Příloha č. 4

Závěrečná zpráva projektu specifického výzkumu
zakázka č. 2103 / 2022

Název projektu: Výzkum nově připravených sloučenin potenciálně využitelných při terapii Alzheimerovy choroby.

Specifikace řešitelského týmu

Odpovědný řešitel: Mgr. Markéta Sedláček Miškeříková (Miškeříková), PharmDr. Ondřej Benek, Ph.D.

Studenti doktorského studia na UHK: Mgr. Katarína Jurková, Mgr. Aneta Rotterová, Mgr. Markéta Sedláček Miškeříková (Miškeříková), Mgr. Marie Hamšíková, Mgr. Annamária Halečková, Mgr. Michaela Hanzlová (Vašková), Mgr. Žofia Chrienová, Mgr. Veronika Skoupilová (ukončila studium DSP Toxikologie v květnu 2023)

Studenti magisterského studia na PřF UHK: Bc. Petra Bůbelová, Bc. Aneta Jarkovská, Bc. David Krejčí, Bc. Monika Mrňavá, Bc. Veronika Syrová, Bc. Vojtěch Škopek, Bc. Roman Viták, Bc. Kateřina Bužíková, Bc. Eliška Hotovcová

Další výzkumní pracovníci: PharmDr. Rudolf Andrýs, Ph.D., PharmDr. Ondřej Benek, Ph.D., Mgr. Monika Schmidt, Ph.D., Ing. Jana Svobodová, Ph.D., Mgr. Eugenie Nepovimová, Ph.D., RNDr. Patrik Olekšák, Ph.D., PharmDr. Adam Skarka, Ph.D., doc. RNDr. Lucie Zemanová, Ph.D.

Celková částka přidělené dotace: 722 200 Kč

Datum zahájení řešení projektu: 01. 03. 2022

Datum ukončení řešení projektu: 30. 11. 2023

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

Projekt specifického výzkumu navázal na předešlý výzkum pracovních skupin Katedry chemie PřF UHK a zabýval se přípravou, analýzou a *in vitro* (příp. *in cellulo* a *in vivo*) testováním nových modulátorů enzymů, které by mohly být využitelné při terapii zejména neurodegenerativních onemocnění (př. Alzheimerovy choroby). Výzkum byl veden třemi hlavními směry, a to přípravou potenciálních nízkomolekulárních inhibitorů tří různých enzymů 17β-hydroxysteroid dehydrogenasy typu 10 (17β-HSD10), cyklofilinu D (cypD) a mTOR-kinasy (mTOR).

Na základě experimentálních výsledků z přechozích let bylo rámci výzkumu inhibitorů enzymu 17β-HSD10 připraveno vícero nových sloučenin, jejichž inhibiční aktivita byla změřena *in vitro* metodami za využití acetoacetyl-CoA (AAC) jako substrátu. Farmakokinetický a farmakodynamický profil látek byl následně stanoven *in vivo* metodami a získané výsledky byly publikovány v časopise European Journal of Medicinal Chemistry (Q1 dle AIS).

Rovněž byla pro enzym 17β-HSD10 optimalizována spektrofluorimetrická esej s využitím 17β-estradiolu (E2) a allopregnanolonu (ALLOP) jako substrátů. Pomocí této metody byl testován inhibiční potenciál dříve připravených vybraných sloučenin a tato zjištění byla publikována v časopise Journal of Neurochemistry (Q2 dle AIS).

Na základě výše získaných dat byla navržena nová sada látek se zvýšenou selektivitou vůči testovanému enzymu 17β-HSD10 a tyto látky byly následně připraveny vícekrokovou syntézou. Na přípravu a purifikaci látek byly využity metody organické syntézy, na analýzu a identifikaci získaných

produktů a meziproduktů byly využity metody nukleární magnetické rezonance (NMR), hmotnostní spektrometrie (MS) a hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (HRMS). Připravené látky byly testovány výše zmíněnými metodami *in vitro*. Aby byla zjištěna schopnost těchto inhibitorů pronikat přes buněčné membrány, a inhibovat tak aktivitu daného enzymu přímo v buňce, byla k *in cellulo* měření použita esej za použití (-)-CHANA fluorogenní značky v Hek293 buněčné linii nadměrně exprimující 17β-HSD10. U nejslibnějších inhibitorů byl rovněž studován typ interakce s daným enzymem. Získané výsledky byly publikovány v časopise ACS Medicinal Chemistry Letters (Q1 dle AIS). Na základě těchto poznatků bude optimalizována struktura dalších potenciálních inhibitorů.

Dalším směrem zaměření projektu specifického výzkumu byl enzym cypD. Vícekrokovou syntézou bylo připraveno několik nových potenciálních inhibitorů enzymu cypD, u nichž byla následně *in vitro* spektrofluorimetrickou esejí změřena inhibiční aktivita za využití „refolding" aktivity cypD. Dosavadní poznání o inhibitorech enzymu cypD bylo zpracováno do rešeršního článku publikovaného v časopise Medicinal Research Reviews (T5/D1/Q1 dle AIS).

Ve svých diplomových prací byli studenti zaměřeni na tři výše zmíněné molekulové cíle. V rámci studia enzymu 17β-HSD10 byly zkoumány změny v genové expresi v prostředím bohatém na amyloid-β (Aβ), byla také zkoumána mitochondriální toxicita v buněčných modelech či byla vytvořena buněčná linie Hek293 exprimující lidský 5-HT receptor spřažený s iontovým kanálem. V rámci studia enzymu cypD bylo syntetizováno vícero nových selektivních inhibitorů tohoto enzymu a jedna z prací při syntéze rovněž využila přístup fragment-based drug design (FBDD), kdy jsou za pomocí počítačových metod identifikovány vhodné potenciální inhibitory jednotlivých enzymů. V neposlední řadě se studenti věnovali molekulárnímu cíli mTOR, kdy byly připraveny nové sloučeniny jako potenciální terapeutika neurodegenerativních a karcinogenních onemocnění či jako látky potenciálně zpomalující stárnutí. Všechny tyto získané výsledky byly zpracovány do diplomových prací, které byly ve dvou letech trvání projektu specifického výzkumu úspěšně obhájeny.

Postgraduální studenti zapojení do projektu specifického výzkumu se také zúčastnili konferencí, kde své experimentální výsledky prezentovali formou posterů.

Splnění cílů řešení a přínos projektu.

Cíle projektu byly splněny. Bylo úspěšně navázáno na zavedené biochemické metody pro charakterizaci rekombinantních forem lidských enzymů. Pro jednotlivé enzymy byly optimalizovány metody genové exprese a purifikace a metody stanovení jejich aktivity, které jsou využívány k testování nových inhibitorů.

Byly připraveny nové sloučeniny s inhibiční aktivitou na vybrané molekulární cíle, jejichž aktivita byla testována a na základě získaných dat bude struktura vybraných látek optimalizována pro vylepšení selektivity a zvýšení inhibiční aktivity. Získané výsledky byly rovněž zpracovány do diplomových prací a publikačních výstupů v impaktovaných časopisech.

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):

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*. **2022**, vol. 42, no. 5, p. 1822-1855. https://doi.org/10.1002/med.21892 IF_{2022} = 13.3 (T5/D1/Q1 2/70 Medicinal Chemistry dle AIS)

Benek, O.*; **Vaskova, M.**; **Miskerikova, M.**; Schmidt, M.; Andrys, R.; **Rotterova, A.**; Skarka, A.; Hatlapatkova, J.; Zdarova Karasova, J.; Medvecky, M.; Hroch, L.; Vinklarova, L.; Fisar, Z.; Hroudova, J.; Handl, J.; Capek, J.; Rousar, T.; Kobrlova, T.; Dolezal, R.; Soukup, O.; Aitken, L.; Gunn-Moore, F.; Musilek, K.* Development of submicromolar 17β-HSD10 inhibitors and their in vitro and in vivo evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2023**, vol. 258, no. 1, p. 115593. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115593 IF_{2022} = 6.7 (Q1 11/70 Medicinal Chemistry dle AIS)

Schmidt, M.*; **Vaskova, M.**; **Rotterova, A.**; Benek, O.; **Fiandova, P.**; **Miskerikova, M.**; Zemanova, L.; Musilek, K. Physiologically relevant fluorescent assay for identification of 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 10 inhibitors. *Journal of Neurochemistry*. **2023**, vol. 167, no. 2, p. 154-167. https://doi.org/10.1111/jnc.15917 IF_{2022} = 4.7 (Q2 85/315 Biochemistry & Molecular Biology dle AIS)

In press články v časopisech typu Jimp (studenti zvýraznění):
Hanzlova, M.; **Sedlacek Miskerikova, M.**; **Rotterova, A.**; Chalupova, K.; **Jurkova, K.**; **Hamsikova, M.**; Andrys, R.; **Haleckova, A.**; Svobodova, J.; Schmidt, M.*; Benek, O.*; Musilek, K. Nanomolar benzothiazole-based inhibitors of 17β-HSD10 with cellular bioactivity. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. **2023**, in press. https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.3c00355 IF_{2022} = 4.2 (Q1 10/70 Medicinal Chemistry dle AIS)

Tab. 1 Sumář výstupů řešení projektu

Typ výstupu	Plán	Skutečnost	Poznámka
Jimp (databáze WoS/ kvartil dle AIS)*	4	1× T5/D1/Q1, 2× Q1†, 1× Q2	†Článek Hanzlova et al. je in press, nebylo mu zatím přiřazeno stránkování, a proto nemohl být ještě zařazen do OBD.
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	2	0	2 obhajoby jsou plánovány v akademickém roce 2023/2024
Počet obhájených diplomových prací	9	9	
Počet výsledků	15	13	

Ke zprávě přiložte:

a) výpis z OBD – výstupy podpořené tímto projektem.

Datum: 29.11.2023 Podpis odpovědného řešitele:

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

Seznam literatury podle šablony ID záznamu

[1]**Halečková, A., Benek, O., Zemanová, L., Doležal, R., Musílek, K.** Small-molecule inhibitors of cyclophilin D as potential therapeutics in mitochondria-related diseases. *Medicinal Research Reviews*. HOBOKEN : WILEY, 2022. 34s. ISSN: 0198-6325. Kód UT ISI: 000795933400001.
Granty: EF18_069/0010054.
NU22J-02-00006.
Spec. výzkum: S. Forma: J_ČLÁNEK V ODBORNÉM PERIODIKU
(ID: 43878793) (RIV ID: 50019183)

[2]**Benek, O., Vašková, M., Sedláček Miškeříková, M., Schmidt, M., Andrýs, R., Rotterová, A., Skarka, A., Hatlapatkova, J., Karasova, JZ., Medvecký, M., Hroch, L., Vinklářová, L., Fisar, Z., Hroudova, J., Handl, J., Capek, J., Rousar, T., Kobrlova, T., Dolezal, R., Soukup, O., Aitken, L., Gunn-Moore, F., Musílek, K.** Development of submicromolar 17 beta-HSD10 inhibitors and their in vitro and in vivo evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*. ISSY-LES-MOULINEAUX : ELSEVIER FRANCE-EDITIONS SCIENTIFIQUES MEDICALES ELSEVIER, 2023. 18s. ISSN: 0223-5234. Kód UT ISI: 001030059600001.
Granty:
EF18_069/0010054. Spec. výzkum: S. Forma: J_ČLÁNEK V ODBORNÉM PERIODIKU
(ID: 43880215) (RIV ID: 50020605)

[3]**Schmidt, M., Vašková, M., Rotterová, A., Fiandová, P., Miškeříková, M., Zemanová, L., Benek, O., Musílek, K.** Physiologically relevant fluorescent assay for identification of 17?-hydroxysteroid dehydrogenase type 10 inhibitors. *Journal of Neurochemistry*. New York : J. Wiley, 2023. 14s. ISSN: 0022-3042. Kód UT ISI: 001028310900001.
granty: 0Spec. výzkum: S. Forma: J_ČLÁNEK V ODBORNÉM PERIODIKU
(ID: 43880364) (RIV ID: 50020754)