

## **Oponentský posudek doktorské disertační práce RNDr. Milana Kožíška nazvané „Overcoming of Drug resistance: The discovery, design and characterization of new nonpeptidic inhibitors of HIV – 1 protease“**

Oponent : RNDr. Pavel Majer, C.Sc.

Téma předkládané disertační práce je velice aktuální. Překonání rezistence viru HIV je jedním z nejdůležitějších cílů současného výzkumu v této oblasti. Lze říci, že pokud by virus HIV nebyl schopen rychle vytvářet rezistentní mutanty, byl by dnes již problém syndromu získané imunitní nedostatečnosti (AIDS), minimálně ve vyspělých zemích, v podstatě vyřešen. Těžištěm práce jsou čtyři publikace uveřejněné v časopisech s vysokým „impact factorem“ a mezinárodním ohlasem, z nichž na dvou je Dr. Kožíšek prvním autorem. Jelikož publikace jsou samozřejmě produktem týmové práce celé skupiny, autor v disertaci velmi přesně specifikuje vlastní intelektuální i experimentální příspěvek.

Práce v úvodu dále obsahuje výstižné shrnutí problematiky léčiv proti AIDS se zřetelem na inhibitory HIV proteasy (HIV-PR), které si samo o sobě zaslouží zvláštní publikaci ve formě přehledného článku.

K několika málo formálním nedostatkům této práce patří neuvedení absolutní konfigurace některých chirálních center ve vzorcích inhibitorů (indinavir, nelfinavir) a celkově nevýrazné provedení struktur inhibitorů.

Tématem první publikace je analýza vzniku rezistence vůči nelfinaviru na molekulární úrovni. Jejím nejzajímavějším závěrem je, že ačkoli nelfinavir tvoří s mutanty větší počet přímých interakcí, váže se na ně přesto výrazně slaběji. Tento zdánlivě kontrain intuitivní závěr má obecnější platnost v medicíně, a to zejména při racionálním designu ligandů resp. léčiv. Vysvětluje proč často používaná metoda maximalizace počtu polárních interakcí nevede k aktivnějším látkám a zdůrazňuje tak význam entropického příspěvku k celkové vazebné energii.

Zbývající tři publikace popisují objev a charakterizaci inhibitorů HIV proteasy obsahujících metallacarboranové substituenty. Nízká toxicita a vysoká metabolická stabilita patří k zásadním výhodám těchto neobvyklých farmakoforů. Překvapivá je také selektivita některých sloučenin. Zásadním nebezpečím při studiu netradičních inhibitorů izolovaných pomocí randomního testování velkých chemických knihoven bývá nespecifická vazba

studovaného enzymu na agregáty, které vytvářejí některé hydrofobní látky ve vodném prostředí. Autoři si toto nebezpečí dobře uvědomili, a tak k velkým kladům předkládané disertace patří adekvátní množství experimentálního materiálu, který dokazuje, že alespoň u části metallacarboranových inhibitorů jde o standardní kompetitivní inhibici v celém rozpětí měřených koncentrací. Práce jsou také doplněny několika krystalovými strukturami s vysokým rozlišením s patrnými „hydrid-protonovými“ vazbami mezi B-H atomy metallacarboranu a protony enzymu, které potvrzují specifickou interakci s vazebnou dutinou.

Je škoda, že do studie nebyly zahrnuty látky s hydroxylovou skupinou přímo vázanou na linker spojující obě metallacarboranové jednotky ani látky s různou délkou linkeru (částečnou výjimkou je látka GB-21 s jedním metallacarboranem). Z krystalové struktury vyplývá, že linker má neuspořádanou konformaci a tedy neoptimalizovanou interakci s aktivním centrem. Jsem toho názoru, že zde příliš mnoho konformační flexibility vazbě škodí. Chápu, že důvodem byla zjevně syntetická obtížnost, přesto by bylo zajímavé podobné látky v budoucnu připravit a otestovat.

Ve třetí publikaci autoři m.j. studují rezistenční profily čtyř metallacarboranových inhibitorů vůči divoké formě proteasy (WT-PR) a jejím sedmi mutantům, tyto profily pak porovnávají se sedmi klinickými inhibitory. Metallacarboranové inhibitory vykazují relativně malé poklesy aktivity, zatímco klinické inhibitory vykazují, s výjimkou darunaviru, částečně také lopinaviru a atazanaviru, poklesy výrazně větší. Původní aktivity klinických sloučenin oproti WT-PR jsou ale minimálně o dva řády lepší, takže v případě mutantů jsou pak hodnoty jak metallacarboranů, tak klinických sloučenin často srovnatelné. Tohoto srovnání se týká má druhá diskusní otázka.

### **Otázky do diskuse:**

1. Otázka, která se logicky nabízí je : „Kam dál v metallacarboranových inhibitorech?“ Konkrétně, jsou tyto inhibitory potenciálně využitelné jako léčiva? Jaké další experimenty jsou v plánu, event. jaké by disertant navrhoval pro jejich další evaluaci?
2. Nakonec jedna polemická otázka. Podle mé zkušenosti, bývají inhibitory s nižší aktivitou vůči WT – enzymu zpravidla méně citlivé vůči mutacím než vysoce aktivní inhibitory s  $K_i$  v subnanomolární oblasti. Zajímá mě, zda má disertant podobnou zkušenost. Pokud ano, do jaké míry se dle jeho názoru tento efekt podílí na lepším profilu studovaných metallacarboranů?

**Závěr:**

Disertační práci, kterou předkládá Dr. Milan Kožíšek hodnotím vysoce kladně, a to jak po stránce formální, tak i obsahové. Domnívám se, že Dr. Kožíšek splnil všechny podmínky pro udělení vědecké hodnosti Ph.D. Doporučuji, bez jakýchkoli výhrad, aby mu byl tento titul po úspěšné obhajobě udělen.

Pavel Majer

Dne 13. června 2010

Sykesville, stát Maryland, U.S.A.