

V Bratislave, 14. augusta 2017

OPONENTSKÝ POSUDOK DIZERTAČNEJ PRÁCE

Univerzita: Univerzita Karlova v Prahe

Fakulta: Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra farmaceutickej chémie a farmaceutickej analýzy

Študijný odbor: Farmaceutická chémia

Kandidát: Mgr. Lucia Semelková

Názov dizertačnej práce: Příprava derivátů pyrazínu jako potenciálních antituberkulotik (studium vztahů mezi chemickou strukturou a biologickou aktivitou)

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

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

Primárnym leitmotívom dizertačnej práce pani Mgr. Lucie Semelkovej je príprava, hodnotenie biologického pôsobenia a formulovanie vzťahov „štruktúra–aktivita“ zlúčenín, ktoré sú štruktúrne odvodené od pyrazínu (pyrazínamidu).

Po formálnej stránke je dizertačná práca tvorená 170 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. Lucia Semelková tiež vyjadruje poďakovanie kolegom z Katedry farmaceutickej chémie a farmaceutickej analýzy a aj jej ďalším mimokatedrovým, resp. mimofakultným spolupracovníkom, ktorí participovali pri riešení čiastkových výskumných úloh.

Dizertačná práca Mgr. Lucie Semelkovej vznikla s podporou niekoľkých grantových projektov (6); v grantoch GAUK 1594214 B-CH/FaF a GAUK 710312 B-CH/FaF 2012–2014 kandidátka figurovala ako riešiteľka (spoluriešiteľka).

Ciele dizertačnej práce sú jednoznačne a jasne formulované v kapitole 1 *Cíl práce* a spočívajú v (i) príprave nových originálnych derivátov pyrazínu (pyrazínamidu), (ii) hodnotení biologického (antimykobakteriálneho, antibakteriálneho, antifungálneho, cytotoxického, antivirotického a herbicídneho) pôsobenia pripravených zlúčenín a v (iii) štúdiu vzťahov „štruktúra–aktivita“ (*SAR*). Súčasťou tejto kapitoly sú aj prehľadne znázornené príslušné cieľové štruktúry, ktoré sú v ďalšej časti textu zaradené do skupín (sérií) 1–4.

Kapitola 2 *Současný stav poznání* je venovaná stručnej epidemiológii a incidencii tuberkulózy (TBC; 2.1 *Tuberkulóza*), charakterizácii *Mycobacterium tuberculosis*, obligátne aerobnému grampozitívnemu acidorezistentnému patogénu a možnostiam antiTBC-terapie (2.2 *Terapie*), v ktorých sú uvedené liečivá 1. línie (isoniazid, rifampicín, etambutol), 2. línie (streptomycín, fluórchinolóny, kyselina *p*-aminosalicylová, etiónamid, *D*-cykloserín a kapreomycín), resp. novopoužívané liečivá (betachilín, delamanid a pretomanid).

Osobitná pozornosť je sústredená na pyrazínamid (PZA; 2.3 *Pyrazinamid*), na nešpecifické a aj špecifické mechanizmy jeho antituberkulotického pôsobenia, resp. na potenciálne enzymatické ciele derivátov PZA (syntáza mastných kyselín I, enoyl-ACP-reduktáza, ribozomálny proteín S1, aspartátdekarboxyláza a dekaprenylfosforyl- β -*D*-ribózaoxidáza).

Výsledky dizertačnej práce sú prehľadne koncipované vo forme komentára (*3 Komentár dosažených výsledkov*), ktorý pozostáva z grafického (tabuľkového) prehľadu pripravených zlúčenín (*3.1 Prehľad pripravených zlúčenín*), zo syntetických postupov (*3.2 Syntéza*), z hodnotenia antimykobakteriálnej (testované boli 4 kmene), antibakteriálnej (8 kmeňov), antifungálnej (8 kmeňov), cytotoxickej (použité boli bunkové línie HeLa a Vero), antivirotickej (testovaná bola skupina 19 vírusov) a herbicídnej aktivity (použité boli chloroplasty špenátu *Spinacia oleracea* L.) pripravených molekúl, z formulovania SAR-vzťahov (*3.3 Hodnotenie biologickej aktivity*) a z molekulovomodelovacích (dockingových) štúdií proti dvom enzýmom – enoyl-ACP-reduktáze a dekaprenylfosforyl- β -D-ribózooxidáze (*3.4 Docking*).

Autorka dizertačnej práce v diskusii o výsledkoch zohľadňuje jednotlivé série pripravených derivátov. Hodnotenú zlúčeninu boli rozdelené do niekoľkých sérií, a to 1 (*N*-alkyl-3-chlórpyrazín-2-karboxamidy a *N*-alkyl-3-(alkylamino)pyrazín-2-karboxamidy; 30 zlúčenín), 2 (*N*-benzyl-3-chlórpyrazín-2-karboxamidy a *N*-benzyl-3-(benzylamino)pyrazín-2-karboxamidy; 23 zlúčenín), 3 (3-(fenylkarbamoyl)pyrazín-2-karboxylové kyseliny a ich estery; 47 zlúčenín) a 4 (*N*-alkyl-3-aminopyrazín-2-karboxamidy, 3-amino-*N*-fenylpyrazín-2-karboxamidy a 3-amino-*N*-benzylpyrazín-2-karboxamidy; 20 zlúčenín).

V závere dizertačnej práce (kapitola 4 *Záver*) sú sumarizované najvýznamnejšie zistenia, nové originálne poznatky a prínosy autorky pre rozvoj vedeckej disciplíny spolu s uvedením najperspektívnejších zlúčenín, ktoré sú charakterizované relevantnými údajmi z biologického hodnotenia.

V dizertačnej práci je prezentovaný zoznam pôvodných vedeckých experimentálnych prác autorky spolu s jej konkrétnou participáciou na príslušnom publikačnom výstupe (*5 Seznam publikovaných prác*).

Možno konštatovať, že doterajšia publikačná aktivita Mgr. Lucie Semelkovej je vynikajúca – je prvou autorkou, resp. spoluautorkou troch publikácií v renomovanom karentovanom, resp. impaktovanom časopise *Molecules* a aj publikácie, ktorá bola poslaná na recenziu v časopise *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. Mgr. Lucia Semelková je tiež autorkou niekoľkých prednášok (3), posterových príspevkov (8) na národných a medzinárodných vedeckých konferenciách a riešiteľkou grantových projektov Grantovej agentúry Univerzity Karlovej (2).

Pri koncipovaní kapitol 1–4 bolo citovaných 103 literárnych a internetových zdrojov (*6 Seznam použité literatury*).

Prílohy tvoria autorkine publikácie (*7 Seznam príloh*), ktorých obsah je diskutovaný v príslušných častiach dizertačnej práce (prílohy P1 a P2), resp. sú to doposiaľ nepublikované údaje (prílohy P3 a P4).

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

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

- Považujem za vhodné úplné slovné pomenovanie kapitol 2.4.1–2.4.5 (str. 32–38).
- V dizertačnej práci uvádzate slovné vyjadrenie (kvantifikáciu) *in vitro* antimykobakteriálnej aktivity hodnotených zlúčenín a definujete intervaly jej jednotlivých „stupňov“, t.j. nízku, strednú a vysokú aktivitu (MIC) vyjadrenú v jednotkách $\mu\text{g/ml}$ (str. 45). Aký publikačný zdroj ste využili ako „vzor“ pre takéto delenie?

Považoval by som za výhodné, ak by ste aj pri *in vitro* hodnotení antibakteriálneho (str. 51) a antifungálneho (str. 53) pôsobenia testovaných zlúčenín definovali tieto termíny v texte dizertačnej práce v jednotkách $\mu\text{g/ml}$ a/alebo $\mu\text{mol/l}$.

1. Biologické hodnotenie zlúčenín zo série 2 (*N*-benzyl-3-(benzylamino)pyrazín-2-karboxamidy), ktoré majú vo svojej štruktúre a) $R^1=R^2=2\text{-CH}_3$ alebo b) $R^1=R^2=3,4\text{-diCl}$, dokázalo ich porovnateľnú *in vitro* účinnosť proti virulentnému kmeňu *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇R_v napriek prítomnosti kvalitatívne odlišných substituentov R^1 a R^2 (tabuľka 4, str. 49) z pohľadu ich elektrónových, sterickejch a lipofilných vlastností. V dizertačnej práci uvádzate veľmi zaujímavé molekulo-modelovacie štúdium interakcií derivátu obsahujúceho $R^1=R^2=3,4\text{-diCl}$ a enoyl-ACP-reduktázy (str. 56).

Aký typ interakcií s efektorovými miestami tohto enzýmu, resp. (všeobecne s patogénom) *M. tuberculosis* H₃₇R_v by ste predpokladali v prípade zlúčeniny, ktorá má $R^1=R^2=2\text{-CH}_3$?

2. Niektoré deriváty zo súboru 2 (*N*-benzyl-3-(benzylamino)pyrazín-2-karboxamidy) vykazovali tiež veľmi sľubný *in vitro* potenciál proti grampozitívnemu kmeňu *Staphylococcus aureus* CCM 4516/08 (tabuľka 5, str. 53). Sú to molekuly, ktoré obsahovali a) $R^1=\text{Cl}$, $R^2=\text{H}$ (pre takto substituovanú zlúčeninu bola stanovená hodnota $\text{MIC}=7,81 \mu\text{mol/l}$) alebo b) $R^1=R^2=4\text{-OCH}_3$ ($\text{MIC}=15,62 \mu\text{mol/l}$).

2A. Aké interakcie s efektorovými miestami *Staphylococcus aureus* CCM 4516/08, t.j. aký mechanizmus antibakteriálneho pôsobenia, by ste predpokladali v prípade týchto dvoch molekúl?

2B. Aký vplyv by mohla mať prítomnosť 2-Cl-substituenta na rotáciu väzby $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-C}_{\text{Alif}}$ v 2-chlórbenzylaminokarbonylovom fragmente, resp. na priestorové usporiadanie v tejto časti molekuly?

2C. Boli pripravené a *in vitro* testované polohové izoméry, ktoré obsahovali 3- alebo 4-chlórbenzylaminokarbonylovú skupinu?

3. Zlúčenina zo série 4 (3-amino-*N*-fenylpyrazín-2-karboxamidy), v ktorej štruktúre $R^1=2,4\text{-diOCH}_3$, vykazovala proti *M. tuberculosis* H₃₇R_v hodnotu $\text{MIC}=12,5 \mu\text{g/ml}$ (Príloha P4, tabuľka 1, str. 163) a jej *in vitro* účinnosť bola vyššia ako v prípade 4-CF₃- a aj 3,4-diCl-substituovaného derivátu.

Bolo by možné podľa Vašich doterajších poznatkov zovšeobecniť SAR-hodnotenie z pohľadu vhodnosti/nevhodnosti výberu elektrónodorných skupín, ktoré sú viazané na aromatický systém?

V skupine „štruktúrne podobných“ substituovaných salicylanilidov bol pri ich *in vitro* testovaní pozorovaný skôr opačný trend, t.j. s preferenciou výberu lipofilných elektrónakceptorých substituentov.

4. Mohli by ste podľa stanovených hodnôt IC_{50} (*in vitro* testovanie bolo vykonané na HepG2-bunkovej línii) uvažovať o 3-amino-*N*-(4-trifluórmetylfenyl)piperazín-2-karboxamide (séria 4; tabuľka 6, str. 55) ako o perspektívnom cytostatiku (antiproliferatívne pôsobiacej zlúčenine)? Plánujete pokračovať v testovaní tohto derivátu na iných bunkových líniiach?

Sú známe také deriváty pyrazínu (pyrazinamidu), ktoré boli pripravené na Vašej katedre a ktoré možno považovať za vhodné predlohové štruktúry pre projekciu originálnych cytostatík (resp. antiproliferatívne pôsobiacich liečiv)?

Ciele dizertačnej práce, prezentované v kapitole 1 *Cíl práce*, boli jej predkladateľkou realizované komplexne a úplne. Z dizertačnej práce a aj z publikačných výstupov uverejnených v renomovanom karentovanom, resp. impaktovanom časopise *Molecules*, v ktorých je Mgr. Lucia Semelková prvou autorkou (2), resp. spoluautorkou (1), vyplýva, že vie komplexne analyzovať problém, navrhnuť jeho riešenie s použitím moderných metód a postupov a komplexne vyhodnotiť získané výsledky.

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