

Závěrečná zpráva projektu specifického výzkumu zakázka č. 2105/2020

Název projektu: Štúdium a *in vitro* testovanie inhibičnej aktivity novo pripravených zlúčenín optimalizovaných pre inhibíciu a reaktiváciu proteínov.

Specifikace řešitelského týmu

Odpovědný řešitel: Mgr. Annamária Halečková, prof. PharmDr. Kamil Musílek, Ph.D.

Studenti doktorského studia na UHK: Mgr. Annamária Halečková, Mgr. Michaela Vašková, Mgr. Petra Lišková, Mgr. Žofia Chrienová, Mgr. Radomír Jůza, RNDr. Lucie Vinklářová

Studenti magisterského studia na PřF UHK: Bc. Pavlína Fiandová, Bc. Karolína Knittelová, Bc. Matěj Marek, Bc. Markéta Miškeříková, Bc. Aneta Rotterová, Bc. Veronika Skoupilová, Bc. Tereza Jiránková, Bc. Aneta Klusoňová, Bc. Zuzana Kohoutová, Bc. Eliška Prchalová, Bc. Vojtěch Schmeiser, Bc. Kateřina Šalamonová, Bc. Daniel Zhouf

Další výzkumní pracovníci: PharmDr. Rudolf Andrýs, Ph.D., PharmDr. Ondřej Benek, Ph.D., doc. Ing. Miroslav Lísa, Ph.D., RNDr. Dávid Maliňák, Ph.D., prof. PharmDr. Kamil Musílek, Ph.D., RNDr. Miroslav Psoška, Ph.D., Mgr. Monika Schmidt, Ph.D., Mgr. Eugenie Nepovimová, Ph.D., doc. RNDr. Lucie Zemanová, Ph.D.

Celková částka přidělené dotace: 667 500 Kč

Datum zahájení řešení projektu: 1. 3. 2020

Datum ukončení řešení projektu: 31. 11. 2021

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

Naviazaním na predošlý výskum pracovných skupín Katedry chémie, sa projekt špecifického výskumu zaoberal charakterizáciou rekombinantne produkovaných proteínov s enzýmovou aktivitou potrebných pre *in vitro* testovanie, ďalej vývinom nových nízkomolekulových zlúčenín so zvýšenou selektivitou voči enzýmom študovaným v patogenéze neurodegeneratívnych ochorení, ako aj vývinom univerzálnejších reaktivátorov cholinesteráz používaných pri intoxikácii organizmu.

Rekombinantný enzým 17 β -HSD10 (ABAD), ktorého prípravou a základným testovaním sa zaoberal predchádzajúci špecifický výskum, bol testovaný vo vzťahu ku svojim potenciálnym inhibítorm a ich štruktúrnym analógom. Pripravené inhibítory 17 β -HSD10 boli *in vitro* testované a výsledky následne publikované v časopise Toxicology Letters. Získané dáta boli spracované do dizertačnej práce Dr. Vinklářové a úspešne obhájené dňa 13.01.2021.

Ďalej bola pre enzým 17 β -HSD10 (ABAD) optimalizovaná spektrofluorimetrická aktivná esej s využitím 17 β -estradiolu ako substrátu. Pomocou tejto optimalizovanej metódy bol testovaný inhibičný potenciál vybraných zlúčenín. Pre štúdium interakčných partnerov 17 β -HSD10 *ex vivo* bola vytvorená bunková línia HEK293 s overexpresiou tohto proteínu. Následne bol urobený výber jednotlivých monoklonov, ktorých pozitivita bola testovaná metódou Western blot a mikroskopicky metódou nepriamej imunofluorescencie.

V rámci novej *in vitro* spektrofluorimetrickej metódy využívajúcej „refolding“ aktivitu cyklofilínu D bolo ďalej optimalizované klonovanie a purifikácia rekombinantnej RNAsy T1, ktorá sa využíva ako substrát pre stanovenie aktivity cyklofilínu.

Ako „off-target“ k cyklofilínu D bol pripravený rekombinantný ľudský cyklofilín A v expresnom systéme *E. coli*. Cyklofilín A bol exprimovaný a purifikovaný. U čistého cyklofilínu A bola stanovená koncentrácia, overená čistota, identita, aktivita a interakcia s inhibítorom cyklosporínom A. Takisto bola stanovená disociačná konštanta väzby cyklofilín A-cyklosporín A pomocou metódy izotermickej titračnej kalorimetrie.

Viacukroková syntéza bola použitá na prípravu zlúčenín s potenciálnou inhibičnou aktivitou voči enzýmu cyklofilínu D. Na prípravu a purifikáciu boli využité metódy organickej syntézy, na analýzu získaných produktov a medziproduktov boli využité metódy NMR a hmotnostná spektrometria. Jednotlivé reakčné kroky boli optimalizované s cieľom vylepšiť výťažnosť reakcií. Novo vyvinutá spektrofluorimetrická esej využívajúca „refolding“ aktivitu cyklofilínu D bola použitá na stanovenie inhibičnej aktivity potenciálnych inhibítorov CypD.

Ďalej boli metódami chemickej syntézy pripravené hybridné zlúčeniny s duálnym účinkom na NMDA receptory a GABA receptory. Keďže poruchy glutamátového systému patria k patogénnym znakom niektorých neurodegeneratívnych ochorení, napr. Alzheimerovej choroby (AD), synergické ovplyvnenie glutamátových NMDA receptorov spolu s inhibíciou cholinesteráz môže pozitívne ovplyvniť progresiu ochorenia.

Metódy chemickej syntézy boli použité aj pri príprave inhibítorov na báze takrínu s viaccielovým profilom voči AD. Pripravené molekuly boli testované pomocou biologických metód a tieto výsledky boli následne publikované v časopise *Bioorganic Chemistry*.

Pomocou biochemických metód boli pripravené a purifikované rekombinantné enzýmy ľudských cholinesteráz (acetylcholinesterázy, butyrylcholinesterázy). Reaktivačná aktivita testovanej série oxímov Pyridinium-2-carbaldoximes vo vzťahu k daným cholinesterázam bola publikovaná v časopise *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*.

U najúčinnějších bis kvartérnych reaktivátorov boli pomocou novo vyvinutých analytických metód stanovené farmakokinetické vlastnosti, príslušné výsledky boli publikované v časopise *Journal of Pharmaceutical Sciences*.

Boli stanovené kinetické parametre vzniku a stability komplexov medzi bis kvartérnymi reaktivátormi a kukurbiturilmi ako potenciálnymi transportermi cez hematoencefalickú bariéru. Výsledky tejto práce boli súčasťou úspešne obhájenej diplomovej práce a boli publikované v časopise *New Journal of Chemistry*.

V rámci svojich diplomových prác boli študenti zameraní na rôzne molekulové ciele. Vývin novej analytickej metódy superkritickej fluidnej chromatografie s hmotnostnou detekciou (SFC-MS) umožnil stanovenie a separáciu lipidov s cieľom určiť lipidomický profil biologických vzoriek. Ďalej bola vyvinutá nová LC-MS/MS metóda, pomocou ktorej bola stanovená farmakokinetika oxímov po enkapsulácii do kukurbiturilov. Tieto výsledky, ako aj výsledky reaktivácie imobilizovaných cholinesteráz naviazaných na magnetické mikročastice boli spracované do diplomových prác, ktoré boli v roku 2020 úspešne obhájené.

Splnění cílů řešení a přínos projektu.

Ciele projektu boli splnené. Úspešne sa naviazalo na zavedené biochemické metódy pre charakterizáciu rekombinantných foriem ľudských enzýmov. Pre novo pripravené enzýmy boli zavedené metódy exprese a purifikácie a metódy stanovenia ich aktivity, ktoré sú využívané k testovaniu nových inhibítorov.

Boli pripravené nové zlúčeniny s modulačnou aktivitou na vybrané molekulárne ciele, ktorých aktivita bola alebo bude testovaná a na základe získaných dát bude štruktúra vybraných látok upravená pre získanie lepších farmakokinetických i farmakodynamických vlastností. Získané výsledky boli spracované do publikačných výstupov.

Publikované články v časopisoch typu Jimp (študenti zvýraznení):

1. Andrys, R.; **Klusonova, A.**; Lisa, M.*; Zdarova Karasova, J. Encapsulation of Oxime-Acetylcholinesterase Reactivators: Influence of Physiological Conditions on the Stability of Oxime-Cucurbit[7]uril Complexes. *New Journal of Chemistry*. **2020**, vol. 44, no. 1, p. 14367-14372. <https://doi.org/10.1039/D0NJ03102J> IF₂₀₁₉ = 3.288, Q2 68/177 (Multidisciplinary Chemistry)
2. Fisar, Z.*; Musilek, K.*; Benek, O.; Hroch, L.; **Vinklarova, L.**; Schmidt, M.; Hroudova, J.; Raboch, J. Effects of novel 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 10 inhibitors on mitochondrial function. *Toxicology Letters*. **2021**, vol. 339, no. 1, p. 12-19. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.12.012> IF₂₀₁₉ = 3.569, Q1 20/92 (Toxicology)
3. Nepovimova, E.; Svobodova, L.; Dolezal, R.; Hepnarova, V.; Junova, L.; Jun, D.; Korabecny, J.; Kucera, T.; Gazova, Z.; Motykova, K.; Kubackova, J.; Bednarikova, Z.; Janockova, J.; Jesus, C.; Cortes, L.; Pina, J.; Rostohar, D.; Serpa, C.; Soukup, O.; Aitken, L.; Hughes, R.E.; **Musilek, K.**; Muckova, L.; Jost, P.; Chvojikova, M.; Vales, K.; Valis, M.; **Chrienova, Z.**; Chalupova, K.; Kuca, K.* Tacrine – Benzothiazoles: Novel Class of Potential Multitarget anti-Alzheimer's Drugs Dealing with Cholinergic, Amyloid and Mitochondrial Systems. *Bioorganic Chemistry*. **2021**, vol. 107, no. 1, p. 104596. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104596> IF₂₀₁₉ = 4.831, Q1 8/57 (Organic Chemistry), Q1 66/297 (Biochemistry & Molecular Biology)
4. Lee, H.M.; Andrys, R.; Jonczyk, J.; Kim, K.; Vishakantegowda, A.G.; Malinak, D.; Skarka, A.; Schmidt, M.; **Vaskova, M.**; Latka, K.; Bajda, M.; Jung, Y.S.*; Malawska, B.*; Musilek, K.* Pyridinium-2-carbaldoximes with quinolinium carboxamide moiety are simultaneous reactivators of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibited by nerve agent surrogates. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. **2021**, vol. 36, no. 1, p. 437-449. <https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1869954> IF₂₀₂₀ = 5.051, Q1 14/62 (Medicinal Chemistry), Q2 89/295 (Biochemistry & Molecular Biology)
5. Vanova, N.*; Hojna, A.; Pejchal, J.; Herman, D.; Malinak, D.; **Prchalova, E.**; Musilek, K.; Zdarova Karasova, J. Determination of K869, a novel oxime reactivator of acetylcholinesterase, in rat body fluids and tissues by liquid-chromatography methods: Pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2021**, vol. 110, no. 4, p. 1842-1852. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.01.031> IF₂₀₂₀ = 3.534, Q2 31/62 (Medicinal Chemistry), Q2 77/178 (Chemistry Multidisciplinary), Q2 132/276 (Pharmacology & Pharmacy)

Odoslané články v časopisoch typu Jimp (študenti zvýraznení):

6. **Haleckova, A.**; Benek, O.*; Zemanova, L.; Dolezal, R.; Musilek, K.* Small-molecule inhibitors of cyclophilin D as potential therapeutics in mitochondria-related diseases. *Medicinal Research Reviews*. Submitted 2021-10-04, IF₂₀₂₀ = 12.944, D1/Q1 2/62 (Medicinal Chemistry), D1/Q1 7/276 (Pharmacology & Pharmacy)

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.

Tab. 1 Sumář výstupů řešení projektu

Typ výstupu	Plán	Skutečnost	Poznámka
Hodnocené výstupy projektu			
Jimp (databáze WoS)	5	5+1 submitted	3×Q1, 2×Q2 + 1×D1/Q1 submitted
Jsc (databáze Scopus)			
B (recenzovaná odborná kniha)*			
C (kapitola v recenzované odborné knize)*			
D (článek ve sborníku ve WoS, Scopus)			
P (patent)			
Počet výsledků	5	5	
Nehodnocené výstupy projektu			
Počet obhájených dizertačních prací	1	1	obhajoba 13. 1. 2021
Počet obhájených diplomových prací	7	6	
Počet výsledků	8	7	

Ke zprávě přiložte:

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

Datum: 22. 11. 2021

Podpis odpovědného řešitele:



Seznam literatury

Seznam literatury podle šablony ČSN ISO 690

- [1] ANDRÝS, Rudolf, A. KLUSOŇOVÁ, M. LÍSA, J. ŽDÁROVÁ KARASOVÁ. Encapsulation of oxime acetylcholinesterase reactivators: influence of physiological conditions on the stability of oxime-cucurbit[7]uril complexes. *New journal of chemistry*. 2020, 44 (34), 14367-14372. ISSN 1144-0546.
- [2] JAVANOVA, Nela, A. HOJNA, J. PEJCHAL, D. HERMAN, D. MALIŇÁK, E. PRCHALOVÁ, K. MUSÍLEK, JZ. KARASOVA. Determination of K869, a Novel Oxime Reactivator of Acetylcholinesterase, in Rat Body Fluids and Tissues by Liquid-Chromatography Methods: Pharmacokinetic Study. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021, 110 (4), 1842-1852. ISSN 0022-3549.
- [3] FISAR, Zdenek, K. MUSÍLEK, O. BENEK, L. HROCH, L. VINKLÁŘOVÁ, M. SCHMIDT, J. HROUDOVA, J. RABOCH. Effects of novel 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 10 inhibitors on mitochondrial respiration. *Toxicology letters*. 2021, 339 (15.3.2021), 12-19. ISSN 0378-4274.
- [4] LEE, Hyun Myung, R. ANDRÝS, J. JONCZYK, K. KIM, AG. VISHAKANTEGOWDA, D. MALIŇÁK, A. SKARKA, M. SCHMIDT, M. VAŠKOVÁ, K. LATKA, M. BAJDA, Y. JUNG, B. MALAWSKA, K. MUSÍLEK. Pyridinium-2-carbaldoximes with quinolinium carboxamide moiety are simultaneous reactivators of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibited by nerve agent surrogates. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2021, 36 (1), 1-13. ISSN 1475-6366.
- [5] NEPOVIMOVÁ, Eugenie, L. SVOBODOVA, R. DOLEŽAL, V. HEPNAROVA, L. JUNOVA, D. JUN, J. KORABECNY, T. KUCERA, Z. GAZOVA, K. MOTYKOVA, J. KUBACKOVA, Z. BEDNARIKOVA, J. JANOČKOVÁ, C. JESUS, L. CORTES, J. PINA, D. ROSTOHAR, C. SERPA, O. SOUKUP, L. AITKEN, R. HUGHES, K. MUSÍLEK, L. MUCKOVA, P. JOST, M. CHVOJKOVA, K. VALES, M. VALIS, Ž. CHRIENOVÁ, K. CHALUPOVÁ, K. KUČA. Tacrine – Benzothiazoles: Novel class of potential multitarget anti-Alzheimers drugs dealing with cholinergic, amyloid and mitochondrial systems. *Bioorganic Chemistry*. 2021, 107 (February), "Article number 104596". ISSN 0045-2068.

Seznam literatury podle šablony ID záznamu

[1] **Andrýs, R. Klusoňová, A. Lísa, M. Žďárová Karasová, J.** Encapsulation of oxime acetylcholinesterase reactivators: influence of physiological conditions on the stability of oxime-cucurbit[7]uril complexes. *New journal of chemistry*. Cambridge : Royal society of chemistry, 2020. 6s. ISSN: 1144-0546. Kód UT ISI: 000564479900005.

Granty: GA18-08937S.

Spec. výzkum: S. Forma: J_ČLÁNEK V ODBORNÉM PERIODIKU
(ID: 43876591) (RIV ID: 50016981)

[2] **Fisar, Z. Musílek, K. Benek, O. Hroch, L. Vinklářová, L. Schmidt, M. Hroudová, J. Raboch, J.** Effects of novel 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 10 inhibitors on mitochondrial respiration. *Toxicology letters*. Elsevier, 2021. 8s. ISSN: 0378-4274. Kód UT ISI: 000608184700002.

Granty: EF18_069/0010054.

Spec. výzkum: S. Forma: J_ČLÁNEK V ODBORNÉM PERIODIKU
(ID: 43877447) (RIV ID: 50017837)

[3] **Nepovimová, E. Svobodová, L. Doležal, R. Hepnarová, V. Junová, L. Jun, D. Korabecny, J. Kucera, T. Gazová, Z. Motykova, K. Kubackova, J. Bednarikova, Z. Janočková, J. Jesus, C. Cortes, L. Pina, J. Rostohar, D. Serpa, C. Soukup, O. Aitken, L. Hughes, R. Musílek, K. Muckova, L. Jost, P. Chvojikova, M. Vales, K. Valis, M. Chrienová, Ž. Chalupová, K. Kuča, K.** Tacrine – Benzothiazoles: Novel class of potential multitarget anti-Alzheimer's drugs dealing with cholinergic, amyloid and mitochondrial systems. *Bioorganic Chemistry*. Academic Press Inc., 2021. 19s. ISSN: 0045-2068. Kód UT ISI: 000618104800008.

Granty: EF18_069/0010054.

EF16_025/0007444.

EF17_048/0007441. Spec. výzkum: S. Forma: J_ČLÁNEK V ODBORNÉM PERIODIKU
(ID: 43877246) (RIV ID: 50017636)

[4] **Lee, HM. Andrýs, R. Jonczyk, J. Kim, K. Vishakantegowda, AG. Maliňák, D. Skarka, A. Schmidt, M. Vašková, M. Latka, K. Bajda, M. Jung, Y. Malawska, B. Musílek, K.** Pyridinium-2-carbaldoximes with quinolinium carboxamide moiety are simultaneous reactivators of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibited by nerve agent surrogates. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. Taylor & Francis, 2021. 13s. ISSN: 1475-6366. Kód UT ISI: 000608910500001.

Granty:

8F17004. Spec. výzkum: S. Forma: J_ČLÁNEK V ODBORNÉM PERIODIKU
(ID: 43877446) (RIV ID: 50017836)

[5] **Vanova, N. Hojna, A. Pejchal, J. Herman, D. Maliňák, D. Prchalová, E. Musílek, K. Karasova, JZ.** Determination of K869, a Novel Oxime Reactivator of Acetylcholinesterase, in Rat Body Fluids and Tissues by Liquid-Chromatography Methods: Pharmacokinetic Study. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Elsevier, 2021. 11s. ISSN: 0022-3549. Kód UT ISI: 000631863100040.

Granty: GA19-13628S.

Spec. výzkum: S. Forma: J_ČLÁNEK V ODBORNÉM PERIODIKU
(ID: 43877648) (RIV ID: 50018038)
