



## Oponentský posudek disertační práce

**Název práce:** Preparation of Influenza Neuraminidase and Polymerase Inhibitors

**Autor:** Mgr. Václav Zima

**Školitel:** Ing. Aleš Machara, Ph.D.

**Studijní program:** Organická chemie

**Pracoviště:** Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy

Předložená disertační práce Mgr. Zimy se zabývá návrhem, syntézou a *in vitro* hodnocením potenciálních inhibitorů neuraminidázy a RNA polymerázy. Práce tedy spadá do oblasti medicínské chemie, přičemž obecným cílem je hledání alternativních modulátorů chřipkového onemocnění. Autor si vytyčil hned několik dílčích záměrů, které jsou v práci na příslušném místě přesně definované: (i) modifikovat strukturu oseltamiviru v poloze C-5 s cílem vytvořit interakci s kavitou v blízkosti neuraminidázové katalytické domény, (ii) studovat inhibici PA podjednotky chřipkové polymerázy pomocí derivátů ze skupiny flavonoidů a příbuzných analog, (iii) připravit a modifikovat heterocyklické a peptidové inhibitory PA-PB1 protein-proteinové interakce, přičemž v druhém zmíněném případě se pokusit o následnou modifikaci směrem k vyšší stabilitě a permeabilitě příslušných oligopeptidů přes buněčnou membránu.

Celkový rozsah práce 218 stran, jednotlivé oddíly jsou dle mého názoru pečlivě a srozumitelně sepsány a jsou obsahově vyvážené. Značná část teoretické části je věnována popisu procesů souvisejících s funkcí chřipkového viru a možností modulace jeho životního cyklu, dále jsou shrnuty vybrané atributy modifikace peptidů a základní principy analytických metod, které jsou v práci používány k hodnocení připravených látek. Musím ocenit, že autor se zřejmě dobře orientuje v biochemickém a biologickém podstatě řešených projektů, přesto musím konstatovat, že na můj vkus byly informace v mnoha ohledech příliš detailní s přihlédnutím k tomu, že práce je z oboru organická chemie. Na druhou stranu je fakt, že předložené informace v některých ohledech umožnily pochopit racionální návrh struktury jednotlivých inhibitorů.

Těžištěm práce je diskuzní část, kde autor na šedesáti stranách předkládá výsledky vlastní výzkumné činnosti. Vzhledem k rozmanitosti a komplexnosti práce nepovažuji za vhodné rozepisovat se na tomto místě o konkrétních dosažených výsledcích, nicméně po prostudování diskuzní části jsem toho obecného názoru, že ve všech dílčích oblastech se Mgr. Zimovi podařilo systematickou, intenzivní a pečlivou prací získat řadu zajímavých a přínosných poznatků, byť některé výsledky zjevně nenaplnily očekávání, co se aplikačního potenciálu připravených látek týče. Protože charakter jednotlivých projektů je multidisciplinární, jsou v práci častokrát obsaženy i výsledky, které autor vlastní laboratorní činností nezískal, nicméně toto v daném případě nepovažuji za závadu i vzhledem ke skutečnosti, že Mgr. Zima příspěvky ostatních členů týmu na příslušných místech v diskuzní části přesně definoval.

Z předložené práce je zřejmé, že autorův přínos pro řešení vytyčených projektů byl klíčový. Velké množství odvedené syntetické práce je zřetelné z experimentální části, která zabírá i bez spekter úctyhodných 100 stran, je pečlivě sumarizovaná a obsahuje veškerá standardní analytická data získaná charakterizací syntetických intermediátů i finálních produktů. Na tomto místě bych



ovšem doporučil poskytnout formou elektronické přílohy i samotná NMR spektra, tak jak je v současnosti zvykem při zveřejňování originálních výsledků z oblasti organické syntézy.

Dle mého názoru představuje předložená disertační práce velmi kvalitní dílo, které jednoznačně rozšiřuje poznání v dané oblasti. Toto tvrzení lze dokumentovat mimo jiné faktem, že vybrané výsledky byly již zveřejněny v respektovaných odborných časopisech z oblasti medicínální chemie a další sdělení budou bezpochyby následovat po dopracování projektu zabývajících se oligopeptidy. Domnívám se, že autor nade vše pochybnost prokázal schopnost systematicky a týmově pracovat na komplexních multidisciplinárních projektech, výsledky své práce kriticky analyzovat, prezentovat a věcně diskutovat. Z výše uvedených důvodů **doporučuji práci k obhajobě** a udělit autorovi titul vědeckou hodnost Ph.D.

#### ***Dotazy a náměty k diskuzi:***

- 1) Prosím specifikujte zdroj pro své tvrzení na straně 20: „They (flavonoids) are a natural part of human diet and their daily dose is approximately 1 gram (flavonoids or their glycosides)“. Dle mého názoru se toto tvrzení dosti rozchází s často uváděnými statistickými údaji, viz. např. i informace nalezená přímo v citované literatuře (ref. 52).
- 2) Obecně kladným rysem celé práce je snaha o racionální design cílových derivátů. V tomto ohledu ale vybočuje na str. 43 docela vágní kritérium pro výběr anilinů „The 150-cavity is hydrophobic in nature therefore a set of differently substituted anilines...“, přičemž při pohledu na jednotlivé vybrané deriváty je obtížné pochopit, jakým způsobem byly – vzhledem k širokému spektru dostupných anilinů - vybrány zrovna tyto. Prosím vysvětlete.
- 3) K přípravě sloučeniny **41** byl použit roztok dimethylaminu v dichlormethanu, což není konvenční rozpouštědlo pro daný účel. Proč byl použit DCM a jaká je rozpustnost dimethylaminu v tomto rozpouštědle?
- 4) V Tabulce 1 na straně 46 vykazují některé hodnoty relativně vysoké odchylky, někdy až ca 30% nebo více. Kolik měření bylo v rámci každé látky provedeno? Jaká je při tomto testu akceptovatelná hodnota odchylky, aby bylo měření považováno ještě za validní?
- 5) Prosím vysvětlete nízké výtěžky u sloučenin **75** a **76**. V případě tetramethylderivátu **75** lze předpokládat, že mohl být kontaminován sloučeninou **76** a tudíž byla separace náročná, avšak jaká je příčina omezeného výtěžku **76**? Mimochodem, uvedená hodnota výtěžku pro **76** se v diskuzní a experimentální části liší.
- 6) Flavonoidy a aza-flavonoidy (hydroxychinolony – 3HQ) jsou vzájemně bioisosterní, tudíž s očekávatelnou analogií týkající se jejich interakce s biologickými cíli. V souladu s tím jsou i data



uvedená data v tabulce 3. Co tedy přesně bylo motivací k zahrnutí 3HQs do studie? Existují nějaké precedenty v literatuře deklarující rozdílné biologické vlastnosti flavonoidů vs. 3HQ analogů.

7) Dovolil bych si podobnou otázku jako v bodě 2): s přihlédnutím k široké plejádě možných aminů, podle jakého klíče byly vybrány aminoderiváty ve Schematu 11 (str. 58)? Později u této série zmiňujete nízkou rozpustnost, která mohla být důvodem omezené aktivity. A tvrdíte, že některé deriváty z druhé série mají zvýšenou rozpustnost. Můžete prosím tato tvrzení upřesnit?

8) Na straně 75 zmiňujete metodu štěpení Fmoc-protektivní skupiny pomocí DMAP. Jaká je výhoda této metody oproti použití jiných bází? Proč nebyla použita silnější nukleofilní báze (aby nebylo třeba izolovat amin před acetylací), která by umožnila zkrátit reakční čas?

9) V kapitole 3.3.6. se věnujete přípravě stapled peptides, které by měly nuceně zaujímat helikální 3D architekturu. Lze toto prostorové uspořádání prokázat experimentálně? Pokud ano, prosím demonstруйте na nějakém příkladu. Co lze vydedukovat z hodnot v Tabulce 8, když „sešité“ analogy mají vyšší  $IC_{50}$  než výchozí peptid?

10) Strategie použití CPP má tři fáze: transport do buněk, reduktivní otevření cyklu a interakci s biologickým cílem. Poslední zmíněná fáze byla v práci hodnocena s použitím AlphaScreen testu. Je možné nějakým způsobem experimentálně sledovat průběh prvních dvou kroků...?

11) V peptidových syntézách používáte jako činidlo pro tvorbu amidů TBTU. Má tato technika nějaké výhody ve srovnání s HOBt/DIC(DCC) aktivací?

12) Při syntéze na pevné fázi používáte Rinkův amidický linker, čímž generujete výsledný peptid vždy jako amid. Má toto nějaký význam ve srovnání s alternativní variantou COOH? Jaké alternativní linkery by mohly být použity pro přípravu peptidů jako karboxylových kyselin a jaké jsou výhody/nevýhody těchto linkerů?

13) Prosím navrhnete reakční mechanismus štěpení acetamidomethylové skupiny z cysteinu pomocí octanu rtuťnatého. Jaká je stabilita této protektivní skupiny a z toho vyplývající orthogonalita s jinými protektivními skupinami používanými v SPPS?

14) Na závěr práce bych uvítal kromě stručného přehledu dosažených výsledků také konkrétnější výhled do budoucna. Jak mohou být dále využity poznatky získané v rámci např. oligopeptidických inhibitorů?

doc. RNDr. Miroslav Sural, Ph.D.  
Katedra organické chemie  
PřF UP Olomouc

V Olomouci 25. 3. 2021