

**Závěrečná zpráva projektu specifického výzkumu
zakázka č. 2102 /2022**

Název projektu: Heteroaromatické molekuly ovlivňující lidské enzymy

Specifikace řešitelského týmu

Odovědný řešitel: Mgr. Karolína Knittelová, prof. PharmDr. Kamil Musílek, Ph.D.

Studenti doktorského studia na UHK: Mgr. Karolína Knittelová, Mgr. Zuzana Kohoutová, Mgr. Eliška Prchalová, Mgr. Petra Lišková (ukončila studium v srpnu 2022), Mgr. Radomír Jůza

Studenti magisterského studia na PŘF UHK: Bc. Michaela Dohnalová, Bc. Eliška Hančová, Bc. Tereza Hofmanová, Bc. Eliška Horáková, Bc. Tereza Langerová, Bc. Zdeňka Neuerová, Bc. Denisa Nosková, Bc. Gabriela Nosková, Bc. Lucie Odstrčilová, Bc. Lukáš Fresser, Bc. Barbora Křížová, Bc. Sára Rademacherová

Další výzkumní pracovníci: PharmDr. Rudolf Andrýs, Ph.D., RNDr. Dávid Maliňák, Ph.D., prof. PharmDr. Kamil Musílek, Ph.D., RNDr. Miroslav Psoška, Ph.D., PharmDr. Adam Skarka, Ph.D., Ing. Jana Svobodová, Ph.D.

Celková částka přidělené dotace: 674 380,00 Kč

Datum zahájení řešení projektu: 1. 3. 2022

Datum ukončení řešení projektu: 30. 11. 2023

Stručný popis postupu při řešení projektu (max. 2 strany).

Projekt specifického výzkumu byl zaměřen na zkoumání heteroaromatických molekul, které mají schopnost ovlivňovat lidské enzymy. Nejvíce studovaným enzymem byly lidská cholinesterasa, a to konkrétně její dva typy – acetylcholinesterasa (AChE) a butyrylcholinesterasa (BChE). AChE štěpí acetylcholin, BChE, je nespecifická esterasa štěpící přírodní i uměle připravené esterové molekuly. Tyto enzymy mohou být různě inhibovány, například organofosforovými sloučeninami (OP). Aktivita enzymu může být obnovena po podání tzv. reaktivátorů. Nejznámější, a v lékařské praxi používané, AChE reaktivátory jsou pralidoxim (2-PAM), obidoxim (LüH-6) a asoxim (HI-6). Společným znakem pro tyto sloučeniny je přítomnost heteroaromatického kruhu, oximové části molekuly a trvalého kladného náboje.

V rámci projektu byly připraveny nové heteroaromatické molekuly, které byly navrženy na základě struktur již známých reaktivátorů cholinesteras. Nové sloučeniny byly připraveny a purifikovány pomocí metod organické chemie. Struktura a čistota připravených molekul byla stanovena pomocí ^1H a ^{13}C NMR a potvrzena analytickou metodou HPLC-MS. Pro přesné určení hmoty byla použita HRMS analýza. U sloučenin izolovaných jako pevné látky byla změřena teplota tání. Rozpustnost (mg/ml; logS) byla stanovena pomocí nefelometrického měření. Stabilita nově připravených molekul byla určena po inkubaci v různých systémech voda/pufr/lidská plazma. Měření $\text{p}K_a$ bylo provedeno spektrofotometricky pomocí pufrů daného pH v rozsahu 3-12 a hodnoty $\text{p}K_a$ vypočteny ze závislosti absorbance disociované formy látky na hodnotě pH.

Po základní charakteristice fyzikálně-chemických vlastností nových heteroaromatických molekul jsme přistoupili k *in vitro* testování. Byly změřeny hodnoty IC_{50} pro studované cholinesterasy, byl proveden reaktivační screening a studována reaktivační kinetika. Aktivita enzymu byla sledována pomocí modifikované Ellmanovy metody. Výsledky *in vitro* testování byly srovnávány se standardy známých reaktivátorů cholinesteras (2-PAM, LüH-6, HI-6). Výsledky pak byly použity pro studium vztahů mezi strukturou a aktivitou pro nově připravené molekuly.

Diplomové práce studentů pracujících na projektu byly zaměřeny na organickou syntézu nebo analytický výzkum heteroaromatických molekul a v roce 2022 (8) nebo 2023 (1) byly úspěšně obhájeny.

Splnění cílů řešení a přínos projektu.

Cíle projektu byly splněny. Úspěšně byla syntetizována série heteroaromatických molekul, byla provedena jejich analýza a testování jejich aktivity. Byla provedena studie na heteroaromatické molekuly a jejich ovlivňování aktivity lidského enzymu cholinesterasy. Diplomové práce studentů pracujících na projektu byly úspěšně obhájeny, výsledky studie se zaměřením na lidské enzymy byly publikovány v impaktovaných časopisech.

Přínosem projektu byla syntéza nových molekul, jejich charakteristika fyzikálně-chemických vlastností a *in vitro* stanovení inhibiční a reaktivační aktivity. Porovnání vztahů mezi strukturou a aktivitou je přínosné pro design dalších molekul, které tak mohou různým způsobem modulovat aktivitu vybraných enzymů.

Splnění kontrolovatelných výsledků řešení.

Uveďte jen výstupy, které vznikly na základě řešení tohoto projektu. Dále uveďte, zda byly publikace skutečně zadány do OBD s vazbou na RIV. U výstupů Jimp a Jsc uveďte do závorky plánovaný a skutečný kvartil časopisu.

Publikované články v časopisech typu Jimp (studenti zvýraznění):

Juza, R.; Musilek, K.; Mezeiova, E.; Soukup, O.; Korabecny, J. Recent Advances in Dopamine D2 Receptor Modulators in the Treatment of Neuropsychiatric Disorders. *Medicinal Research Reviews*. **2023**, vol. 43, no. 1, p. 55-211. <https://doi.org/10.1002/med.21923> IF₂₀₂₂ = 13.3 (Jimp WoS D1/Q1 4/70 Medicinal Chemistry, D1/Q1 21/366 Pharmacology & Pharmacy)

Kozlov, O.; **Horakova, E.**; **Rademacherova, S.**; Malinak, D.; Andrys, R.; **Prchalova, E.**; Lisa, M. Direct Chiral Supercritical Fluid Chromatography – Mass Spectrometry Analysis of Mono- And Diacylglycerol Isomers for the Study of Lipase-Catalyzed Hydrolysis of Triacylglycerols. *Analytical Chemistry*, **2023**, vol. 95, no. 11, p. 5109–5116. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c00053> IF₂₀₂₂ = 7.4 (Jimp WoS D1/Q1 6/99 Analytical Chemistry)

Prchalova, E.; Sukupova, M.; Malinak, D.; Andrys, R.; Sivak, L.; Pekarik, V.; Skarka, A.; Svobodova, J.; Prchal, L.; **Fresser, L.**; Heger, Z.; Musilek, K. BODIPY-labelled acetylcholinesterase reactivators can be encapsulated into ferritin nanovehicles for enhanced bioavailability in the CNS. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. **2023**, vol. 167. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115490> IF₂₀₂₂ = 7.5 (Jimp WoS Q1 16/190 Research & Experimental Medicine, Q1 24/366 Pharmacology & Pharmacy)

Připravované články do časopisů typu Jimp (studenti zvýraznění):

Vishakantegowda, A.G.; Andrys, R.; Jonczyk, J.; Oh, E.H.; Chrienova, Z.; Malinak, D.; **Prchalova, E.**; **Knittelova, K.**; Skarka, A.; Schmidt, M.; Latka, K.; Malawska, B.; Jung, Y.-S.; Bajda, M.; Musilek, K. Virtually identified 5-substituted pyridinium oximes are excellent reactivators of NEMP inhibited acetylcholinesterase. *Journal of Medicinal Chemistry*, under preparation. (Jimp WoS D1/Q1 3/72 Medicinal Chemistry)

Prezentované práce (studenti zvýraznění):

K. Knittelova, D. Malinak, R. Andrys, and K. Musilek, "NOVEL MODIFIED PRALIDOXIME DERIVATES AS POTENTIAL REACTIVATORS OF ORGANOPHOSPHATE-INHIBITED CHOLINESTERASES," the 27th Interdisciplinary Toxicology Conference, TOXCON 2022 Hradec Králové 29.8–1.9. 2022, MMSL 91 (Suppl.1), 43 (2022).

Z. Kohoutova, D. Malinak, **T. Hofmanova**, R. Andrys, L. Prchal, J. Svobodova, and K. Musilek, "SYNTHESIS AND IN VITRO EVALUATION OF NON-SYMMETRICAL MONOQUATERNARY AMMONIUM SALTS AS POTENTIAL REACTIVATORS OF INHIBITED CHOLINESTERASES," the 27th Interdisciplinary Toxicology Conference, TOXCON 2022 Hradec Králové 29.8–1.9. 2022, MMSL 91 (Suppl.1), 44 (2022).

E. Prchalova, D. Malinak, J. Svobodova, **L. Fresser**, R. Andrys, Z. Heger, and K. Musilek, "IN VITRO EVALUATION OF BODIPY LABELED BISQUATERNARY AMONIUM SALTS USED AS REACTIVATORS OF INHIBITED ACETYLCHOLINESTERASE," the 27th Interdisciplinary Toxicology Conference, TOXCON 2022 Hradec Králové 29.8–1.9. 2022, MMSL 91 (Suppl.1), 65 (2022).

K. Knittelova, D. Malinak, R. Andrys, K. Musilek, Novel modified pralidoxime derivates as potential reactivators of organophosphateinhibited cholinesterases, 74. sjezd chemikov, Olomouc 4.-7.9.2022, Czech Chem. Soc. Symp. Ser. 20, 179–314 (2022). poster 4P-04

Z. Kohoutova, D. Malinak, **T. Hofmanova**, R. Andrys, L. Prchal, J. Svobodova, K. Musilek, Synthesis and in vitro evaluation of nonsymmetrical monoquaternary ammonium salts as potential reactivators of inhibited cholinesterases, 74. sjezd chemikov, Olomouc 4.-7.9.2022, Czech Chem. Soc. Symp. Ser. 20, 179–314 (2022). poster 4P-05

E. Prchalova, D. Malinak, J. Svobodova, **L. Fresser**, R. Andrys, Z. Heger, K. Musilek, In vitro evaluation of bodipy labeled bisquaternary amonium salts used as reactivators of inhibited acetylcholinesterase, 74. sjezd chemikov, Olomouc 4.-7.9.2022, Czech Chem. Soc. Symp. Ser. 20, 179–314 (2022). poster 4P-11

K. Knittelova, D. Malinak, R. Andrys, K. Musilek, Substitution on pralidoxime affects its reactivation activity to organophosphate inhibited cholinesterases, 14th International Meeting on Cholinesterases and the 8th International Conference on Paraoxonases (ChePon2022), Boloña Itálie 18.9-21.9. 2022, Abstract book, p. 76., poster 19

Z. Kohoutova, D. Malinak, **T. Hofmanova**, R. Andrys, L. Prchal, J. Svobodova, K. Musilek, Synthesis and in vitro evaluation of monoquaternary analogues of oxime K203 as potential reactivators of inhibited cholinesterases, 14th International Meeting on Cholinesterases and the 8th International Conference on Paraoxonases (ChePon2022), Boloña Itálie 18.9-21.9. 2022, Abstract book, p. 77., poster 20

E. Prchalova, D. Malinak, J. Svobodova, **L. Fresser**, R. Andrys, Z. Heger, K. Musilek, In vitro evaluation of BODIPY labelled oxime reactivators of acetylcholinesterases, 14th International Meeting on Cholinesterases and the 8th International Conference on Paraoxonases (ChePon2022), Boloña Itálie 18.9-21.9. 2022, Abstract book, p. 69., poster 12

Tab. 1 Sumář výstupů řešení projektu

Typ výstupu	Plán	Skutečnost	Poznámka
Jimp (databáze WoS)*	4	3 (2×D1, 1×Q1 dle AIS)	1 Jimp v přípravě
Jsc (databáze Scopus)			
B (recenzovaná odborná kniha) **			
C (kapitola v recenzované odborné knize)**			
D (článek ve sborníku ve WoS, Scopus)			
P (patent)			
Počet obhájených dizertačních prací	0	1	
Počet obhájených diplomových prací	9	9	
Počet výsledků	13	13	

Ke zprávě přiložte:

- a) výpis z OBD – výstupy podpořené tímto projektem.

Datum: 24.11.2023

Podpis odpovědného řešitele:



* Povinný výstup.

** Pouze renomovaná nakladatelství Elsevier, Springer, Bentham apod.

Seznam literatury

Seznam literatury podle šablony Citační norma APA

- [1]Kozlov, O., Horáková, E., Rademacherová, S., Maliňák, D., Andrýs, R., Prchalová, E., Lísa, M. (2023). Direct Chiral Supercritical Fluid Chromatography-Mass Spectrometry Analysis of Monoacylglycerol and Diacylglycerol Isomers for the Study of Lipase-Catalyzed Hydrolysis of Triacylglycerols. *Analytical chemistry*, 95(11), 5109-5116.
- [2]Prchalová, E., Sukupova, M., Maliňák, D., Andrýs, R., Sivak, L., Pekarík, V., Skarka, A., Svobodová, J., Prchal, L., Fresser, L., Heger, Z., Musflek, K. (2023). BODIPY-labelled acetylcholinesterase reactivators can be encapsulated into ferritin nanovehicles for enhanced bioavailability in the CNS. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 167(November), "Article Number:115490".
- [3]Jůza, R., Musflek, K., Mezeiova, E., Soukup, O., Korabecny, J. (2023). Recent advances in dopamine D-2 receptor ligands in the treatment of neuropsychiatric disorders. *Medicinal Research Reviews*, 43(1), 55-211.