

V Bratislave, 18. októbra 2016

OPONENTSKÝ POSUDOK

na dizertačnú prácu Mgr. Barbory Vaňáskovej s názvom: „Deriváty pyrazínkarboxylové kyseliny jako potenciální antituberkulotika (příprava a studium biologických vlastností)“

Vedúci dizertačnej práce: Prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.

Odborný konzultant: PharmDr. Jan Zitko, Ph.D.

Predložená dizertačná práca pani Mgr. Barbory Vaňáskovej bola vypracovaná na Katedre farmaceutickej chémie a kontroly liečiv Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovej v Prahe. Primárnym leitmotívom práce je príprava a hodnotenie biologického pôsobenia zlúčenín, ktoré sú štruktúrne odvodené od pyrazínkarboxylovej kyseliny.

Po formálnej stránke je dizertačná práca tvorená 226 stranami textu. V úvodnej časti autorka ďakuje svojmu školiteľovi, Prof. PharmDr. M. Doležalovi, Ph.D. a aj odbornému konzultantovi, PharmDr. J. Zitkovi, Ph.D., za odborné vedenie, rady a pomoc počas celého doktorandského štúdia. Mgr. Barbora Vaňásková tiež vyjadruje poďakovanie kolegom z Katedry farmaceutickej chémie a kontroly liečiv a aj jej ďalším mimokatedrovým, resp. mimofakultným spolupracovníkom, ktorí participovali pri riešení čiastkových výskumných úloh.

Predkladateľka tejto dizertačnej práce bola, resp. je úspešnou riešiteľkou niekoľkých grantových projektov, a to GAUK 710312 B-CH/FaF, GAUK 1594214 B-CH/FaF, SVV-2016-260-291, IGA NZ 13346, FAFIS CZ.1.07/2.2.00/28.0194, TEAB CZ.1.07/2.3.00/20.0235 a projektu Pre-seed II CZ.1.05/3.1.00/14.0299.

Kapitola 1 *Formulace problematiky a způsob řešení* je venovaná stručnej epidemiológii a incidencii tuberkulózy (TBC) a aj pyrazínamidu (PZA), liečivu, ktoré patrí do prvej línie antituberkulotík.

Ciele dizertačnej práce sú jednoznačne a jasne formulované v kapitole 2 *Cíl práce*, t.j. (i) zhrnutie problematiky tuberkulózy, súčasných možností terapie a trendov vo vývoji nových antituberkulotík, (ii) príprava nových originálnych derivátov pyrazínkarboxylovej kyseliny (POA), (iii) hodnotenie ich fyzikálno-chemických a (iv) biologických vlastností. Súčasťou tejto kapitoly sú aj prehľadne znázornené príslušné cieľové štruktúry.

V kapitole 3 *Teoretická část, 3.1 Tuberkulóza* Mgr. Barbora Vaňásková detailnejšie informuje o epidemiológii a incidencii TBC, o jej rezistentných formách a o problémoch, ktoré sú spojené s HIV-koinfekciou. Špeciálna pozornosť je venovaná stavbe bunkovej steny *Mycobacterium tuberculosis* (kapitola 3.2 *Mycobacterium tuberculosis – buněčná stěna*), súčasným klinickým farmakoterapeutickým možnostiam a terapeutickým režimom, ktoré sú používané pri liečbe TBC (kapitola 3.3 *Terapie tuberkulózy*). Autorka tiež prehľadne sumarizuje antituberkulotiká, ktoré sú v predklinických a klinických fázach výskumu a ktoré patria do skupiny benzotiazinónov, kaprazamycínov, analógov spektinomycínov, riminofenazínov, dipiperidínov, imidazopyridínov, oxazolidinónov a etyléndiamínov.

Osobitná pozornosť je sústredená na pyrazínamid (PZA; kapitola 3.4 *Pyrazínamid*), na nešpecifické a špecifické mechanizmy jeho antituberkulotického pôsobenia a mechanizmus vzniku rezistencie proti tomuto liečivu. Dizertantka Mgr. Barbora Vaňásková prehľadne uvádza aj vzťah medzi chemickou štruktúrou derivátov PZA a ich antituberkulotickou aktivitou.

Metodická časť dizertačnej práce (kapitola 4 *Metodická časť*) je venovaná (i) charakterizácii prístrojového vybavenia a použitých analytických metód (kapitola 4.1 *Prístroje, chemikálie a použité analytické metódy*), (ii) aplikovaným syntetickým postupom, ktoré sú prezentované textovou formou a schématicky (kapitola 4.2 *Použité syntetické postupy*), (iii) štúdiu *in silico* (kapitola 4.3 *Docking*) a aj metodikám *in vitro* biologického hodnotenia (kapitola 4.4 *Metodiky biologického hodnotenia*), t.j. evaluácii antimykobakteriálnej, antifungálnej a antibakteriálnej aktivity syntetizovaných zlúčenín; štúdiu inhibície syntézy mykolových kyselín a ďalších elementov mykobakteriálnej bunkovej steny; hodnoteniu antivírusového, cytotoxického a herbicídneho pôsobenia.

Samostatnú a ucelenú časť dizertačnej práce tvorí komentár a diskusia k dosiahnutým výsledkom (kapitola 5 *Komentár dosažených výsledkov a jejich diskuzie*). Autorka práce pri diskusii o výsledkoch zohľadňuje jednotlivé série pripravených derivátov. Hodnotené zlúčeniny boli rozdelené do niekoľkých sérií, a to *P1* (*N*-benzylpyrazín-2-karboxamidy; 12 zlúčenín), *P2* (*N*-benzylpyrazín-2-karboxamidy a *N*-fenylypyrazín-2-karboxamidy; 16 zlúčenín), *P3* (*N*-fenylypyrazín-2-karboxamidy; 25 zlúčenín), *P4* (alkylamino-/fenylalkylaminoderiváty PZA; 22 zlúčenín), *P5* (alkylamino-/fenylalkylaminoderiváty *N*-fenyly- a *N*-(2-chlórfenyly)pyrazín-2-karboxamidu; 19 zlúčenín), *P6* (alkylamino-/fenylalkylaminoderiváty *N*-benzylpyrazín-2-karboxamidu; 17 zlúčenín), a *P7* (cykloalkylaminoderiváty *N*-fenyly- a *N*-benzylpyrazín-2-karboxamidu; 12 zlúčenín).

Diskusia k získaným výsledkom je orientovaná na syntézu, molekulovomodelovacie štúdium, *in vitro* hodnotenie biologických profilov pripravených zlúčenín a aj na komplexné hodnotenie vzťahov „štruktúra-aktivita“ (*SAR*).

V závere dizertačnej práce (kapitola 6 *Záver*) sú sumarizované najvýznamnejšie zistenia, nové originálne poznatky a prínosy autorky pre rozvoj vedeckej disciplíny spolu s uvedením chemických štruktúr najperspektívnejších zlúčenín *P3-13*, *P4-2i* a *P4-1i*, ktoré sú charakterizované relevantnými údajmi z biologického hodnotenia.

V kapitole 7 *Seznam publikovaných prací* je prezentovaný zoznam vedeckých publikácií autorky dizertačnej práce spolu s jej konkrétnou participáciou na príslušnom publikačnom výstupe.

Doterajšia publikačná aktivita Mgr. Barbory Vaňáskovej je vynikajúca – je prvou autorkou, resp. spoluautorkou ôsmich publikácií v renomovaných karentovaných, resp. impaktovaných časopisoch *Molecules*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *Chemical Biology & Drug Design*, *MedChemComm* alebo *Chemical Papers*. Mgr. Barbora Vaňásková je tiež spoluautorkou patentu WO 2016/095877 A1: 2016, resp. PV 2014-925 a autorkou niekoľkých prednášok (3) a posterových príspevkov (9) na národných a medzinárodných vedeckých konferenciách.

Kapitola 8. *Seznam použité literatury* obsahuje 250 citovaných literárnych a internetových zdrojov.

Prílohy tvoria autorkine publikácie, ktorých obsah je diskutovaný v príslušných častiach dizertačnej práce (prílohy P1–P6), resp. sú to doposiaľ nepublikované údaje (príloha P7).

Z predkladanej dizertačnej práce je zrejmé, že autorka veľmi dobre zvládla zvolenú vysokoaktuálnu problematiku, ktorá má veľmi významný potenciál praktického využitia. Práca Mgr. Barbory Vaňáskovej je po stránke vedeckého obsahu a aj zo štylistického a jazykového pohľadu na výbornej úrovni.

Publikačné výstupy Mgr. Barbory Vaňáskovej jednoznačne potvrdzujú, že výsledky jej vedecko-výskumnej činnosti boli veľmi detailne posudzované, komentované a prešli veľmi náročnými recenznými konaniami. V rámci diskusie k dizertačnej práci si dovoľujem predložiť uchádzačke niekoľko doplňujúcich otázok, resp. námetov:

1. Pomerne novou skupinou zlúčenín, ktoré vykazujú zaujímavé antimykobakteriálne pôsobenie (vrátane účinnosti proti niektorým rezistentným kmeňom *Mycobacterium tuberculosis*), sú benzotiazinóny. Vo svojej dizertačnej práci uvádzate, že deriváty s pracovným označením BTZ043 a PBTZ169 sú vo fáze predklinického hodnotenia (str. 34). Sú známe aj údaje o možnom antimykobakteriálnom pôsobení ich metabolitov?

2. Veľmi sľubná antimykobakteriálna aktivita bola zistená aj v prípade tzv. hybridných molekúl, ktorých chemická štruktúra je „kombináciou“ substituovaného pyrazínamidu a substituovaného 6-fluórchinolónu (str. 44). Môžete, prosím, špecifikovať vzťah medzi chemickou štruktúrou a antimikróbnou účinnosťou takýchto zlúčenín?

3. Pri SAR-hodnotení v skupine *N*-benzylpyrazín-2-karboxamidov a *N*-fenylpyrazín-2-karboxamidov (séria P2) konštatujete, že prítomnosť elektrónakceptornej skupiny v polohe 2 (2-Cl, 2-I) fenylového jadra nemusela byť nevýhodnou z hľadiska pôsobenia príslušných zlúčenín proti *M. tuberculosis* H₃₇R_v (str. 65–66).

Akým spôsobom by sa podľa Vás mohla prejaviť 2,6-dichlórs substituícia v antimykobakteriálnom profile takto substituovaných *N*-fenylpyrazín-2-karboxamidov (str. 59, séria P2, *n*=0)? Prítomnosť dvoch atómov chlóru v polohe 2 a 6 by pravdepodobne znamenala vznik takmer planárneho systému, v ktorom by mohli byť atómy chlóru „zľahka“ mimo roviny. Úlohu by mohli zohrávať aj repulzné efekty medzi elektrónovými oblakmi atómov chlóru a NHCO-skupinou.

4. Čo bolo motiváciou pre výber hydroxyalkylového a metoxyalkylového substituenta v sérii zlúčenín P5, alkylamino-/fenylalkylaminoderivátov *N*-fenyl- a *N*-(2-chlórfenyl)pyrazín-2-karboxamidu (str. 68)? Očakávali ste pri projekcii takýchto molekúl ich zaujímavé antimykobakteriálne pôsobenie?

5. Pri hodnotení účinnosti 6-alkylamino-*N*-fenyl- a 6-alkylamino-*N*-(2-chlórfenyl)pyrazín-2-karboxamidov **3a–f** proti *M. tuberculosis* H₃₇R_v (str. 179, príloha P5 – „Table 1“) bol pozorovaný nárast ich aktivity až po deriváty s R=H, Alk=C₆H₁₃, C₇H₁₅ (MIC=5 μM). Nasledujúca zlúčenina v homologickom rade, v ktorej chemickej štruktúre Alk=C₈H₁₇ (**3f**), vykazovala však už nižšiu účinnosť (MIC=10 μM). Podobný priebeh mala aj závislosť antimykobakteriálneho pôsobenia 2-Cl-substituovaných molekúl **4a–f** od dĺžky alkylového reťazca Alk. Ako sa takýto fenomén nazýva? Čo by mohlo byť jeho príčinou?

Univerzita Komenského v Bratislave
Farmaceutická fakulta
Katedra farmaceutickej chémie
Odbojárov 10, 832 32 Bratislava 3

doc. PharmDr. Ivan Malík, PhD.
tel: +421-2-50 117 227; e-mail: malik@fpharm.uniba.sk

Ciele dizertačnej práce, prezentované v kapitole 2 *Cíl práce*, boli jej predkladateľkou realizované komplexne a úplne. Z dizertačnej práce a aj z publikačných výstupov uverejnených v renomovaných karentovaných, resp. impaktovaných časopisoch *Molecules*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *Chemical Biology & Drug Design*, *MedChemComm* alebo *Chemical Papers*, v ktorých je Mgr. Barbora Vaňásková prvou autorkou, resp. spoluautorkou, vyplýva, že vie komplexne analyzovať problém, navrhnúť jeho riešenie s použitím moderných metód a postupov a komplexne vyhodnotiť získané výsledky.

Po zodpovedaní otázok a úspešnej obhajobe dizertačnej práce **odporúčam** udeliť Mgr. Barbore Vaňáskovej vedecko-akademický titul ***Philosophiae Doctor (Ph.D.)*** vo vednom odbore farmaceutická chémia.