

Oponentský posudek disertační práce :
Design and Synthesis of Tn-Bearing Glycodendrimers and Their
Interaction with Components of Innate and Adaptive Immunity,
předložené Mgr. Pavlem Vepřekem.

Téma disertační práce Mgr. Pavla Vepřeka je vysoce aktuální, neboť se úzce dotýká současného trendu v terapii nádorových onemocnění, pro který je charakteristickým znakem nástup imunoterapeutických přístupů a kombinované imuno- a chemoterapie, zejména při léčbě zbytkových nádorů, kdy je pouhá chemoterapie neúčinná z důvodu lékové rezistence.

V předložené disertační práci si Mgr. Pavel Vepřek uložil náročné úkoly spočívající jednak v syntéze jím navržené originální serie rozvětvených glykodendrimerů nesoucích Tn antigen, jednak v testování a matematickém modelování jejich vlivu na modulaci adaptivní a vrozené imunity, a to v rámci spolupráce s několika odbornými pracovišti.

Zaměřil se na

1. syntézu tzv. MAG, tj. Multiple Antigenic Glycopeptides, připojených na biokompatibilní nosič,
2. syntézu klasických MAG, tzn. příslušných volných látek nevázaných na pryskyřici,
3. vyhodnocení vazebné charakteristiky a schopnosti připravených látek indukovat imunitní odpověď u myši a na korelaci výsledků pro imobilizované a volné MAG,
4. vyhodnocení vlivu zabudované γ -aminomáselné kyseliny na konformační chování jednotlivých větví postupně narůstající molekuly MAG v průběhu syntézy s využitím metod molekulárního modelování a MD,
5. přípravu nových struktury tzv. „comblike multiple glycopeptide antigens“ a vyhodnocení základních vazebných interakcí těchto látek a jejich schopnosti modulovat cytotoxickou aktivitu NK buněk, jakož i schopnosti indukovat imunitní odpověď u myši.

V syntetické části práce pan Vepřek plně uplatnil své rozsáhlé zkušenosti s přípravou peptidů na polymerních nosičích a prokázal znalosti chemie glykopeptidů. Zatímco příprava MAG na biokompatibilním nosiči TentaGel byla uskutečnitelná pomocí divergentního postupu Boc/Bzl strategií a produkty charakterizovány alespoň aminokyselinovou analýzou, při přípravě klasických MAG se autor musel vyrovnat se známou nestabilitou O-glykosidické vazby

vůči působení fluorovodíku a použít Fmoc/tBu strategii, více kompatibilní se stabilitou navázaného zbytku α -D-GalNAc. Proto je tato část velmi bohatá z hlediska rozmanitosti použitých polymerních nosičů (4), kondenzačních činidel (5), činidel štěpících Fmoc chránící skupinu (3) i reakčních časů nezbytných pro jednotlivé kondenzační stupně. Bohužel získávané multifunkční produkty představovaly s postupující syntézou poměrně komplexní směsi, z kterých bylo bez účinného čištění pomocí HPLC obtížné izolovat požadované produkty. Vysvětlení tohoto problému našel ve výpočetní studii dvou tetramerních struktur, která ukázala na problematickou funkci přítomného zbytku γ -aminomáselné kyseliny. V další části disertační práce se proto pokusil uspět s konvergentní strategií, spočívající v chemoselektivní ligaci předem připravených definovaných komponent – nosiče a glykopeptidového antigenu. Ani v tomto případě však jeho snaha a bezpochyby vynalézavý postup nevedly k cílovým produktům. Nakonec se však přece jen na P. Vepřeka usmálo štěstí a jeho enormní snaha byla korunována úspěchem. To, když přistoupil k přípravě tzv. comblike struktur, jejichž oligopeptidový řetězec tvořený zbytky Gly a Lys je na příslušných ϵ -amino skupinách acylován vhodnými antigenními strukturami odvozenými od Tn antigenu. Při jejich syntéze mistrovsky využil kombinace peptidové syntézy na pevné fázi s chemoselektivní ligační technikou a sloučeniny také řádně charakterizoval pomocí aminokyselinové analýzy, RP-HPLC a MALDI-TOF hmotové spektrometrie.

Zatímco MAG na biokompatibilním TentaGel-ovém polymeru byly studovány z hlediska jejich interakcí s monoklonálními protilátkami, inhibice agglutinační reakce a produkce specifických protilátek, u comblike MGA byla především testována vazebná afinita k lektinům, interakce s dalším typem monoklonální protilátky 83D4 a rovněž interace s NK receptory spolu s modulací cytotoxické aktivity NK buněk. V tomto ohledu je bezpochyby významným nálezem *in vivo* studie selektivní, dosud nejvyšší ligační aktivita tetra-acetylovaného trimerního Tn antigenu vůči NKR-PIB receptoru potvrzená *ex vivo* testy, v nichž stejná látka účinně inhibovala cytoxickou aktivitu NK buněk. Navíc při *in vivo* studii byl tetraacetylovaný comblike dendrimer s tridekapeptidovým insertem identifikován jako nejvhodnější kandidát pro vývoj syntetické vakcíny.

Práce je napsána jednoduchou, leč navýsost kultivovanou angličtinou, takže se výborně čte a připomíná tak detektivku Agathy Christie. Obsahuje drobné, avšak bezvýznamné překlepy, což platí rovněž o Souhrnu v českém jazyce, v něm se v obrázcích objevují, ze zřejmých důvodů, pozoruhodné kombinace s angličtinou.

Zajímalo by mě, zda-li a jaký je rozdíl mezi výrazy

MAG: Multiple antigenic glycopetides, v odstavcích 3.1.1., 3.1.2. a 3.3.1. a

MGA: Multiple glycopeptide antigens, pro comblike látky v odstavcích 3.2. a 3.3.2.

Nedílnou součástí této disertační práce jsou kopie tří příslušných publikací, které nahrazují její experimentální část. Jen mě překvapilo, že v této úpravě jsou přiloženy i kopie dvou přehledných článků pana disertanta, protože úvodní část disertace, částečně se kryjící s prvním článkem, je dostatečně rozsáhlá včetně citací a bohatě popisuje danou problematiku.

Podle mého názoru splňuje disertace Mgr. Pavla Vepřeka všechny nároky kladené na disertační práci i kriteria pro udělení příslušné vědecké hodnosti, což vřele a s plnou odpovědností doporučuji.

V Praze dne 15.11.2006


RNDr. Jan Hlaváček, CSc.