



ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з наукової роботи
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка

Ганна ТОЛСТАНОВА

АНОТОВАНИЙ ЗВІТ

про виконану роботу в рамках реалізації проєкту із виконання наукових досліджень і розробок

«Протикоронавірусна активність водорозчинних C_{60} фулеренів у створенні нових прототипів профілактичних і терапевтичних препаратів: *in silico*, *in vitro* та *in vivo* скринінги»

Назва конкурсу: «Наука для безпеки людини та суспільства»

Реєстраційний номер Проєкту: 2020.01/0044 Підстава для реалізації Проєкту з виконання наукових досліджень і розробок (реєстраційний номер та назва Проєкту) 2020.01/0044;

«Протикоронавірусна активність водорозчинних C_{60} фулеренів у створенні нових прототипів профілактичних і терапевтичних препаратів: *in silico*, *in vitro* та *in vivo* скринінги»

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

Тривалість виконання Проєкту:

Початок – 27.10.2020 року

Закінчення – 15.12.2021 року

Загальна вартість Проєкту, грн. **2 840 887** грн.

Вартість Проєкту по роках, грн.:

1-й рік - 900 687

2-й рік - 1 940 200

2. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ВИКОНАВЦІВ ПРОЄКТУ

до виконання Проєкту залучено 13 виконавців, з них:

доктори наук 3;

кандидати наук 5;

інші працівники 5.

Виконавці проєкту (Київський національний університет імені Тараса Шевченка, грантоотримувач)

1. Прилуцький Юрій Іванович, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини», професор кафедри біофізики та медичної інформатики, д.ф.-м.н., проф., заслужений діяч науки і техніки України, керівник проєкту

2. Черепанов Всеволод Володимирович, Інститут фізики НАН України, с.н.с., к.ф.-м.н.

3. Платонов Максим Олегович, Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, н.с., к.б.н.

4. Прилуцька Світлана Володимирівна, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, хімічний факультет, с.н.с., д.б.н.

5. Гурмач Василь Васильович, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ІВТ, м.н.с., к.б.н.

6. Завальний Дмитро Костянтинівич, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини», аспірант

Виконавці проєкту (Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ), субвиконавець)

1. Клестова Зінаїда Сергіївна, ДНКІБШМ, заступник директора, зав. відділу біотехнології та контролю якості противірусних препаратів, д.в.н., проф.
2. Ватліцова Ольга Станіславівна, ДНКІБШМ, зав. лабораторії стандартизації і контролю ветеринарних імунобіологічних препаратів, к.б.н.
3. Вороніна Алла Костянтинівна, ДНКІБШМ, зав. лабораторії імуноферментного аналізу, імунних сироваток, противірусних факторів та алергенів, к.б.н.
4. Кузьмич Ганна Степанівна, ДНКІБШМ, н.с. сектору культур клітин
5. Сичова Олена Володимирівна, ДНКІБШМ, біолог I-ї категорії
6. Ющенко Алла Юріївна, ДНКІБШМ, м.н.с.
7. Дремух Юлія Юріївна, ІВМ НААН України, аспірантка

3. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ГРАНТООТРИМУВАЧА ТА ОРГАНІЗАЦІЮ СУБВИКОНАВЦЯ ПРОЄКТУ

Організація грантоотримувач

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

ЄДРПОУ 02070944

КВЕД 72.11

Відомча підпорядкованість – МОН України

01033 м. Київ, вул. Володимирська, 60

Організація субвиконавець

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

ЄДРПОУ 19024865

КВЕД 72.11; 72.19

Відомча підпорядкованість - ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ З ПИТАНЬ БЕЗПЕЧНОСТІ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ ТА ЗАХИСТУ СПОЖИВАЧІВ

03151, м. Київ, вул. Донецька, 30

4. ОПИС ПРОЄКТУ

4.1. Мета Проєкту (до 200 знаків)

Оцінити протикоронавірусну активність водорозчинних C_{60} фулеренів у системах *in vitro* та *in vivo*, з'ясувати механізми їх дії за використання молекулярного моделювання для розробки нових терапевтичних засобів проти коронавірусів.

4.2. Основні завдання Проєкту (до 400 знаків)

1. Приготувати водний розчин C_{60} фулерену (C_{60} ВРФ), дослідити його структуру і стабільність.
2. Дизайн потенційних комплексів між C_{60} фулереном та протеїнами-мішенями у складі коронавірусів і чутливих до них клітин різних органів.
3. Оцінити *in vitro* та *in vivo* протикоронавірусну активність C_{60} ВРФ у профілактичних і терапевтичних схемах застосування.

4.3. Детальний зміст Проєкту:

- Сучасний стан проблеми (до 400 знаків)

Спалах Covid-19 стимулював дослідження як його збудників, так і потенційних інгібіторів/кілерів. Відтак проблема нейтралізації активності коронавірусу потребує детального вивчення його структурної організації - складових частин, які беруть участь у взаємодії з клітинами-мішенями різних органів людей та механізмах розмноження вірусу в клітині-мішені.

- Новизна Проєкту (до 400 знаків)

Нанобіотехнології здатні вирішити численні клінічні проблеми медицини, що виникли внаслідок пандемії Covid-19. Відтак новизною проєкту є проведення модельних та експериментальних досліджень водорозчинних C_{60} фулеренів як потенційних терапевтичних засобів проти коронавірусів. Як апатогенну для людини дослідну модель буде використано вірус великої рогатої худоби, який як і вірус SARS-CoV-2 відноситься до групи β -коронавірусів.

- Методологія дослідження (до 400 знаків)

Приготування і характеризування водного розчину C_{60} фулерену за допомогою ультразвукової технології, мікроскопічних і спектроскопічних методів. Дизайн комплексів між C_{60} фулереном та протеїнами-мішенями коронавірусів і чутливих до них клітин різних органів за допомогою методів молекулярної динаміки і докінгу. Визначення токсичності C_{60} фулеренів, їх протикоронавірусної активності за різних схем застосування (віруліцидна, профілактична, лікувальна).

5. ОТРИМАНІ НАУКОВІ АБО НАУКОВО-ТЕХНІЧНІ РЕЗУЛЬТАТИ (до 2 сторінок) 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)

Приготовлено та охарактеризовано водний розчин C_{60} фулеренів (C_{60} ВРФ) за використання оригінальної ультразвукової технології, мікроскопічних (СЕМ, СТМ, АСМ) та спектроскопічного (ДРС) методів. Так, результати ДРС засвідчили, що свіжоприготовлений C_{60} ВРФ (концентрація 0,15 мг/мл) є типовим колоїдним розчином, у якому переважно містяться сферичні наночастинки з гідродинамічним діаметром ~ 50 нм. Значення дзета-потенціалу для C_{60} ВРФ складало -27,0 мВ, що свідчить про його високу стабільність. Здійснено дизайн потенційних комплексів « C_{60} -протеїн коронавірусу SARS-CoV-2» в імітованому клітинному середовищі за використання методів молекулярної динаміки (МД) та докінгу. Так, для RdRp та 3CLpro протеїнів ідентифіковано чотири сайти зв'язування із C_{60} фулереном: три (1. кишень розміщена у каналі синтезу РНК; 2/3. різні частини інтерфейсу зв'язування RdRp-Nsp8) та одна (кишень розміщена біля каталітичної діади (Cys145 та His41) на стику структурних доменів 3CLpro), відповідно. Відповідно до результатів молекулярного докінгу C_{60} фулерен повністю заповнює відібрані сайти зв'язування протеїну RdRp і, більш того, є затиснутим там різноманітними стекінг та стеричними взаємодіями. За результатами МД ключові взаємодії з RdRp зберігаються для усіх сайтів зв'язування. Для протеїнів 3CLpro і RdRp оцінили енергію зв'язування із C_{60} фулереном за використання методів MMPBSA та MMGBSA. Здійснено дизайн потенційних нанокластерів C_{60} фулерену у воді та проаналізовано їх здатність таргетувати протеїни RdRp та 3CLpro і, таким чином, пригнічувати функціональну активність коронавірусу SARS-CoV-2. Проаналізована структура рецепторного білка ACE2 щодо його можливих механізмів зв'язування із C_{60} фулереном. Зокрема, виявлено три потенційних сайти зв'язування між жолобком PD (пептидазний домен) білка ACE2 і C_{60} фулереном, які характеризуються присутністю у своїй структурі амінокислот, здатних утворювати міцні стекінг або катіон- π взаємодії з окремим C_{60} фулереном або з таким у складі нанокластера. Здійснено дизайн потенційних комплексів « C_{60} -ACE2» в імітованому клітинному середовищі за використання методів молекулярної динаміки (МД) та докінгу. Доведено, що C_{60} фулерен здатний утворювати стабільні комплекси з ACE2 протеїном, а відтак - пригнічувати його функціональну активність, що важливо для блокування взаємодії ACE2 із S-протеїном SARS-CoV-2. Оцінено здатність C_{60} фулерену/його нанокластера проникати через ліпідну мембрану. Відповідно до результатів МД передбачається, що C_{60} фулерени у складі нанокластерів здатні утворювати пори в оболонці коронавірусу SARS-CoV-2, руйнуючи таким чином цілісність його структури, що веде до порушення мембранозалежних стадій циклу реплікації цього вірусу.

Були підготовлені перещеплювані культури клітин (КК): нирки вівці (НВ), свиної нирки ембріональна версенна лінія (СНВБ), новонародженого сирійського хом'яка (ВНК-21), первинні КК курячих ембріонів (КЕ). Моношар клітин формували на 24 год зі збереженням видових характеристик. Адаптовані *in vitro* та *in ovo* коронавіруси тварин: великої рогатої худоби (ВРХ),

інфекційного бронхіту курей (ІБК) і трансмісивного гастроентериту свиней (ТГС). Вивчена їх цитопатична *in vitro* та ембріотоксична *in ovo* дія у 9-10 добових КЕ та їх клітинах: нирки (НЕК) та фібробластах (ФЕК). Титр вірусу ТГС у КК ВНК-21 становив $7,50 \pm 0,22 \lg \text{TCD}_{50}/\text{см}^3$. Титр інфекційної активності коронавірусу ВРХ у НВ складав $7,5 \lg \text{TCID}_{50}/\text{см}^3$, титр вірусу ІБК - $6,7 \lg \text{EID}_{50}/\text{см}^3$. Інфекційна активність штаму вірусу ІБК «QX» складала $6,87 \lg \text{EID}_{50}/\text{см}^3$. Наявність вірусу підтверджена, окрім серологічних реакцій, просвічувальною електронною мікроскопією високої роздільної здатності. У КК ВНК-21 гранично допустима цитотоксична концентрація (МДК) C_{60} фулерену становила $37,5 \pm 3,0$ мкг/мл, у КК НВ - 40,0 мкг/мл. У КЕ концентрації C_{60} фулерену 75; 40; 37,5; 35; 30; 25; 20; 18,75; 9,4 мкг/мл не викликають місцево-подразнюючої дії. Для визначення МДК у КЕ вводили C_{60} ВРФ по 150 мкг/мл на ембріон. МДК у КЕ складає >30 мкг/ембріон. Визначено протикоронавірусну ефективність C_{60} фулерену у профілактичній та лікувальній схемах застосування на курчатах. Результати дослідження *in vivo* продемонстрували, що відсоток тварин з клінічними проявами ІБК був менший порівняно з контрольною групою інфікування на 50% у лікувальній схемі застосування C_{60} ВРФ та на 37,5% - у профілактичній схемі. Важливо, що клінічні ознаки захворювання на ІБК у групі тварин, які отримували C_{60} ВРФ, зникали на ранніх етапах спостереження. Відмічено позитивну динаміку приросту маси тіла птахів, яким вводили 1 мл C_{60} ВРФ (0,15 мг/мл) порівняно з контрольною групою інфікування. Встановлено, що за перорального введення C_{60} ВРФ у максимально допустимому об'ємі самцям та самицям щурів клінічних симптомів інтоксикації не виявлено, загинув тварин не реєстрували. Згідно результатів клініко-лабораторних досліджень крові тварин за перорального введення C_{60} ВРФ (0,15 і 0,6 мг/кг маси тіла) упродовж 35 діб не виявлено порушень біохімічних параметрів сироватки крові, що характеризують стан печінки та нирок, білковий, вуглеводний та ліпідний метаболізм в організмі щурів, а також змін гематологічних показників периферичної крові. Макроскопічні дослідження внутрішніх органів щурів показали відсутність патологічних змін за перорального введення C_{60} ВРФ.

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

Науково-технічна продукція відсутня.

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

Проєкт не передбачає проведення прикладних наукових досліджень і науково-технічних розробок.

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

Отримані результати проєкту носять фундаментально-прикладний характер, які можна використовувати у подальшій науковій діяльності та прикладних розробках, а також навчальному процесі закладами вищої освіти України біомедичного профілю. Зокрема, розробка інноваційних технологій щодо застосування лікувально-профілактичних препаратів із використанням наносполук, а саме водорозчинних C_{60} фулеренів, слугуватиме покращенню системи біобезпеки України як для гуманної медицини, так і ветеринарної галузі та матиме соціальне значення у профілактиці і боротьбі з коронавірусними інфекціями людей і тварин.

Науковий керівник Проєкту

Професор кафедри біофізики та медичної інформатики

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Київського національного університету імені Тараса Шевченка

Юрій ПРИЛУЦЬКИЙ

(підпис)