

ЗАТВЕРДЖУЮ
Перший проректор
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка
проф. Володимир ІЛЬЧЕНКО



АНТОВАНИЙ ЗВІТ
про виконану роботу у 2020-2021 роках в рамках реалізації проекту
із виконання наукових досліджень і розробок

Хіміко-генетичний підхід до вивчення наслідків пригнічення ACE-2 як фармакологічної моделі побічних ефектів COVID-19 в нервовій, кишковій, серцево-судинній системах та системі гемостазу

Назва конкурсу: Наука для безпеки людини та суспільства
Реєстраційний номер Проекту: 2020.01/0480

Підстава для реалізації Проекту з виконання наукових досліджень і розробок (2020.01/0480 Хіміко-генетичний підхід до вивчення наслідків пригнічення ACE-2 як фармакологічної моделі побічних ефектів COVID-19 в нервовій, кишковій, серцево-судинній системах та системі гемостазу).

Рішення наукової ради Національного фонду досліджень України щодо визначення переможця конкурсу «Наука для безпеки людини та суспільства»
протокол від «16-17» вересня 2020 року № 21

1. ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ ПРО ПРОЄКТ

Загальна тривалість виконання проекту 2020 рік – 2021 рік

Тривалість виконання Проекту у 2020 році

Початок – 09 листопада 2020 року

(дата укладання Договору про виконання наукового дослідження і розробки)

Закінчення – 15 грудня 2020 року

Тривалість виконання Проекту у 2021 році

Початок – 09 травня 2021 року

(дата укладання Договору про виконання наукового дослідження і розробки)

Закінчення – 15 грудня 2021 року

Загальна вартість Проекту 9 828 204,00 грн.

Вартість Проекту по роках, грн.:

1-й рік 3 000 000,00 грн

2-й рік 6 828 204,00 грн

2. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ВИКОНАВЦІВ ПРОЄКТУ

до виконання Проекту залучено 18 виконавців, з них:

доктори наук 5;

кандидати наук 10;
інші працівники 3.

3. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ГРАНТООТРИМУВАЧА ТА ОРГАНІЗАЦІЮ(Ї) СУБВИКОНАВЦЯ(ІВ) ПРОЄКТУ

Грантоотримувач: Київський національний університет імені Тараса Шевченка, 01033, м. Київ, вул. Володимирська 60, тел.: (044) 239-32-30, факс: (044) 239-32-30; р/р UA078201720313211010201014095, у ДКСУ в м. Києві; МФО 820172; ЄДРПОУ 02070944; Код(и) КВЕД 72.19 Дослідження й експериментальні розробки у сфері інших природних і технічних наук; Підпорядкованість підприємства/установи/організації: МОН України.

Субвиконавець: Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України; 01054, м.Київ, вул.Леонтовича, 9; МФО 820172; ЄДРПОУ 05417288; Код(и) КВЕД 72.19 Дослідження й експериментальні розробки у сфері інших природних і технічних наук; Підпорядкованість підприємства/установи/організації: НАН України.

4. ОПИС ПРОЄКТУ

4.1. Мета Проекту

Дослідити специфічний молекулярний механізм побічних ефектів COVID-19, що пов'язані з ACE2. Розробити низькомолекулярні хімічні зонди для інгібування ACE2, що допомогли б визначити механізм SARS-CoV-2 і зрозуміти його взаємодію з різними системами організму.

4.2. Основні завдання Проекту

Визначити набір відомих потенційних хімічних зондів та обрати ~10 штук для синтезу та профілювання. Вибрати шляхом молекулярного докінгу *in silico* 20-30 зі світової колекції скринінгових сполук (приблизно 15 мільйонів) для синтезу та характеризації. Провести високоефективний скринінг для синтезованих сполук на селективну інгібіторну активність ACE2 до ACE. Виміряти ADME/DMPK параметри. Вивчити вплив тимчасового прямого відключення активності ACE2 на нервову, кишкову, серцево-судинну системи та систему гемостазу. Згенерувати профайл отриманих хімічних зондів відповідно до загальноприйнятих світових критеріїв, що висуваються до низькомолекулярних хімічних зондів. Опублікувати розроблену та перевірену фармакологічну модель для вивчення побічних ефектів COVID-19. Оприлюднити інформацію про розроблені зонди Chemical Probe Portal (<https://www.chemicalprobes.org/>).

4.3. Детальний зміст Проекту:

- Сучасний стан проблеми

Незважаючи на важливу роль ACE2, значення якої підвищилося під час пандемії COVID-19, інструменти для дослідження ACE2 функції дуже обмежені. Більшість даних про роль ACE2 є декларативними або ж теоретично-обґрунтованими без прямих експериментальних підтверджень. Не дивлячись на те, що є цілка низка речовин з задекларованою активністю та високою селективністю до пригнічення ACE та ACE2, переважна більшість з них є комерційно недоступними, а їх використання як хімічних зондів не відомо.

- Новизна Проекту

В рамках проекту будуть розроблені синтетичні процедури синтезу відомих сполук, що раніше були доступні лише в мг, в грамових кількостях (1-10 г). Будуть згенеровані та проаналізовані нові потенційні інгібітори ACE2, що базуються на хемотипах, що раніше не застосовувалися у такій якості. Збудована молекулярна модель взаємодії сполук з ACE2, а також перевіreno вплив пригнічення ACE2 на функціонування нервової, кишкової, серцево-судинної системи та системи гемостазу. Проведено скринінг нових інгібіторів з світової бази відомих сполук. Всі винайдені інгібітори ACE2, що можуть бути хімічними зондами будуть розміщені на Chemical Probe Portal.

- Методологія дослідження

Для досягнення поставленої задачі будуть використані: органічний синтез, фізико-хімічні методи аналізу органічних сполук, молекулярна динаміка, молекулярний докінг, *in silico* скринінг, радіоізотопний аналіз, біохімічні методи дослідження. Сполуки будуть обрані також шляхом

використання всіх найсучасніших біо- та медхімічних хемоінформатичних фільтрів. Сполуки для синтезу будуть обиратися на тільки с точки зору максимальної селективності та активності, а і з точки зору економічної доцільності, потенційної доступності та ефективності.

5. ОТРИМАНІ НАУКОВІ АБО НАУКОВО-ТЕХНІЧНІ РЕЗУЛЬТАТИ (до 2 сторінок) в рамках реалізації Проекту, зокрема:

5.1. Опис наукових або науково-технічних результатів, отриманих в рамках виконання Проекту

Протягом виконання проекту авторською групою здійснено наступні технічні вдосконалення та наукові відкриття:

Вдосконалено цілу низку відомих синтетичних процедур при отриманні та масштабуванні ключових сполук потенційних селективних до ACE2 хімічних зондів. В деяких випадках розроблені нові, більш ефективні підходи. Все це дозволило збільшити виходи цільових сполук, що в подальшому виявилися ефективними та селективними до ACE2 хімічними зондами, до десятків грам, уникнути коштовних та/або високовартісних реагентів, спростити апаратний супровід синтезу, тощо. Саме доступність отриманих сполук в таких кількостях робить доволі перспективним їх подальше використання.

Запропоновано нову докінгову модель для дослідження селективності ACE2 по відношенню до ACE для пошуку сполук хітів шляхом молекулярного докінгу та *in silico* скринінгу, що може бути використано для подальших досліджень будь яких біохімічних механізмів, що містять стадію пригнічення ACE2.

Запропоновано ефективний та оригінальний підхід до аналізу великих масивів даних (хімічних структур) з метою оптимізації машинного часу без втрати ефективності знаходження сполук хітів.

Розроблено спосіб моніторингу поглинання та вивільнення [¹⁴C] гліцину та D-[2,3³H] аспартату в нервових терміналях головного мозку. Розроблено спосіб моніторингу транспортування L-[¹⁴C] глутамату в різних *in vitro* моделях: ізольованих шматочках тканини тонкого кишечника (Excised animal tissue) та в ізольованих сегментах тонкого кишечника (non-everted gut sac). На основі експериментальних даних щодо вимірювання мембраниового потенціалу нервових терміналей методом флуориметрії вперше показана відсутність неспецифічного мембранотропного ефекту новосинтезованих інгібіторів-стереоізомерів ACE2, EBC-36032 та EBC-36033. Обидва інгібітори у концентраціях 200 мкМ не впливали на мембраний потенціал тромбоцитів. EBC-36032 та EBC-36033 у концентраціях 200 мкМ не виявляли здатності деполяризувати плазматичну мембрану лейкоцитів, що повністю узгоджуються за даними, отриманими на нервових терміналях та тромбоцитах, і свідчать про відсутність неспецифічної мембранотропної дії обох інгібіторів. Вперше показано, що EBC-36032 починаючи з концентрації 1 мкМ збільшував дозозалежним чином спонтанну та стимульовану генерацію АФК в нервових закінченнях, які мали немітохондрійне походження. Доведено, що інгібітори не провокують гостру ексайтотоксичність і не посилюють можливі наслідки гіпоксії через полегшення реверсії глутаматного транспортера. Крім того, незмінний позаклітинний рівень L-[¹⁴C] глутамату та [³H]ГАМК за присутності інгібіторів свідчить про відсутність їх впливу на належний тонічний баланс сигналів збудження та гальмування. Порушення функціонування ACE2 в нейронах під час інфекування SARS-CoV-2 може супроводжуватися зниженням поглинання глутамату і ГАМК, а також екзоцитозом ГАМК, що лежать в основі гострих і довгострокових неврологічних ускладнень у пацієнтів з COVID-19. Проте з точки зору антивірусної терапії, спрямованої на ACE2, нові інгібітори ACE2 повинні бути перевірені на предмет можливих неврологічних побічних ефектів.

Вплив блокування ACE2 на збільшення маси тимусу є дуже цікавим неочікуваним результатом, що може стати відправною точкою для подальших досліджень довготривалих наслідків COVID-19, та узгоджується з фактом більшої схильності літніх людей до захворювання.

За допомогою досліджень скорочувальних реакцій гладеньких м'язів судин у відповідь на гуморальну стимуляцію в умовах дії блокаторів ACE2 підтверджено припущення, що значний обсяг трансформації ендогенного і циркулюючого Ang II у легенях, зокрема у стінці внутрішньої легеневих артерій, має принципове значення для модуляції реакції «гіпоксичної вазоконстрікції», а також неналежної адаптації організму до гіпоксії у випадках важкого перебігу захворювання на

COVID-19. З іншого боку підтверджено, що найбільш відомий продукт трансформації Ang II за участі ACE2 і безперечно ключовий контрагент ренін-ангіотензинової системи (RAS), також може ініціювати запалення у легенях, але природа цієї активності залишається не з'ясованою і потребує подальших досліджень.

5.2. За наявності науково-технічної продукції обґрунтування її переваг у порівнянні з існуючими аналогами

Вдосконалення синтетичних процедур показало значну ефективність щодо до виходів та собівартості синтезу ключових сполук, що взагалі дозволило отримати їх в необхідних для дослідження мультиграмових кількостях.

Нова докінгова модель в першу чергу має доповнити ряд вже існуючих моделей та має дослідження і продемонстровані нами відмінності від існуючих, що може вдало розширити набір моделей при дослідження пригнічення ACE2.

Швидкий метод аналізу великих баз даних без втрати ефективності є дуже важливою складовою сучасної хемоінформатики та компаунд менеджменту. Продемонстроване зменшення процесорного часу роботи комп’ютера в сотні разів без суттєвої втрати ефективності є доволі унікальним та революційним результатом. Проте загальна ефективність такого підходу потребує подальших підтверджень при використанні для аналізу інших мішеней та баз даних.

Способ моніторингу поглинання та вивільнення [¹⁴C] гліцину та D-[2,3³H] аспартату в нервових терміналях головного мозку та спосіб моніторингу транспортування L-[¹⁴C]глутамату в різних *in vitro* моделях: ізольованих шматочках тканини тонкого кишечника є дуже важливим кроком до моделювання поведінки клітин цих органів та подальших біологічних та біохімічних досліджень, що з цим пов’язані.

5.3. Практична цінність отриманих результатів реалізації Проекту для економіки та суспільства (стосується проектів, що передбачають проведення прикладних наукових досліджень і науково-технічних розробок)

Ефективність розроблених синтетичних процедур продемонстрована на широкому колі субстратів, що може бути використано хіміками-синтетиками з усього світу задля отримання подібних сполук та їх аналогів.

Нова докінгова модель для дослідження селективності ACE2 по відношенню до ACE може бути корисна в подальшому в будь-яких хемоінформатичних дослідженнях та групах молекулярного дизайну та докінгу при вивчені та пошуку нових інгібіторів ACE2 при дослідженні будь-яких біохімічних механізмів, що включають стадію селективного інгібування останнього.

Способ аналізу великих баз даних та пришвидшення вибору сполук з заданими критеріями стане в нагоді у медхімічних лабораторіях, що займаються скринінгом та у відділах компаунд-менеджменту крупних фармакологічних та біотехнологічних компаній.

Способ моніторингу поглинання та вивільнення [¹⁴C] гліцину та D-[2,3³H] аспартату в нервових терміналях головного мозку та спосіб моніторингу транспортування L-[¹⁴C]глутамату в різних *in vitro* моделях може бути використано біохіміка усього світу для моделювання процесів в нерворівих терміналях головного мозку, та первинних дослідженнях активності хімічних сполук при дії на останні.

Доведення ролі пригнічення ACE2 в довгострокових наслідках COVID-19 є дуже важливою складовою подальшої боротьби з пандемією цієї хвороби та ще одним кроком на шляху до розуміння механізму дії вірусу SARS-COV-2 та створення ефективних лікарських засобів.

Вивчення впливу пригнічення ACE2 на функції кишечника є важливим кроком до розуміння довгострокових наслідків COVID-19 та можуть бути відправною точкою нових досліджень.

5.4. Опис шляхів та способів подальшого використання результатів виконання Проекту в суспільній практиці.

Результати проекту мають широкий теоретичний та практичний інтерес для дослідників в галузях органічної хімії, біохімії, біології та медицини і можуть бути використані як стартові позиції подальших досліджень пригнічення функції ACE2 для вивчення біохімічних механізмів дії

вірусів та інфекцій та протидії їх наслідкам. Отримані зонди завдяки наявності ефективних методів синтезу, профілюванню та підтвердженій дії вже сьогодні можуть використовуватися для вивчення та моделювання процесів за участю ACE2. Безпосередньо автори проекту планують продовжити дослідження з подальшого вивчення ролі ACE2 та розробки нових іще більш ефективних речовин для впливу на нього.

Примітка: Анотований звіт не повинен містити відомостей, заборонених до відкритого опублікування

Науковий керівник Проєкту

Завідувач кафедри супрамолекулярної хімії, д.х.н., професор
Сергій Рябухін



(підпис)