ЗАТВЕРДЖУЮ
Директор Інституту молекулярної біології і генетики НАН України
академік НАН України
Михайло ТУКАЛО

(підпис)

М.П.

АНОТОВАНИЙ ЗВІТ
про виконану роботу в рамках реалізації проєкту
із виконання наукових досліджень і розробок
Розробка та тестування in vivo інгібіторів протеїнкінази С бета – ключового ферменту індукції нейтрофільних позаклітинних пасток (NETs) для запобігання гострого респіраторного дистрес синдрому (ARDS)
(назва Проєкту)

Назва конкурсу: Наука для безпеки людини та суспільства
Реєстраційний номер Проєкту: 2020.01/0517

Підстава для реалізації Проєкту з виконання наукових досліджень і розробок (реєстраційний номер та назва Проєкту) 2020.01/0517. Розробка та тестування in vivo інгібіторів протеїнкінази С бета – ключового ферменту індукції нейтрофільних позаклітинних пасток (NETs) для запобігання гострого респіраторного дистрес синдрому (ARDS)

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

1. ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ ПРО ПРОЄКТ

Тривалість виконання Проєкту:
Початок – 21 жовтня 2020 р.
(дата укладання Договору про виконання наукового дослідження і розробки)

Закінчення – 15 грудня 2021р.

Загальна вартість Проєкту, грн. 9 094 700,00

Вартість Проєкту по роках, грн.:
1-й рік 3 000 000,00 грн
2-й рік 6 094 700,00 грн

2. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ВИКОНАВЦІВ ПРОЄКТУ

до виконання Проєкту залучено 8 виконавців, з них:
доктори наук 1;
кандидати наук 5;
інші працівники 2.

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

ГРАНТООТРИМУВАЧ:
Інститут молекулярної біології і генетики (Відділ біомедичної хімії)
Державна організація
Підпорядкованість організації – Національна Академія Наук України
Код ЄДРПОУ – 05417101
Код(и) КВЕД – 72.11; 72.19

СУБВИКОНАВЕЦЬ:
Інститут фізіології ім. Богомольця НАН України (Відділ Загальної та молекулярної патофізіології)
Державна організація
Підпорядкованість організації – Національна Академія Наук України
Код ЄДРПОУ – 05417093
Код(и) КВЕД – 72.2; 72.11; 72.19

4. ОПИС ПРОЄКТУ

4.1. Мета Проєкту (до 200 знаків)

Розробка інгібіторів протеїнкінази С бета, як ключового ферменту активації нейтрофільних гранулоцитів із утворенням NETs та проведення експериментальної терапії ГРДС.

4.2. Основні завдання Проєкту (до 400 знаків)

Розробка фармакофорних моделей інгібіторів PKCB. Ідентифікація та спрямована оптимізація сполук, що блокують індуковане утворення NETs шляхом інгібування PKCB, за допомогою молекулярного докінгу, фармакофорного моделювання та біохімічного тестування. Моделювання ARDS у щурів. Експериментальна терапія ARDS у щурів із застосуванням оптимізованих сполук.

4.3. Детальний зміст Проєкту:

- Сучасний стан проблеми (до 400 знаків)

Гострий респіраторний дистрес синдром (ARDS) є безпосередньою причиною загибелі людей при ураженнях легень різного генезу, передусім, при інфікуванні коронавірусами. Головним патогенетичним механізмом запуску ARDS вважається активація нейтрофільних гранулоцитів з утворенням NETs. Перспективним напрямом контролю активності нейтрофільних гранулоцитів є інгібування протеїнкінази С бета.

- Новизна Проєкту (до 400 знаків)

В ході виконання мультидисциплінарного дослідження, за допомогою молекулярного моделювання та біологічного тестування, будуть вперше розроблені перспективні препарати проти ARDS з механізмом дії через інгібування PKCB і блокування утворення NETs.

- Методологія дослідження (до 400 знаків)

Фармакофорний скринінг, молекулярний докінг, імуноферментний аналіз (ELISE), спектрофлуориметрія, експресія генів, флуоресцентна мікроскопія, світлова мікроскопія та морфометрія.

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

5.1. Опис наукових або науково-технічних результатів, отриманих в рамках виконання Проєкту (із зазначенням їх якісних та кількісних (технічних) характеристик)

Розроблено ліганд-орієнтовані фармакофорні моделі інгібіторів протеїнкінази PKCB людини на основі інгібітора бісіндолілмалеїміду з комплексу з PKCB (PDB ID: 2I0E) і 13 відомих інгібіторів цього ензиму з найвищою інгібувальною активністю. Також було проведено оптимізацію знайдених моделей шляхом комбінації різних фармакофорних точок. Моделі валідовано – вони ідентифікують активні інгібітори з тестової вибірки, відсоток правильно знайдених сполук становить більше 60%.

За результатами фармакофорного скринінгу колекції більше 150000 лігандів відносно розроблених фармакофорних та молекулярного докінгу цієї ж колекції в АТФ-зв'язуючий сайт PKCB відібрано 48 кращих сполук по обох скринінгах для біологічного тестування. Ці сполуки перевірено на здатність пригнічувати активність утворення нейтрофільних пасток порівняно з PMA-активованими пробами, а також на здатність інгібувати PKCB в системі *in vitro*. Показано ефективність трьох низькомолекулярних сполук. Для найбільш активних сполук було досліджено дозозалежність. Найбільш активна сполука інгібує протеїнкіназу С бета на 71% при концентрації 0,1 мкМ.

Проведено моделювання ГРДС у щурів. Показано, що моделювання ГРДС за допомогою інтратрахеального введення PolyI:C і гіпервентиляції призводить до збільшення опору верхніх дихальних шляхів, а також зменшення їх розтяжності і зниження тканинної еластичності. Цей вплив супроводжувався змінами концентрації вільної ДНК у бронхолегеневому лаважі, а також у плазмі крові щурів із ГРДС порівняно із щурами з вдаваним втручанням, що пов'язано із збільшенням формування нейтрофільних екстрацелюлярних пасток.

При моделюванні ГРДС виявлено підвищення рівня НЕТозу у виділених нейтрофільних гранулоцитах дослідних тварин. Крім того, їх стимуляція давала більш виражений НЕТоз порівняно з контрольною групою.

Доведено, що рівень експресії генів, що кодують TNF-α, IL-6, IL-10 достовірно підвищувався в моделі ГРДС. Всі вищезазначені зміни супроводжувалися значними відмінностями морфологічної картини тканин легень, що мали особливості, характерні для початкових стадій розвитку гострого респіраторного дистрес синдрому.

Було проведено оптимізацію знайдених сполук хітів з використанням методів молекулярного моделювіання, а саме молекулярного докінгу, фармакофорного моделювання та методів машинного навчання.

Дві сполуки, які показали найкращу інгібувальну здатність, були використані для експериментальної терапії ГРДС у щурів. Терапія щурів знайденими сполуками попереджує морфологічні зміни в структурі паренхіми легень та, як результат, зменшення набряку внаслідок 4 годинної гіпервентиляції.

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

Вперше ідентифіковано сполуки-хіти, що пригнічують утворення нейтрофільних пасток шляхом інгібування PKCB.

Знайдені інгібітори PKCB зменшують структурні пошкодження внаслідок запальних процесів, що можуть протікати при ураженні легень.

Розроблені фармакофорні моделі інгібіторів PKCB поєднують в собі роботу з вагами фармакофорних точок, оптимізацію радіусів фармакофорних точок та застосування підходу QSAR на основі молекулярних дескрипторів.

Нові експериментальні моделі ГРДС розширюють розуміння протікання цього патогенезу.

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

Відлаштовані методології оцінки параметрів респіраторної та механічної функції легень на приладі примусової вентиляції легень, визначення активності НЕТозу за допомогою флюоресцентної мікроскопії, флюорометричного визначення вмісту вільної ДНК у бронхолегеневому лаважі та плазмі крові щурів, оцінки ультраструктурних змін у легенях методом світлової мікроскопії можуть бути використані фармацевтичними компаніями в розробці нових лікарських препаратів. Всі методики і моделі є у відкритому доступі для наукової спільноти і можуть стати в нагоді науковцям, що досліджують ГРДС.

Ідентифіковані сполуки-хіти, що пригнічують утворення нейтрофільних пасток шляхом інгібування PKCB. Знайдені сполуки було оптимізовано та використано в експериментальній терапії щурів із змодульованим ГРДС. Таким чином дані сполуки можуть бути основою для розробки препаратів для лікування ГРДС, зокрема при COVID-19.

Також ці сполуки можуть застосовуватися науковими лабораторіями світу, що займаються дослідженням структури та функцій PKCB та NETs.

Розроблені фармакофорні моделі інгібіторів PKCB можуть багаторазово використовуватися різними науковими лабораторіями для скринінгів будь-яких колекцій сполук з метою отримання сполук, що блокують індуковане утворення NETs шляхом селективного інгібування PKCB.

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

У результаті виконання роботи розроблені ліганд-орієнтовані фармакофорні моделі інгібіторів PKCB і сполуки-хіти, що пригнічують утворення нейтрофільних пасток шляхом інгібування PKCB. Ці дані можуть бути використані:

1. Для з'ясування функцій протеїнкінази PKCB на рівні мережі сигнальних шляхів клітини;
2. Для вивчення механізмів виникнення ARDS в яких бере участь протеїнкіназа PKCB;
3. Ідентифіковані сполуки-хіти, що пригнічують утворення нейтрофільних пасток шляхом інгібування PKCB та зменшують деструктивні зміни в паренхімі легень щурів, тому можуть бути основою для подальшої оптимізації та розробки препаратів для лікування ГРДС, зокрема при COVID-19;
4. Розроблені фармакофорні моделі інгібіторів PKCB – це інструмент молекулярного моделювання, який може багаторазово використовуватися для скринінгів будь-яких колекцій сполук з метою отримання нових хімічних класів інгібіторів PKCB.

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

Науковий керівник Проєкту
д.х.н., проф., завідувач відділу
біомедичної хімії
Сергій ЯРМОЛЮК

(підпис)