

Oponentský posudek doktorské disertační práce RNDr. Lucie Brulíkové s názvem „ Synthesis, reactivity nad biological activity of C-5 substituted uracil analogues“

Předložená disertační práce je typickou studií vztahu struktura - biologická aktivita, a to zejména v té první nejpodstatnější části věnované derivátům 5-methyluracilu, které byly připraveny jako potenciální antivirotika. Klíčovou sloučeninou byl 5-[(chlor(4-nitrofenyl)]uracil, ze kterého byla nukleofilní substitucí připravena řada 5-[(alkoxy(4-nitrofenyl)]uracilů. Celkem bylo testováno 18 sloučenin ve formě racemátů. Z nich bylo poté syntetisováno 13 odpovídajících diastereoisomerních ribonukleosidů a ty 4 s nejvyšší cytotoxickou aktivitou proti nádorovým liniím byly připraveny v opticky čisté formě. Vyhodnocení aktivity ukázalo závislost účinku na délce alifatického řetězce a jen nepatrný vliv cukerné části či konfigurace. Další studovanou skupinou byly 5-alkoxymethyluracily a z nich odvozené ribonukleosidy v celkovém počtu 30 sloučenin. Jako perspektivní struktura byl vybrán 5-(2,3-dihydroxy-1-propoxy)methyluracil, jehož sekundární hydroxylová skupina byla esterifikována, ale reakce s fosfonáty byl neúspěšná. Opět se ukázalo, že aktivita odvozených nukleosidů nebyla vyšší. Za důležitý závěr považuji, že cytotoxická aktivita uracilů obsahujících 4-nitrofenylskupinu byla vyšší než alkokymethyluracilů a že se tedy rysuje vhodný strukturní motiv pro další studium. Ve druhé, poněkud nesourodé, části disertace se RNDr. Brulíková zabývala syntesou modifikovaných oligodeoxynukleotidů. Základním strukturním motivem byl uracil, ke kterému byl v poloze 5 připojen přes triazolový můstek 4-substituovaný fenyl. Byly testovány oba syntetické postupy, jak modifikace nukleosidu tak připojení nukleobáze k 2-deoxyribose. Stabilita vybraných oligonukleotidů byla ověřena hybridizačními experimenty, které doložily destabilizaci jak DNA tak RNA duplexů.

Předložená disertační práce tak prezentuje důležité poznatky zejména pro studium vlivu struktury na biologickou aktivitu, ze kterých vyplynuly potenciálně zajímavé nové typy sloučenin. Doktorandka odvedla velký objem experimentální práce, i když z pohledu organické chemie není disertace převratnou novinkou. Oceňuji velmi účinnou spolupráci s biologickým pracovištěm, která umožnila systematický průzkum aktivity desítek připravených sloučenin. Výsledky byly průběžně uveřejněny formou původních článků v respektovaných časopisech, tedy o jejich vědecké kvalitě není pochyb. Cíle disertační práce byly jasně splněny.

Ke kvalitě disertační práce mám řadu připomínek jak po formální tak věcné stránce. Práce je předložena v angličtině, což považuji za pozitivní. Je sepsána přehledně a ve velmi pěkné grafické úpravě. Text je dobře srozumitelný, teoretická část dává dobrý přehled o způsobech opracování základního uridinového skeletu a biologických aktivitách takto připravených látek. Tím více ovšem vystupuje do popředí nesourodost kapitoly výsledky a diskuse a část věnovaná analogům oligonukleotidů prostě do práce nezapadá.

Disertační práce v podstatě obsahuje všechny předepsané kapitoly. Název kapitoly 1.2 Synthesis není úplný, kapitola 1.1 chybí zcela a rovněž názvy podkapitol 1.2.x nejsou nejpřesnější. V práci každá kapitola končí závěrem a jako poslední kapitola je Summary, tedy souhrn, namísto správného závěru. Občas se v textu vyskytuje prohrěšek proti názvosloví (s. 11, halogenalkyl; s. 22, bromvinyluracil; s. 31, phosphorylation (?); s. 52, sulphate; s. 81 a jinde, silylated; a další), někde jsou závorky v názvu navíc (s. 50) a židličky na s. 32 nevypadají dobře. Kritiku si zaslouží i číslování sloučenin, které díky zařazení schémat občas přeskakuje a v kapitole o oligonukleotidech náhle číslování končí a objevují se zkratky převzaté pravděpodobně z laboratorního deníku. Na s. 59 má být „silylované deriváty **191**“ a ne **192**, na s. 69 cílový fosfonát je **203** a ne **210**.

K následujícím věcným připomínkám požaduji podrobné odpovědi a komentář doktorandky.

1. Jak si má oponent vysvětlit poznámku na s. 45, že syntéza derivátu **173** a **177a-h** byla zmíněna v příloze k rigorózní práci? V jakém časovém období byla tato disertace vypracována?

2. Na s. 44 je konstatováno, že reprodukováním literárního postupu dle odkazu 51 byl připraven chlórderivát **173** a ne v publikaci uváděný hydroxyderivát **172**. Ve skutečnosti ale postup z literatury nebyl reprodukován, protože byla vynechána neutralizace a pravděpodobně při této

operaci dochází k hydrolyze látky **173** na **172**. Ostatně tak také doktorandka látku **172** sama připravila. Navíc chlorid je dobře odstupující skupina při nukleofilních substitucích, čili získání látky **173** bylo vlastně výhodné. V doktorské práci bych očekávala odbornější hodnocení situace.

3. V celé práci pociťuji nedostatky v identifikaci látek. Pro drtivou většinu připravených látek je uváděno pouze ^1H NMR a MS spektrum. Možná je to tak dobře, pokud už byly látky dříve popsány a data slouží pouze ke srovnání. To se ale z textu poznat nedá. Tak například na s. 52 se dočtu, že nukleosidy **184j-1** a **183o** (správně má asi být **184o**) byly připraveny poprvé. Znamená to, že ty ostatní už byly v literatuře popsány? Kde jsou odkazy? Kde je srovnání jejich fyzikálně-chemických dat? V experimentální části jsou všechny charakterizovány stejně a to pomocí ^1H NMR a MS spektra. Úplně stejná situace se opakuje na s. 58 a 59 s 5-alkoxymethyluracily **185** a na s. 59 s nukleosidy **186**, z nichž některé už podle doktorandky připraveny byly. Opět žádný odkaz na literaturu, žádné porovnání spekter. Dokonce ani příprava těch popsáných není v experimentální části uvedena. Doktorandka musela mít v ruce několik desítek publikací, takže by měla vědět, jak se popisuje synthesisa již dříve publikované látky a jak se tato látka charakterizuje. Poněkud zmatený text tak nedává příliš možností oponentovi posoudit, jaká je, jak se dnes s oblibou říká, přidaná hodnota této disertace v syntetické části.

4. Látka **204** (s. 70) byla identifikována jako *N*-isomer místo očekávaného *O*-isomeru a to pomocí ^1H NMR spektra. Ráda bych se dověděla více podrobností o této identifikaci.

Závěr

Na disertační práci RNDr. Lucie Brulíkové vysoce hodnotím komplexní přístup zahrnující organickou synthesisu na straně jedné a biologické testy na spolupracujícím pracovišti na straně druhé. Doktorandka prokázala, že pilně v laboratoři pracovala, že umí analyzovat informace z literatury a je schopna samostatné vědecké práce. Bohužel ale vlastní disertační práci už tak nadšena nejsem a jen doufám, že si z mých připomínek vezme ponaučení. Nicméně u mě převažuje kvalita výsledků, proto podle §47, odst. 4, zákona č. 111/1998 Sb. doporučuji přijmout disertační práci RNDr. Brulíkové obhajobě.

V Praze dne 1. dubna 2011

Prof. Ing. Jitka Moravcová, CSc.