

ЗАТВЕРДЖУЮ  
Директор Державної установи  
«Інститут харчової біотехнології та геноміки

\* НАН України

академік НАН України

Ярослав БЛЮМ

(Власне ім'я та ПРІЗВИЩЕ)

Ідентифікаційний код 021285100000

М.П.

(підпись)

**АНОТОВАНИЙ ЗВІТ  
про виконану роботу в рамках реалізації проекту**

**із виконання наукових досліджень і розробок**

«Створення нових ефективних інгібіторів формування Z-кільця з метою отримання  
протитуберкульозних препаратів антимітотичної дії / reation of new effective inhibitors of Z-ring  
formation inorder to obtain anti-tuberculosis drugs with antimitotic action»  
(назва Проекту)

**Назва конкурсу:** «Наука для безпеки людини та суспільства»

**Реєстраційний номер Проекту:** 2020.01/0357

**Підстава для реалізації Проекту з виконання наукових досліджень і розробок** (реєстраційний  
номер та назва Проекту) реєстраційний номер №2020.01/0357, «Створення нових ефективних  
інгібіторів формування Z-кільця з метою отримання протитуберкульозних препаратів  
антимітотичної дії / Creation of new effective inhibitors of Z-ring formation inorder to obtain anti-  
tuberculosis drugs with antimitotic action»

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

Початок – 21 жовтня 2020 р.

(дата укладання Договору про виконання наукового дослідження і розробки)

Закінчення – 15 грудня 2021 р.

Загальна вартість Проекту, грн. 3019500,00 грн

Вартість Проекту по роках, грн.:

1-й рік 801100,00 грн.

2-й рік 2218400,00 грн.

**2. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ВИКОНАВЦІВ ПРОЄКТУ**

до виконання Проекту залучено 11 виконавців, з них:

доктори наук 2;

кандидати наук 9;

інші працівники 0.

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

Державна Установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України»

Організаційно-правова форма підприємства/установи/організації - Державна організація (установа, заклад, підприємство)

Підпорядкованість підприємства/установи/організації - Національна академія наук України

Код ЄДРПОУ 02128514

Код(и) КВЕД 72.11; 72.19

Стратегічні напрями наукової діяльності

- Вивчення молекулярно-біологічних і клітинно-біологічних механізмів життедіяльності рослинних клітин на основі розвитку структурної та функціональної геноміки і біоінформатики рослин, структурної біології та молекулярної генетики.
- Розробка нових молекулярних біотехнологій та нанобіотехнологій рослин і прокаріотичних систем; розробка наукових засад ресурсозаощаджувальних технологій переробки сільськогосподарської сировини, одержання нових видів харчових продуктів та отримання біопалива з біомаси.
- Розробка наукових засад ресурсозаощаджувальних технологій переробки сільськогосподарської сировини, одержання нових видів харчових продуктів та отримання біопалива з біомаси.
- Розробка біотехнологій виробництва продуктів харчування, їх складових та біологічно активних компонентів, молекулярногенетичних і біохімічних методів фітосанітарного, медико-біологічного контролю продовольчої сировини, харчових добавок, продуктів і кормів та наукових засад біобезпеки.

ПІБ керівника підприємства/установи/організації - Блюм Ярослав Борисович

Юридична адреса підприємства/установи/організації  
Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2А

Поштова адреса  
Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2А

Фактична адреса  
Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2А  
Телефон +380444630532  
Адреса електронної пошти [office.ifbg@nas.gov.ua](mailto:office.ifbg@nas.gov.ua)  
Посилання на веб сторінку підприємства/установи/організації <http://ifbg.org.ua/uk>

### **4. ОПИС ПРОЄКТУ**

Туберкульоз є інфекційним захворюванням, яке поступово набуло критичних соціальних ознак як в Україні, так і по всьому світі. Розробка нових ефективних ліків проти туберкульозу, особливо спрямованих на резистентні штамі мікобактерії, є нагальною потребою світового рівня. З фармакологічної точки зору найбільш доцільним є ідентифікація принципово нових лікарських засобів, дія яких буде спрямована на найбільш унікальні білки представників роду *Mycobacterium*. В ідеалі сполуки, рекомендовані до використання у клінічній практиці мають бути спрямовані на найбільш унікальні молекулярні мішені, які відіграють найбільш помітну роль у фундаментальних процесах життедіяльності мікобактерії. Не менш важливим фактором є відсутність очевидних

гомологів цільових мішеней у людини і тварин через можливість суттєвого токсичного впливу на організм пацієнта.

Епідеміологічною рисою мікобактерій є здатність до враження різних видів ссавців. Канонічний збудник туберкульозу людини (*Mycobacterium tuberculosis*) належить до комплексу ТВ-бактерій (т.з. «*Mycobacterium tuberculosis complex*»), до якої також належить збудник туберкульозу великої рогатої худоби (*Mycobacterium bovis*). Підтверджено, що *M. bovis* викликає близько 8% випадків туберкульозу людини, що підтверджує значну подібність зазначених видів. Натомість *M. bovis* вважається більш безпечним та зручним для проведення доклінічних досліджень.

Унікальний мультидисциплінарний склад виконавців проекту та специфіка молекулярних мішеней надасть можливість подолати проблему мультирезистентності *M. tuberculosis* і *M. bovis*. За результатами проекту із використанням методів *insilico*, *invitro* та *insitu* буде розроблено алгоритм визначення цільових білків *M. tuberculosis* і *M. bovis* та пошуку відповідних хімічних сполук-ефекторів.

Враховуючи попередній досвід зазначеної групи, основну увагу буде надано білку мітотичного апарату мікобактерії – FTsZ та асоційованим безпосередньо з ним білками.

Біоінформатична частина роботи буде включати до себе структурно-біологічні дослідження мітотичного апарату мікобактерії. Після біоінформатичного аналізу сайтів ліганд-білкової взаємодії буде виконано реконструкцію цільових білків та їх комплексів з референтними сполуками для наступного фармацевтичного пошуку та верифікації результатів докінгу. Пошук потенційних ефекторів буде здійснюватися серед бібліотек, що входять до складу доступних комерційних баз даних ІФЛАБ, Єнамін та Укроргсинтез.

Спектрофотометричний аналіз полімеризації, ГТФ-азної активності та біохімічна оцінка реакційної суміші буде здійснюватися на всіх етапах *invitro* досліджень. Кожний етап досліджень включатиме як обчислювальну, так і біохімічну складову. Отримані результати будуть використані для визначення наступного напрямку органічного синтезу. Доведена взаємодія цільових білків із визначеними сполуками стане відправною точкою стратегії раціонального дизайну та комбінаторного синтезу похідних. Аналіз структурних комплексів із застосуванням хемоінформатичних методів та візуальної ревізії міжмолекулярних зав'язків є дозволяє виконати відбір умов та методів органічного синтезу. Кожний етап досліджень передбачає ротацію зазначених протоколів та проведення проміжного скринінгу протимікробної дії відібраних лідерів шляхом тестування на вакцинному штамі *M. bovis* (BCG) із характеристикою ADMET параметрів речовин. Визначення мінімальної концентрації інгібування за методом ступеневого зниження концентрації дозволить оцінити ефективність сполук. Останнім етапом проекту буде тестування 10-20 відібраних сполук-лідерів на існуючих музейних та польових штамах *Mycobacterium*. Практична цінність результатів полягає у отриманні нових селективних класів сполук, на які відсутня резистентність *Mycobacterium*. Зазначені сполуки будуть об'єктом подальшого впровадження і патентування як перспективні діючі речовини створення протитуберкульозних препаратів нового покоління.

**4.1. Мета Проекту**(до 200 знаків)Пошук нових інгібіторів механізму клітинного поділу збудників туберкульозу, орієнтованих на унікальні молекулярні мішені мітотичного апарату мікобактерій, що здатні викликати летальні конформаційні зміни цільових білків.

**4.2. Основні завдання Проекту** (до 400 знаків)

- визначення пріоритетних мішеней *M. tuberculosis* та *M. bovis*;
- скринінг поверхні мішеней та пошук сайтів зв'язування ефекторів і їх похідних;
- реконструкція ліганд-білкових комплексів;
- спектрофотометричне і біохімічне підтвердження взаємодії білок/хіт;
- скринінг протимікробної дії відібраних сполук-лідерів;
- визначення мінімальної інгібуючої концентрації сполук-лідерів;
- тестування 10-20 відібраних сполук-лідерів на вибраних штамах.

**4.3. Детальний зміст Проекту:**

- Сучасний стан проблеми (до 400 знаків) За офіційними даними МОЗ України епідемія туберкульозу триває з 1995 року і охоплює всі області країни. Ефективність лікування хвороби складає менше ніж 80%, тоді як токсичність лікарських засобів призводить до численних побічних ефектів. Зважаючи на це, розробка нових ефективних інгібіторів цільових мішеней мікобактерії, які зберігають максимальну консервативність і водночас не мають очевидних гомологів у людини є нагальною потребою міжнародного рівня.

- Новизна Проекту (до 400 знаків) Нова стратегія лікування туберкульозу передбачає відмову від старих методів і корекцію базових протоколів. Водночас специфіка спектру запланованих молекулярних мішеней створює можливість подолання існуючої проблеми мультирезистентності мікобактерій з використанням *insilico*, *invitrotainsitu* підходів. Запропонована комбінація досліджень дозволяє скоротити матеріальні і часові витрати, потрібні для розробки і пошуку нових препаратів.

- Методологія дослідження (до 400 знаків) Алгоритм та методи основані на протоколі ВО CSLabGrid з супроводом *invitro* або *insitu* верифікації результатів та IT-підтримки. *Denovo* конструювання інгібіторів та біохімічна верифікація буде проведена за допомогою методів аналітичної та органічної хімії, зокрема йонобмінної хроматографії та спектрофотометрії. Тестування *invitro* являтиме собою визначення чутливості вакцинного штаму *M.bovis* до відібраних хімічних речовин.

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

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

В результаті виконання проекту було встановлено залежність між прогнозованою активністю речовин і силою міжмолекулярних взаємодій з цільовими мішенями маючи за мету - виявити нові можливі інгібітори. Проведена симуляція багаторазової молекулярної динаміки дозволила обрати та верифікувати стабільні комплекси сполук-лідерів з наступними білками-мішенями: FtsZ, CysK1, CysM, BioA, FALL, aroK, FBA, alr, RmlC, blaC, IrhE, PanC і DrpE та встановити особливості ліганд-білкових відносин. Аналіз білок-білкових взаємодій обраних мішеней дозволив побудувати схему взаємодій між ними та обрати мішенні впливу на цитоскелет, окрім FtsZ. Комп'ютерні дослідження вірогідної токсикологічної дії сполук-кандидатів (ADMET), створення і валідація QSAR моделей на основі відомих та отриманих даних по ефективності хімічних сполук дозволили сформувати кінцевий сет для подальшої верифікації *in vitro*.

За результатами біохімічної перевірки властивостей потенційних інгібіторів проти FtsZ-білків та сульфгідрилаз мікобактерій було відібрано ряд біологічно активних сполук. Найбільш перспективними інгібіторами ГТФазної активності рекомбінантного FtsZ *M.tuberculosis*, відповідно і полімеризації FtsZ у мікротрубочки, стали сполуки Z65190667 та Z1574680729, найвищий рівень інгібування від яких спостерігався у всіх 3х досліджуваних концентраціях: 1 мкг/мл, 10 мкг/мл та 100 мкг/мл. З менш вираженою ефективністю проявляли свої інгібувальні властивості сполуки Z1567270599, Z2589562532 та Z141584328. І нарешті, з найменш вираженою ефективністю інгібували ГТФазну активність рекомбінантного протеїну FtsZ *M.tuberculosis* сполуки Z2381723313 та Z2873191210. Тоді, як у випадку ферменту найбільш ефективно інгібувала сульфгідрилазну активність сполука Z64576265 (більш ніж у 2 рази у концентрації 10 мг/мл та майже у 6 разів за концентрації 100 мг/мл). Відчутно менш ефективною стала сполука KS13384. І нарешті найменш дієвою, але із мінімальним ефектом у найвищих концентраціях виявилися сполуки C201-1785 та Z1759934893.

Проведено перевірку протимікробної дії рифампіцину, стрептоміцину та 87 нових відібраних хімічних сполук по відношенню до вакцинного штаму *M.bovis* після 5 тижнів інкубування. Чистота штамів впродовж усіх досліджень була під контролем ПЦР-тестів. У сумнівних випадках інтерпретації результатів інгібууючої дії хімічних сполук або нехарактерного росту культури вакцинного штаму *M.bovis* було проведено мікроскопічні дослідження.

Так за результатами випробувань біоінформатично-визначеної групи речовин *in vitro* на вакцинному штамі *M. bovis* було встановлено виражену інгібуючу дію для речовин Z65190667, Z1574680729 у концентраціях від 2,5 мкг/мл до 80 мкг/мл, для речовин Z2589562532, Z141584328, Z1567270599 та Z2873191210 у концентраціях 40 мкг/мл та 80 мкг/мл. Помірну інгібуючу дію виявлено у речовини Z232378082 при концентрації 80 мкг/мл, у речовин Z105863984 та Z175993489 при концентрації 40 мкг/мл, для речовини Z2381723313 починаючи із концентрації 10 мкг/мл і для речовини Z2599752817 починаючи з концентрації 20 мкг/мл. Крім того за концентрації 40 мкг/мл виявлено інгібуючу дію у речовини Z64576265 мішеню якої є білок CysK1 та речовини KS13384 в діапазоні концентрацій від 8 мкг/мл до 40 мкг/мл.

Тож узагальнення результатів дослідження протимікробної дії свідчить про 13 нових інгібіторів перевірених на патогенному штамі мікобактерій та запропонованих для подальшої лід оптимізації.

На основі реконструйованих QSAR моделей білків, аналізу точності і селективності новостворених інструментів відбору хітів було оптимізовано протокол синтезу похідних лідерних сполук із протитуберкульозною активністю (імідазопіридин, триазолопіридин, дигідробензопірано[2,3-с]піразол, сечовин, тощо) та отримано бібліотеку похідних скаффолдів SK1-7.

Неважаючи на проведений аналіз поширення туберкульозу в Україні в період 2001-2020 року, заплановані спроби виділення польового штаму *M. bovis* з ґрунту і води раніше проблемних тваринницьких господарств Київської області, були невдалі. Імовірно це свідчить про належну профілактику туберкульозу у тварин. Епізоотологічна ситуація з туберкульозу має спільну тенденцію до зниження кількості зареєстрованих випадків. І хоча туберкульоз великої рогатої худоби ліквідований в Україні з 2016 р. за даними Держпродспоживслужби України, туберкульоз людей залишається захворюванням із значно перевищеним епідемічним порогом та дуже повільною тенденцією до зменшення показників захворюваності і летальності.

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

Перевага отриманої наукової продукції полягає у новизні досліджень та поєднанні різних методологічних підходів дослідження, а саме заалучення до структурно-біологічного аналізу методів хімічного, мікробіологічного та молекулярно-генетичного напрямку. Вперше буде досліджено протимікробну чутливість розроблених та синтезованих хімічних сполук до вакцинного та патогенного штамів *Mycobacterium* на культурі мікобактерій *in vitro*. Комплексність методологічних підходів дасть можливість отримати нові дані щодо протитуберкульозної активності нових хімічних сполук та особливості використання нових препаратів на їх основі проти збудника туберкульозу.

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

Практична цінність запланованих результатів полягає у отриманні нових більш селективних класів сполук до ключових ферментних мішеней, на які ще потенційно немає резистентності у *M. tuberculosis* та *M. bovis*. У 2020-му році за результатами структурно-біологічного аналізу було синтезовано перші представники імідазольного та анельзованих з імідазолом гетероциклічних систем, найбільш перспективні функціональні піперазинові замісники, що дозволяє у 2021 році продовжити синтез відібраних хітів, а також проводити подальшу модифікацію сполук, зокрема піролідонового циклу новими функціоналізованими амінами. Враховуючи відсутність резистентності у мікобактерій до цих препаратів зменшиться кількість випадків рецидивів.

Припускаємо, що отримані результати матимуть економічний ефект за рахунок зменшення ціни ліків нового покоління і кількості побічних ефектів та/або скорочення тривалості лікування пацієнтів, хворих на туберкульоз. У кінцевому підсумку використання нових підходів до ефективного лікування туберкульозу покращить якість життя та зменшить смертність від цієї хвороби.

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

Отримані результати щодо протимікробної дії хімічних речовин до вакцинного та патогенного штамів *Mycobacterium*, які будуть отримані в ході виконання проекту можна буде використати для створення нових препаратів для лікування туберкульозу.

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

#### **Науковий керівник Проєкту**

Завідувач лабораторії біоінформатики та  
структурної біології ДУ ІХБГ НАНУ,  
старш. наук. спів., д.б.н.  
(посада)

Павло КАРПОВ

(Власне ім'я та ПРІЗВИЩЕ)

(підпись)

