem (chybně je již ve zdroji),
- při Ullmannově kondenzaci jste u typově shodných reakcí používal ke katalýze jednak měď, jednak měď společně s jodidem či oxidem měďným. Na základě čeho byla tato aditiva volena?
- str. 47-48 – uvádíte neúspěšný pokus o hydrolýzu esteru – byly zkoušeny i jiné metody, než pomocí NaOH?
- kap. 4.1.6 – uvítal bych podrobnější diskusi přípravy a purifikace cílových derivátů,
- experimentální část – obecně: postrádám někde detaily o výrobcích/dodavatelích, u některých přístrojů nejsou ani uvedeni; u některých sloučenin chybí teploty tání (pevné látky) či IR spektra; v některých postupech chybí buď látkové množství, nebo navážka chemikálií (někde jen uvedeno, že bylo přidáno katalytické množství), množství kapaliny je mnohdy uvedeno pouze ve váhových jednotkách; u známých/dříve připravených sloučenin často chybí jakákoli charakterizace – jak byla ověřena jejich identita a čistota?
- str. 68 – opravdu byla IR spektra měřena v KBr tabletách technikou ATR?
- str. 76 – sloučenina 22 – ve spektru nejsou u štěpení uvedeny některé interakční konstanty; který z vedených signálů v ¹H spektru patří esterovému methylo?
- str. 77 – u sloučeniny 24 uvádíte: „*Vzhľadom na výsledky testov na schopnosť stabilizácie duplexu látka nebola ďalej charakterizovaná.*“ – zajímalo by mne, jak měla být dále charakterizována? To jste věděl dopředu, že bude neaktivní?
- u sloučenin 31 a 47 je uvedeno, že se jedná o olejovité látky, ale byla u nich stanovena teplota tání, u 31 i s konstatováním, že taje za rozkladu – jak jsou tyto údaje vzájemně v souladu?
- postrádám charakterizaci sloučeniny 41-1.

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

- 1) Vaše práce se primárně zabývá deriváty 9-aminoakridinu. Prosím, přehledně shrňte známou biologickou aktivitu aminoakridinových derivátů. Jak je to s toxicitou takovýchto sloučenin?
- 2) Byl popsán vliv alternativního párování bází na T_m oligonukleotidových sond? S jakou četností se vyskytuje a není třeba ho ve Vámi studovaných aplikacích zohledňovat?
- 3) V závěru uvádíte: „*Na použitie akridínov ako stabilizátorov a súčasne ako fluoroforov je ale potrebná ďalšia optimalizácia fotofyzikálnych vlastností akridínov.*“ Jak by tato optimalizace měla vypadat, jaké máte odpovídající návrhy na design nových molekul?

I přes výše uvedené komentáře a připomínky je předložená disertační práce Mgr. Filipa Kostelanského relevantním a přínosným dílem. Jednoznačně přináší nové a zajímavé poznatky, a to s aplikačním potenciálem. Doktorand prokázal odpovídající erudici v oblasti tématu disertační práce i v rámci vědního oboru, dovednost pracovat ve vědeckém kolektivu, prezentovat své výsledky jak na vědeckých setkáních (přednášky, postery), tak formou experimentálních publikací ve vysoce kvalitních mezinárodních časopisech, zejména předmětu disertační práce se týkající článek ve vysoce prestižním *Nucleic Acids Research*, a dvou patentových přihlášek.

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 farmaceutické chemie.

doc. PharmDr. Mgr. Martin Krátký, Ph.D.

Katedra organické a bioorganické chemie

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Univerzita Karlova

Akademika Heyrovského 1203

500 05 HRADEC KRÁLOVÉ

martin.kratky@faf.cuni.cz