



# UNIVERZITA KARLOVA FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Akademika Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Česká republika

<http://www.faf.cuni.cz>

tel. +420 495 067 111, fax +420 495 518 002

---

## Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Barbory Vaňáskové

Disertační práce Mgr. Barbory Vaňáskové je prezentována jako komentovaný seznam šesti publikovaných vědeckých prací a výsledků jedné práce zatím nepublikované. Téma celé práce je zaměřeno na syntézu látek odvozených strukturně od úspěšného antituberkulotika pyrazinamidu a následné hodnocení jejich biologických vlastností se zaměřením zejména na jejich antimykobakteriální aktivitu. V práci je proto celkem logicky věnována úvodní rešeršní část tuberkulóze z hlediska podrobného popisu patogenu a léčby tohoto infekčního onemocnění. V teoretické části velmi oceňuji, že je přehled používaných látek zpracován jasně, přehledně a dává ucelený obraz o současné terapii a nejnovějších látkách jak aktuálně registrovaných v posledních letech, tak těch, které se nacházejí v preklinických a klinických studiích. Dále je zvýšená pozornost věnována pyrazinamidu, jehož obměny studentka ve své práci prováděla. Jsou uvedeny také jednotlivé teorie o jeho, zřejmě velmi komplexním, mechanismu účinku a následně jsou tyto teorie brány v potaz při studiu adeptkou nově syntetizovaných látek a hledání jejich mechanismu účinku.

Vlastní experimentální práce je zaměřena na syntézu několika sérií amidů kyseliny pyrazinkarboxylové s obměnami jak v amidové části, tak také v dalších polohách pyrazinu. Syntetické práce nebyly obzvláště komplikované, víceméně se jednalo vlastně o dva typy reakcí – amidaci a nukleofilní substituci. Na druhou stranu, výzkum syntetických metodik zřejmě nebyl cílem práce, který vidím spíše v hledání vztahů mezi strukturou a účinkem v rozsáhlých sériích látek. Oceňuji pak snahu v druhé části práce (kap. 5.2) zaměřit se i na hledání mechanismu účinku jak pomocí dockingových studií nebo monitorování produktů enzymových reakcí. Tato část práce jí jednoznačně pomáhá vyprostit se z pouhého screeningu velké série látek. Výsledky jednotlivých biologických aktivit jsou pak zhodnoceny a definovány určité vztahy mezi strukturou a antimykobakteriálních účinkem. Byly také objeveny i látky, které se svojí aktivitou vyrovnají standardu izoniazidu a/nebo předčí modelovou látku pyrazinamid.

Práce je po grafické a gramatické stránce psána na velmi dobré úrovni s menším počtem drobných překlepů (přibližně jeden překlep na stránku). Malou výtku mám z tohoto pohledu snad jen k popiskům obrázků, grafů a schémat, které se běžně uvádějí pod a ne nad obrázkem apod. Popisky nad se používají pouze u tabulek.

K práci mám pár poznámek, případně námětů do diskuze během obhajoby disertační práce:

- V obecné části je probírána problematika MDR a XDR kmenů mykobaktérií. Je zde ovšem zcela opomenuta problematika TDR kmenů. Byl k tomu nějaký důvod?
- V úvodní části na str. 37 je krátce zmíněna i vakcinace BCG vakcínou, její nízká účinnost a snahy o přípravu vakcín nových. Jaké jsou aktuální výsledky při výzkumu těchto nových

vakcín a v čem zásadním se liší od BCG vakcíny? Dá se očekávat, že se v dohledné době na trh dostane nějaká nová vakcína?

- Studentkou syntetizované látky série 1-3 byly připraveny za „účelem zvýšení lipofility“ s tím, že pak budou rychle metabolizovány jaterními amidasami na POA (str. 58). Pokud tedy dojde ke štěpení na POA již v játrech, nelze očekávat zvýšení lipofility pro průnik do mykobakterií zavedením lipofilní substituce na dusíku amidové skupiny. Na druhou stranu, pokud ke štěpení v játrech nedojde a látka bude lépe pronikat do mykobakterií ve formě amidu, je dost diskutabilní její hydrolyza na POA (a její deriváty) v mykobakteriích, protože zřejmě tyto látky nebudou substrátem pro PncA. Toto je v práci diskutováno např. již v teoretické části na str. 46 jako problém stability amidové funkce při její hydrolyze (látky 12 a 13) s tím, že dle tvaru katalytického místa PncA a konjugace dusíku amidové skupiny s aromatickým jádrem je nereálné štěpení těchto derivátů za uvolnění POA. Taktéž dle dockingových studií u látek série 5 (taktéž obsahuje aromatický substituent na dusíku amidové vazby) to vypadá, že tyto látky nebudou substrátem pro PncA. Jak si tedy představujete, že tyto látky by teoreticky mohly fungovat?
- Velmi oceňuji, že v práci byla zkoumána i cytotoxicita proti lidským buňkám, a že se v některých případech ukázalo, že se u antimykobakteriální aktivity nejedná čistě o prostou toxicitu „na všechno“. Byl bych ale opatrnější z hlediska interpretace výsledků, protože index SI pouze větší než 10 (z toho důvodu, že dál už látka není rozpustná) není dle mého názoru důkazem „dostatečné bezpečnosti“. Z tohoto pohledu by nebylo špatné pro porovnání stanovit SI také pro izoniazid (pro pyrazinamid jsem jej v práci našel) nebo dohledat v literatuře jaká je jeho toxicita proti různým liniím lidských buněk.
- Na str. 67 jsou uváděny jako jedny z důvodů pro vybranou sérii látek znalost mechanismu účinku pro 5-Cl-PZA a jeho slibná aktivita. Tento důvod asi nelze považovat za zcela relevantní, protože po provedených úpravách jsou látky již zcela jiné a amino substituent propůjčuje látkám v sérii 4-7 zcela jiné elektronové, sterické i fyzikálně-chemické vlastnosti.
- Na str. 69 je popsán vznik vedlejšího produktu ve schématu 7 v poměru 1:5. Pokud to dobře chápu, tak to znamená, že vzniká 5 dílů vedlejšího produktu a 1 díl toho chtěného. Pak ale není reálný výtěžek 63% toho správného produktu.
- Můžete popsat, v čem spočívá mechanismus a přínos podmínek dle Schotten-Baumana? Dle mého názoru by voda v té reakci měla spíše konkurovat chtěné amidaci hydrolyzou acylchloridu na kyselinu a výtěžky by měly být spíše nižší. Očekával bych také jako další produkt 6-benzylaminopyrazin-2-karboxylovou kyselinu. Proč podobné podmínky nebyly použity i pro syntézu látek dle Schématu 8, kde je zmiňován vedlejší produkt vzniklý stejným mechanismem?
- Bylo opravdu nutné u aminodehalogenační reakce (Schéma 9) přidávat triethylamin, a to zejména v případě, kdy je primární alifatický amin použit ve výrazném přebytku? V té chvíli je dle mého názoru ten primární amin místem vychytávání volného HCl.
- Na str. 70 se píše, že methylamin byl generován z vodného roztoku hydrochloridu, v příloze P4, ale o hydrochloridu není zmínka (syntéza látky 1b, str. 168). Co bylo tedy použito?

- Výsledky pro látku 9 na obr. 14 (zcela zde chybí keto-MAME) dle mého názoru neodpovídají zcela výsledkům prezentovaným na obr. 15 pro 9C. Ty výsledky by měly být dle podmínek totožné. Kolik bylo provedeno u těchto pokusů opakování pro potvrzení/vyvrácení teorií a případně pro upřesnění statistických dat (v příloze P7 se tento údaj nenachází)?

Závěrem bych chtěl poznamenat, že výše zmíněné připomínky nesnižují vědeckou hodnotu předložené práce, která je uceleným vědeckým dílem. Předkladatelka je autorkou/spoluautorkou šesti vědeckých publikací v impaktovaných časopisech, které jsou prezentovány v rámci disertační práce, u dalších tří prací a dvou patentů je členkou autorského kolektivu. To považuji za velmi kvalitní publikační výstupy na studenta postgraduálního studia. Doporučuji proto jednoznačně předloženou práci přijmout jako podklad k udělení titulu Ph.D.

V Hradci Králové, dne 18.10.2016

Doc. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.  
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze  
Heyrovského 1203  
500 05 Hradec Králové  
+420 495067257, [zimcik@faf.cuni.cz](mailto:zimcik@faf.cuni.cz)