

ЗАПИТ
на проведення наукової (науково-технічної) роботи

1. Назва роботи

Імобілізація експериментальних протипухлинних препаратів на полі-2-оксазоліновому носію для долання набутої резистентності злоякісних клітин до хіміотерапії in vitro та in vivo

2. Вид тематики

II. Програмно-цільова та конкурсна тематика НАН України

3. Назва цільової програми або цільового проєкту

Цільова програма фундаментальних досліджень НАН України «Перспективні фундаментальні дослідження та інноваційні розробки наноматеріалів і нанотехнологій для потреб промисловості, охорони здоров'я та сільського господарства» на 2020–2024 рр.

4. Назва розділу програми або напряму цільового проєкту

Розділ 4. Нанобіотехнології та наноматеріали медичного та сільськогосподарського призначення

4.2. Біосумісні наноструктурні матеріали: керовані системи доставки, взаємодія з біологічними системами, безпека використання

5. Строки виконання роботи

01 квітня 2020 р. - 31 грудня 2024 р.

6. Код програмної класифікації видатків

6541030 (фундаментальні дослідження)

7. Пріоритетний напрям розвитку науки і техніки

Фундаментальні наукові дослідження з найбільш важливих проблем розвитку науково-технічного, соціально-економічного, суспільно-політичного, людського потенціалу для забезпечення конкурентоспроможності України у світі та сталого розвитку суспільства і держави

8. Пріоритетний тематичний напрям наукових досліджень і науково-технічних розробок

Фундаментальні проблеми наук про життя та розвиток біотехнологій

9. Код та назва наукового напряму (проблеми) з Основних наукових напрямів та найважливіших проблем фундаментальних досліджень у галузі природничих, технічних і гуманітарних наук

2.2.4.4. Вивчення впливу наночастинок і нанокompatивів на метаболізм нормальних і пухлинних клітин та розробка підходів до таргетної терапії

10. Науковий керівник роботи

Стойка Ростислав Стефанович, член-кореспондент НАН України, д.б.н., проф., завідувач відділу, Інститут біології клітини НАН України
телефон: +38 032 261 2287; факс: +38 032 261 2148; e-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua

11. Відповідальні виконавці

Прізвище, ім'я та по батькові	Науковий ступінь, посада, місце роботи, телефон, електронна адреса	Підпис
Панчук Ростислав Русланович	к.б.н., науковий співробітник, ІБК НАН України, тел.: +38-032-261-22-87, e-mail: rpanchuk@ukr.net	
Козак Юлія Сергіївна	к.б.н., молодший науковий співробітник, ІБК НАН України, тел.: (032)2612287, e-mail: juliana.kozzak@gmail.com	
Кашчак Наталія Іванівна	к.б.н., молодший науковий співробітник, ІБК НАН України, тел.: (032)2612287, e-mail: nataliya.kashchak@gmail.com	
Скорохід Надія Романівна	провідний інженер-дослідник, ІБК НАН України, тел.: (032)2612287, e-mail: n.skorokhyd@gmail.com	

12. Установи - співвиконавці

н е м а є

13. Ключові слова

полі-2-оксазолінові носії, стійкість пухлин до ліків, апоптоз, дослідження in vivo

14. Резюме

На сьогодні розроблено величезну кількість наноносіїв для доставки ліків, але найбільш перспективними серед них залишаються амфільні полімери. Їх легко функціоналізувати, приєднавши специфічні ліганди, які скеровуватимуть ліки точно до клітин-мішеней. Однак у такого методу є і свої недоліки, зокрема накопичення наночастинок у здорових тканинах та органах, які практично не виводяться з організму, а розрекламований ефект підвищеної чутливості злоскісних новоутворень до наночастинок, що зумовлений порушеною капілярною сіткою в солідних пухлинах проникності пухлин (Enhanced permeability and retention effect), далеко не завжди має місце насправді. Крім того, абсолютна більшість наноносіїв нездатні проникати через гематоенцефалічний бар'єр, і тому не можуть знищити метастази пухлин у головному мозку, що ставить під питанням їх реальну клінічну ефективність. Нарешті, стабільність таких складних систем у водних розчинах є невисокою, що одразу тягне за собою питання тривалого зберігання таких ліків, а без цього про будь-яке впровадження таких підходів у клінічну практику не може йти і мови.

Отже, ідеальний носій для доставки ліків повинен забезпечувати тривале циркулювання препарату у кровоносному руслі, повільне і рівномірне вивільнення ліків з комплексу з носієм у пухлині, при цьому він повинен бути біодеградабельним і не накопичуватися у здорових тканинах та органах. Вирішення даних проблем на даний момент є технічно недосяжним для сучасної фармакології та медицини, тому багато фармацевтичних компаній обрали інший підхід, використовуючи природні наноносії – наприклад, сироватковий альбумін. Прикладом цього є абраксан - нанорозмірна форма відомого протипухлинного засобу паклітакселу, який іммобілізований на альбуміні. Така природна форма ліків гарантує їхню біодеградабельність, підвищену біодоступність відмінну циркуляцію у кровоносному руслі, однак не може

проникнути через гематоенцефалічний бар'єр, тим самим унеможливаючи лікування пацієнтів з метастазами пухлин у мозку.

Нами запропоновано альтернативний підхід для вирішення даної проблеми – полімерний носій на основі полі-2-оксазоліну, комплекс якого з лікарським засобом може зберігатися необмежено довго у ліофілізованому стані. Полі-2-оксазолін є похідним комерційного носія pluronic, що пройшов схвалення FDA та володіє унікальною здатністю проникати через гематоенцефалічний бар'єр. Попередні дослідження наших німецьких партнерів показали, що іммобілізація паклітакселу на даному носії продемонструвала 7-кратне збільшення його біодоступності у порівнянні з комерційно доступною нанорозмірною формою цього засобу (абраксан). Як наслідок, це дозволило у декілька разів збільшити протипухлинний потенціал паклітакселу *in vivo* на експериментальних моделях пухлин у мишей. Виявлено, що така феноменальна ефективність даної системи доставки очевидно пояснюється його здатністю переносити ліки з носія на альбумін сироватки крові – природний нанорозмірний носій в організмі ссавців. Це і гарантує відмінну біодоступність та тривале циркулювання у кровоносному руслі навіть водонерозчинних препаратів. В той же час невідомо, наскільки ефективно дана система буде діяти для експериментальних протипухлинних препаратів, а також природних сполук з дуже низькою біодоступністю та швидкою деградацією (наприклад, куркумін). Завданням даної роботи буде дослідити молекулярні механізми, що лежать в основі посилення дії різних ліків полі-2-оксазоліновим носієм, особливо їх потенційну здатність долати множинну медикаментозну резистентність (ММР) та проникати через гематоенцефалічний бар'єр (на клітинних моделях).

Для вивчення потенційних побічних ефектів полімерних комплексів різних ліків на організм мишей буде використано стандартні біохімічні методи аналізу гепато- (співвідношення ензимів АЛТ/АСТ), нефро- (рівень креатиніну у крові), кардіо- (зміна експресії ізоформ лактатдегідрогенази) та мієлотоксичності (аналіз формули крові та лейкограми). На завершальному етапі досліджень буде порівняно терапевтичну ефективність експериментальних засобів (ангуцикліновий антибіотик ландоміцин А, похідні 4-тіазолідонів, фітополіфенол куркумін, похідні берберину) (у 2% розчині етанолу) та їх новітніх фармацевтичних форм на основі полі-2-оксазоліну щодо експериментальних пухлин у мишей ((меланома B16 та її резистентна до доксорубіцину сублінія B16/adr). Буде вивчено вплив цих сполук на виживання тварин, розміри пухлини, кількість метастазів у внутрішніх органах, та порівняно їх з дією доксорубіцину – «золотого стандарту» хіміотерапії.

На основі отриманих даних буде зроблено висновки про терапевтичну ефективність нової фармацевтичної форми ліків на основі полі-2-оксазоліну А *in vivo* щодо різних моделей метастатичних пухлин у мишей, стійких до хіміотерапії. Це, у свою чергу, дозволить обґрунтувати доцільність подальшого впровадження новітньої наноплатформи для доставки ліків у клінічну онкологію. Також заплановано підготувати портфолію по технології виробництва носія, протоколу іммобілізації на полімерному носії різних ліків та доклінічних дослідженнях нанокомпозитних форм різних ліків для фармацевтичних фірм, готових інвестувати у промислове виробництво вітчизняної системи доставки ліків.

15. Обґрунтування доцільності виконання роботи

15.1. Цілі та завдання роботи, її актуальність, соціальна та економічна значимість.

Суттєвим недоліком сучасних хіміотерапевтичних засобів є їх низька вибірковість дії та висока токсичність для нормальних клітин організму, що не дозволяє повністю елімінувати так звані «сплячі» стовбурові злоякісні клітини, що, як наслідок, призводить до швидких рецидивів пухлин і появи злоякісних клітин, стійких до хіміотерапії. Саме тому актуальною задачею фармакології і медицини є розробка нових лікарських форм з покращеною системою їх доставки до клітин-мішеней. На сьогодні більше 25% ринку ліків представлено препаратами з покращеною системою їх доставки до клітин-мішеней. Як правило, такі новітні лікарські форми продовжують тривалість дії ліків та збільшують їх біологічну доступність, а також знижують побічні ефекти хіміотерапії у пацієнтів [Dutta R.C. Drug carriers in pharmaceutical design: promises and progress. Curr. Pharm. Des. 2007; 13: 7, 761-769.]. Крім цього, більшість сучасних систем доставки ліків володіють додатковими корисними характеристиками, такі як направлена доставка препарату до місця розташування патологічного процесу, в той час як традиційні форми ліків не володіють такими властивостями.

Ефективність і вибірковість дії традиційних ліків є дуже низькою – так, лише 1-10 із 100 000 молекул, введених внутрівнено для терапевтичних чи діагностичних цілей, досягають своїх біологічних мішеней *in vivo*, незважаючи на неймовірно широку площу ендотелію капілярів і судин організму. Така статистика відображає загальну низьку проникність ендотеліальних бар'єрів до сторонніх сполук внаслідок високої щільності міжклітинних контактів в більшості судинних систем, а також незначної кількісної ролі трансцитозу (транспортування речовин через клітину) у цих процесах. Наночастинки (НЧ) потенційно пропонують шлях для скорочення загальної кількості ліків, необхідних для досягнення мішені. Ця ідея ґрунтується на концепції біонакопичування, що дозволило б здійснити специфічну доставку ліків до клітин-мішеней.

В останні десятиріччя були розроблено та синтезовано величезне розмаїття наночастинок синтетичного або природного походження, які здатні зв'язувати і транспортувати протипухлинні та інші лікарські засоби для поліпшення їхньої дії, а саме: 1) підвищення їхнього протипухлинного потенціалу за допомогою направленої доставки у організм пацієнтів; 2) зниження негативних побічних ефектів препарату щодо нормальних клітин, тканин і органів; 3) долання множинної лікарської резистентності (Nanoparticles smart drug delivery system for cancer. Technology Landscape. LexInnova, page 1-39). Хоча кількість таких наночастинок різко зростає, більшість з них мають деякі недоліки, щонайменше, в одному з перерахованих вище параметрів. Проте навіть нанопрепарати, схвалені FDA (Food and Drug Administration) проявляли негативні побічні ефекти в групі хворих на рак. Наприклад, Doxil® (доксорубіцин інкапсульований в пегельовані ліпосоми), індукує важкі дисфункції імунної системи у деяких пацієнтів (Janssen Prescription Assistance by Johnson & Johnson). Інкапсуляція доксорубіцину у ліпосоми, функціоналізовані ПЕГ (поліетиленгліколь), дозволяє Doxil®, уникати виявлення і знищення його імунною системою і, як наслідок, збільшує час циркуляції препарату у крові: а) період напіврозпаду становить приблизно 55 годин; б) залишається стабільним в крові; в) $\geq 90\%$ препарату залишається всередині ліпосоми під час циркуляції. Однак через високий ризик кардіоміопатій, що індукуються Doxil®, пацієнтам із серцево-судинними захворюваннями рекомендується введення цього препарату тільки тоді, коли потенційна користь від лікування переважає ризик. Найбільш поширені побічні ефекти від застосування Doxil® спостерігаються в $>20\%$ пацієнтів і включають астенію, втому, лихоманку, втрату апетиту, нудоту, блювання, стоматит, діарею, закреп, долонно-підшовний синдром, висипи, нейтропенію, тромбоцитопенію, анемію тощо.

Ось чому розробка новітніх систем доставки ліків, які будуть вільними від недоліків комерційно доступних засобів, є важливою задачею нанобіомедицини. Одними з найбільш перспективних матеріалів для створення подібних систем є олігоелектроліти – полімери амфіпатичної природи, здатні до зв'язування гідрофобних протипухлинних препаратів та їх точного вивільнення при зміні рН середовища (наприклад, у фаголізосомах) або ж при впізнаванні таким полімером специфічного рецептора на поверхні злоякісних клітин. Керована іммобілізація протипухлинних препаратів на олігоелектролітних носіях синтетичного, природного або змішаного походження також може бути корисна для розробки розчинних у воді форм водонерозчинних ліків і забезпечення їх тривалою дією і адресованим постачанням цільовому органу або тканині. Окрім того, такі носії можуть захистити застосовані препарати від розпізнавання транспортною системою множинної стійкості, що блокує дію ліків у багатьох пухлинних клітин.

Таким чином, створення нових систем доставки протипухлинних препаратів до клітин-мішеней на основі нанорозмірних олігоелектролітів, що можуть маскувати іммобілізовані препарати впродовж їх дії, дозволить побороти три основні проблеми сучасної хіміотерапії – подолання щільних біологічних бар'єрів в доставці ліків, низьку вибірковість дії та високу токсичність хіміотерапевтичних агентів, а також подолання набутої стійкості пухлинної клітин до антинеопластичних препаратів.

15.2. Стан розроблення проблеми.

Понад 40% комерційно доступних ліків і 90% експериментальних препаратів є гідрофобними сполуками (Merisko-Liversidge et al, 2011), тому розробка новітніх підходів для подолання проблеми розчинності та біодоступності лікарських засобів є критично важливим завданням сучасної фармакології та медицини. Для вирішення цих питань застосовуються різні методи, наприклад використання сольових форм ліків, спеціальних інгібіторів преципітації, модифікаторів рН, поверхнево-активних речовин, нанокристалів лікарських засобів, міцелярної сольобілізації, твердої дисперсії, мікроемульсії та нанонізації (Merisko-Liversidge et al, 2011, Balk

et al, 2015). У клінічній практиці все ще поширене використання допоміжних речовин, які можуть спричинити важкі реакції гіперчутливості у пацієнтів, які можуть мати небезпечні для життя наслідки (Gelderblom et al, 2001). Це, зокрема, Cremophor EL (тепер ребрендований як Kolliphor EL) та етанол для розчинення таксолу (паклітаксел), або полісорбат 80 та етанол - для таксотеру (доцетаксел) і кабазитакселу (Jevtana).

Саме тому все більшу і більшу популярність набувають міцели на основі полімерів. Їхнє гідрофобне ядро виступає резервуаром для ліпофільних молекул (таким чином збільшуючи їх видиму розчинність), а зовнішня гідрофільна оболонка забезпечує водорозчинність інкапсульованого лікарського засобу (Gaucher et al., 2010). Полімери та полімерні міцели можуть покращити трансцитоз лікарських засобів через біологічні мембрани, тим самим покращуючи проникність лікарських засобів (Yu et al, 2013; Kabanov et al, 2003)

Одним з найбільш перспективних напрямків у цій галузі є використання блок-кополімерів для інкапсуляції активних фармацевтичних інгредієнтів. Значна кількість досліджень була проведена у складі блок-кополімерів для формування гідрофобних АРІ за різними стратегіями. Багато успішних робіт базуються на застосуванні триблокових кополімерів поліетиленгліколю (ПЕГ) та поліпропіленгліколю (ППГ), які комерційно випускаються під торговою маркою Pluronic. Інша популярна система для доставки ліків включає блок-кополімери, що містять PEG як гідрофільні блоки та полі-амінокислоти і полі-складні ефіри як гідрофобні блоки. За допомогою Pluronic були успішно інкапсульовані такі відомі лікарські засоби, паклітаксел, доксорубіцин, епірубіцин (Batrakova et al, 1996), геністеїн (Kwon et al, 2007) та індометацин (Maksym et al, 2016). Також були детально досліджені полімерні міцели, що містять поліетиленоксид та b-полі (l-амінокислоти) (PEO-b-PLAA). Зокрема, після піонерської роботи Катаоки та його колег кілька систем на основі PEO-b-PLAA пройшли численні клінічні випробування (Osada et al, 2009; Adams et al, 2003). Ялонек та ін. вдалося одночасно інкапсулювати 2-3 різних препаратів в полімерних міцелах, що містили ПЕГ і b-полі(L-лактид). Загальний вміст завантаження міцел лікарськими засобами складав усього 6,8 та 8,8% у міцел, що містили паклітаксел та 17-AAG (Танеспіміцин) і 9,1% та 7,4% у міцелах, що містили паклітаксел/17-AAG/рапаміцин (Jelonek et al, 2016). Групі Квана та працівників вдалося приготувати потрійні препарати РТХ, 17-AAG та рапаміцину, а також РТХ, етопозиду та доцетакселу, завантаження яких становило 25% (маса ліків/маса ліків з полімером), що є дуже хорошим показником (Shin et al, 2009; Shin et al, 2011).

Однак для того, щоб вищезгадані підходи для інкапсуляції ліків могли бути впроваджені у клінічну практику, необхідно мінімізувати кількість допоміжної речовини (полімеру) для доставки терапевтичної дози ліків. На жаль, низька ефективність завантаження залишається основною проблемою для полімерних міцел з ліками, які, як правило, не перевищують від 10 до 15% ваги дисперсної фази. Крім того, навіть якщо завантаження АРІ є відносно високим, низька концентрація ліків у складі препарату та низька стабільність цієї системи доставки ліків руйнують всі переваги від її розробки. Крім того, на даний момент відбір полімерного носія часто проводиться методом проб і помилок, що суттєво утруднює процес створення високоефективних систем доставки ліків.

Нами запропоновано альтернативний підхід для вирішення цієї проблеми – використати біоматеріали на основі полі (2-оксазоліну) (РОх), який є поліпшеним похідним відомого триблок кополімеру Pluronic, позбавленого недоліків останнього (Luxenhofer et al, 2012). Гідрофільні полі (2-метил-2-оксазолін) (РМеОх) та полі (2-етил-2-оксазолін) (РЕтОх) представляли особливий інтерес через їх білок-відштовхувальні властивості та практично відсутню імуногенність. Ще однією перевагою цих носіїв є відпрацьований протокол їхнього синтезу, який гарантує максимальний контроль приєднання кожної нової ланки 2-оксазолінів. В даний час проводяться клінічні дослідження нового засобу для лікування хвороби Паркінсона, що іммобілізований саме на полі-2-оксазолінових носіях, і II фаза цих досліджень на більшій вибірці пацієнтів запланована вже у найближчому майбутньому (Moreadith et al, 2017).

В рамках даного проекту нами заплановано використати полі-2-оксазолінові носії для інкапсуляції ряду експериментальних протипухлинних препаратів, які нерозчинні у воді – ангуциклінові антибіотики родини ландоміцинів, синтетичні похідні 4-тіазолідонів, деякі природні сполуки з нульовою біодоступністю (наприклад, куркумін). Буде вивчено механізми проникнення цих засобів у клітини-мішені, їх здатність долати набуту стійкість злоякісних клітин до хіміотерапії, та сигнальні шляхи індукції апоптозу у цих клітинах. На завершальному етапі роботи буде детально вивчено потенційні побічні ефекти цих систем доставки ліків щодо піддослідних тварин із застосуванням сучасних біохімічних методів, та досліджено їх

терапевтичну ефективність дії на експериментальних моделях пухлин у мишей у порівнянні з тими ж препаратами у вільній формі.

Цитована література

1. Merisko-Liversidge E; Liversidge GG. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2011**, 63 (6), 427.
2. Balk A; Wiest J; Widmer T; Galli B; Holzgrabe U; Meinel L. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2015**, 94, 73
3. Gelderblom H; Verweij J; Nooter K; Sparreboom A. *European Journal of Cancer* **2001**, 37, 1590.
4. Gaucher G; Satturwar P; Jones MC; Furtos A; Leroux JC. *European Journal Pharmaceutics Biopharmaceutics* **2010**, 76 (2), 147.
5. Yu C; He B; Xiong M-H; Zhang H; Yuan L; Ma L; Dai W-B; Wang J; Wang X-L; Wang X-Q. *Biomaterials* **2013**, 34 (26), 6284.
6. Kabanov AV; Batrakova EV; Miller DW. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, 55, 151.
7. Batrakova EV; Dorodnych TY; Klinskii EY; Kliushnenkova E; Shemchukova O; Goncharova O; Arjakov S; Alakhov VY; Kabanov AV. *British journal of cancer* **1996**, 74 (10), 1545.
8. Kwon SH; Kim SY; Ha KW; Kang MJ; Huh JS; Tae Jong I; Kim YM; Park YM; Kang KH; Lee S; Chang JY; Lee J; Choi YW. *Archives of Pharmacol Research* **2007**, 30 (9), 1138.
9. Maksym P; Neugebauer D. *RSC Advances* **2016**, 6 (91), 88444.
10. Osada K; Christie RJ; Kataoka K. *Journal of the Royal Society Interface* **2009**, 6 Suppl 3, S325.
11. Adams ML; Lavasanifar A; Kwon GS. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2003**, 92 (7), 1343.
12. Jelonek K; Li S; Kaczmarczyk B; Marcinkowski A; Orchel A; Musiat-Kulik M; Kasperczyk J. *International Journal of Pharmaceutics* **2016**, 510 (1), 365.
13. Shin HC; Alani AW; Rao DA; Rockich NC; Kwon GS. *Journal of Controlled Release* **2009**, 140 (3), 294.
14. Shin HC; Alani AW; Cho H; Bae Y; Kolesar JM; Kwon GS. *Molecular Pharmaceutics* **2011**, 8 (4), 1257.
15. Luxenhofer R; Han Y; Schulz A; Tong J; He Z; Kabanov AV; Jordan R. *Macromolecular Rapid Communications* **2012**, 33 (19), 1613.
16. Moreadith RW; Viegas TX; Bentley MD; Harris JM; Fang Z; Yoon K; Dizman B; Weimer R; Rae BP; Li X; Rader C; Standaert D; Olanow W. *European Polymer Journal* **2017**, 88, 524.

15.3. Досвід і доробок авторів.

Колектив виконавців проекту володіє понад 20-річним досвідом у галузі біо-тестування новітніх протипухлинних препаратів, та 12-річним – у галузі застосування новітніх наноматеріалів найрізноманітнішого походження (магнітні наночастинки, полімерні носії, фулерен C₆₀ та ін.) для доставки ліків до злоякісних клітин, що знайшло своє відображення у численних публікаціях в міжнародних виданнях з високим імпаکت-фактором.

Нещодавно нами було розпочато співпрацю з науковою групою проф. Роберта Люксенхофера (Університет м. Вюрцбург, Німеччина), які вже понад 10 років займаються синтезом новітніх систем доставки ліків на основі полі-2-оксазоліну. Дані носії володіють рядом унікальних характеристик, які випереджають комерційно доступні аналоги - це, зокрема, надзвичайно високе навантаження полімеру ліками (до 50%), що забезпечується гнучким підбором специфічної структури полімера під конкретний лікарський засіб. Також до безумовних переваг цих полімерів слід віднести їхню надзвичайну стабільність у водних розчинах, в т.ч. в сироватці крові (до 30 днів без втрати активності) та здатність проникати через гематоенцефалічний бар'єр, що робить дану систему доставки по-справжньому унікальною та надзвичайно перспективною. Технологічний процес інкапсуляції лікарського засобу у полі-2-оксазоліновий носій включає в себе етап ліофільного висушування наноконструкції, який у такому вигляді може зберігатися необмежено довго при кімнатній температурі. Для ін'єкції такого комплексу тваринам чи пацієнтам достатньо просто розчинити його у фізіологічному розчині, і він зберігатиме у ньому свою стабільність до 30 днів.

У ході попередніх досліджень нашим німецьким колегам вдалося іммобілізувати на своєму носії відомий протипухлинний препарат паклітаксел, який є дуже погано розчинним у воді. Результати цього дослідження перевершили всі очікування – оскільки новітня нанорозмірна форма паклітакселу виявилася в 50 разів більш біодоступною, ніж цей же засіб, розчинений у етанолі та колліфорі, і у 7 разів активнішим, ніж комерційна нанорозмірна форма паклітакселу (абраксан), іммобілізованого на альбуміні (He et al, 2016). Слід зазначити, що при цьому не спостерігалось виражених побічних ефектів паклітакселу на організм піддослідних тварин,

однак в той же час було виявлене суттєве інгібування росту модельних пухлин у порівнянні з мишами, які отримували звичайний паклітаксел. Це пояснюється підвищеною біодоступністю та посилення вибірковості дії нанорозмірної форми паклітакселу завдяки його іммобілізації на полімерному носії

В ході попередніх досліджень нашими німецькими партнерами вже було іммобілізовано ангуцикліновий антибіотик ландоміцин А на полі-2-оксазоліновому носії. Унікальністю цього препарату є його природна здатність долати набуту стійкість злоякісних клітин до хіміотерапії, тому його інкапсуляція на носії повинна ще більше посилити протипухлинний потенціал ландоміцину А. Дослідження *in vitro* показали значне (в 2 рази) збільшення проникнення ЛА у злоякісні клітини, в т.ч. стійкі до дії ліків, за рахунок нанорозмірного носія. В той же час молекулярні механізми цього явища наразі залишаються недостатньо вивченими. Також невідомо, чи буде спостерігатися аналогічне збільшення протипухлинного потенціалу ЛА *in vivo* на моделях експериментальних пухлин у мишей. Ці задачі буде вирішено в ході виконання даного проекту.

Крім того, заплановано оцінити ефективність від іммобілізації інших гідрофобних засобів на запропонованій наноплатформі – це синтетичні похідні 4-тіазолідонів, розчинні лише в ДМСО, та природний фітополіфенол куркумін. Останній володіє високою цитотоксичною активністю *in vitro* щодо злоякісних клітин, однак не проявляє ніякого терапевтичного ефекту *in vivo*, що пов'язано його нульовою біодоступністю та швидкою деградацією в організмі. Враховуючи надзвичайно широкі можливості полі-2-оксазолінових носіїв, ми очікуємо суттєво посилити як водорозчинність, так і біодоступність як 4-тіазолідонів, так і куркуміну, що повинно пропорційно збільшити їх терапевтичну активність *in vivo*. Це буде своєрідним «екзаменом» на перспективність та універсальність запропонованої нами наноплатформи для доставки ліків та дозволить зробити висновки щодо можливості її широкого впровадження у клінічну практику.

Наукометричні показники виконавців проекту:

- 1) чл.-кор. НАНУ, проф. Стойка Р.С. - індекс Хірша=19 (згідно бази даних Scopus)
- 2) Д.б.н., с.н.с. Панчук Р.Р. – індекс Хірша=10 (згідно бази даних Scopus), сумарний імпаکت-фактор публікацій за 2020-2014 рр – 58,25
- 3) Пров. інженер Скорохід Н.Р. – індекс Хірша=6 (згідно бази даних Scopus), сумарний імпаکت-фактор публікацій за 2020-2014 рр – 30,05
- 4) к.б.н., м.н.с. Кащак Н.І. – індекс Хірша=4 (згідно бази даних Scopus)
- 5) к.б.н., пров. інженер Козак Ю.С. – індекс Хірша=2 (згідно бази даних Scopus)

Публікації виконавців по тематиці даного проекту

1. Kobylinska L, Ivasechko I, Skorokhyd N, Panchuk R, Riabtseva A, Mitina N, Zaichenko A, Lesyk R, Zimenkovsky B, Stoika R, Vari SG. Enhanced Proapoptotic Effects of Water Dispersed Complexes of 4-Thiazolidinone-Based Chemotherapeutics with a PEG-Containing Polymeric Nanocarrier // *Nanoscale Res Lett.* – 2019. – V. 14, N. 1. – P. 140. (IF=3,12)
2. Bilobrov V., Sokolova V., Prylutska S., **Panchuk R.**, Litsis O., Osetskyi V., Evstigneev M., Prylutskyu Yu., Epple M., Ritter U., Rohr J. A Novel Nanoconjugate of Landomycin A with C₆₀ Fullerene for Cancer Targeted Therapy: *In Vitro* Studies // *Cellular and Molecular Bioengineering.* 2019. – V.12, Is. 1. – P.41-51 (IF=2,43)
3. Finiuk N., Klyuchivska O., Ivasechko I., Hreniukh V., Ostapiuk Y., Shalai Y., **Panchuk R.**, Matiychuk V., Obushak M, Stoika R, Babsky A. Proapoptotic effects of novel thiazole derivative on human glioma cells // *Anticancer Drugs.* – 2019. – V.30, Is. 1. – P. 27-37 (IF=1,89)
4. Plichta Z, Kozak Y, Panchuk R, Sokolova V, Epple M, Kobylinska L, Jendelová P, Horák D. Cytotoxicity of doxorubicin-conjugated poly[N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide]-modified γ -Fe₂O₃ nanoparticles towards human tumor cells. *Beilstein J Nanotechnol.* – 2018. – V. 9. – P.2533-2545. (IF=2,97)
5. Kozak Yu.S., Panchuk R.R., Skorokhyd N.R., Lehka L.V., Stoika R.S. Impact of N-acetylcysteine on antitumor activity of doxorubicin and landomycin A in NK/Ly lymphoma-bearing mice // *Ukr. Biochem. J.* – 2018. – V. 90, Is. 2. – P. 46-54
6. **Panchuk R.R.**, Skorokhyd N.R., Kozak Y.S., Lehka L.V., Moiseenok A.G., Stoika R.S. Tissue-protective activity of selenomethionine and D-panthetine in B16 melanoma-bearing mice under doxorubicin treatment is not connected with their ROS scavenging potential // *Croat Med J.* – 2017. – V. 58, N. 2. – P. 171-184 (IF=1,42)

7. Kobylinska L.I., Klyuchivska O.Y., Grytsyna I.I., Finiuk N., **Panchuk R.R.**, Starykovich M.O., Lehka L., Lesyk R.B., Zimenkovsky B.S., Stoika R.S. Differential pro-apoptotic effects of synthetic 4-thiazolidinone derivative Les-3288, doxorubicin and temozolomide in human glioma U251 cells// *Croat Med J.* – 2017. –V. 58, N. 2. – P. 150-159. (IF=1,42)
8. **Panchuk R.R.***, Lehka L.V.*, Terenzi A., Matselyukh B.P., Rohr J., Jha A.K., Downey T., Kril' I.Y., Herbacek I., van Schonhoven S., Heffeter P., Stoika R.S., Berger W. Rapid generation of hydrogen peroxide contributes to the complex cell death induction by the angucycline antibiotic landomycin E // *Free Radic Biol Med.* – 2017. –V. 106. – P. 134-147. (IF=6,02)
9. Prylutska S.*, **Panchuk R.***, Gołuński G.*, Skivka L, Prylutsky Yu., Hurmach V., Skorokhyd N., Borowik A., Wozniowiczka A., Piosik J. , Kyzyma O., Garamus V., Bulavin L., Evstigneev M., Buchelnikov A., Stoika R. , Berger W., Ritter U., Scharff P.C₆₀ Fullerene Enhances Anticancer Activity of Cisplatin In vitro and In vivo and Facilitates Circumvention of Drug Resistance in Tumor Cells // *Nano Research.* – 2017. – V. 10, N. 2. – P. 652-671 (IF=7,99)
10. Purwin M., Hernandez-Toribio J., **Panchuk R.**, Skorokhyd N., Filipiak K., de Pascual-Teresa B., Ramos A. Design and Synthesis of Novel Dual-Target Agents for HDAC1 and CK2 Inhibition // *RSC Advances.* – 2016. – V.6. – P. 66595-66608. (IF=2,94)
11. **Panchuk R.R.**, Skorokhyd N.R., Kozak Yu.S., Lehka L.V., Chumak V.V., Omelyanchik S.N., Gurinovich V.A., Moiseenok A.G., Stoika R.S. Antioxidants selenomethionine and D-pantethine decrease negative side effects of doxorubicin in NK/Ly lymphoma-bearing mice // *Croat Med J.* – 2016. – V. 57, N. 2. – P. 180-192.(IF=1,42)
12. Kobylinska L.I., Boiko N.M., **Panchuk R.R.**, Grytsyna I.I., Klyuchivska O.Yu., Biletska L.P., Lesyk R.B., Zimenkovsky B.Z., Stoika R.S. Putative anticancer potential of novel 4-thiazolidone derivatives: cytotoxicity toward rat glioma C6 *in vitro* and correlation of general toxicity with the balance of free radical oxidation in rats // *Croat Med J.* – 2016. – V. 57, N. 2. – P. 151-163. (IF=1,42)
13. Prylutska S.V., Skivka L.M., Didenko G.V., Prylutsky Yu.I., Evstigneev M.P., Potebnya G.P., **Panchuk R.R.**, Stoika R.S., Ritter U., Scharff P. Complex of C₆₀ fullerene with doxorubicin as a promising agent in antitumor therapy // *Nanoscale Research Letters* – 2015. – V. 10. – P. 499. (IF=3,12)
14. **Panchuk R.R.**, Prylutska S.V., Chumak V.V., Skorokhyd N.R., Lehka L.V., Evstigneev M.P., Prylutsky Yu.I., Berger W., Heffeter P., Scharff P., Ritter U., Stoika R.S. Application of C₆₀ Fullerene-Doxorubicin Complex for Tumor Cell Treatment In Vitro and In Vivo // *J. Biomed. Nanotechnol.* – 2015. – V. 11, N.7. – P. 1139-1152. (IF=5,06)
15. Seršen S, Kljun J, Kryeziu K, **Panchuk R**, Alte B, Körner W, Heffeter P, Berger W, Turel I. Structure-Related Mode-of-Action Differences of Anticancer Organoruthenium Complexes with β -Diketonates // *J Med Chem.* – 2015. – V. 58, N. 9. – P. 3984-3996. (IF=6,26)
16. Berdyshev A.G., Kosiakova H.V., Onopchenko O.V., **Panchuk R.R.**, Stoika R.S., Hula N.M.N-Stearoylethanolamine suppresses the pro-inflammatory cytokines production by inhibition of NF- κ B translocation // *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* – 2015. – V. 121 (Pt A). – P. 91-96. (IF=2,99)
17. **Panchuk R**, Skorokhyd N, Chumak V, Lehka L, Omelyanchik S, Gurinovich V, Moiseenok A, Heffeter P, Berger W, Stoika R. Specific antioxidant compounds differentially modulate cytotoxic activity of doxorubicin and cisplatin: *in vitro* and *in vivo* study // *Croat Med J.* – 2014. – V. 55, N. 3. – P. 206-217. (IF=1.42).

Публікації німецьких партнерів по тематиці проекту

1. He Z, Wan X, Schulz A, Bludau H, Dobrovolskaia MA, Stern ST, Montgomery SA, Yuan H, Li Z, Alakhova D, Sokolsky M, Darr DB, Perou CM, Jordan R, Luxenhofer R, Kabanov AV. A high capacity polymeric micelle of paclitaxel: Implication of high dose drug therapy to safety and in vivo anti-cancer activity. *Biomaterials.* 2016 Sep;101:296-309.
2. Lübtow MM, Hahn L, Haider MS, Luxenhofer R. Drug Specificity, Synergy and Antagonism in Ultrahigh Capacity Poly(2-oxazoline)/Poly(2-oxazine) based Formulations. *J Am Chem Soc.* 2017 Aug 16;139(32):10980-10983.
3. Pöppler AC, Lübtow MM, Schlauersbach J, Wiest J, Meinel L, Luxenhofer R. Loading-Dependent Structural Model of Polymeric Micelles Encapsulating Curcumin by Solid-State NMR Spectroscopy. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2019 Dec 16;58(51):18540-18546.

4. Lübtow MM, Haider MS, Kirsch M, Klisch S, Luxenhofer R. Like Dissolves Like? A Comprehensive Evaluation of Partial Solubility Parameters to Predict Polymer-Drug Compatibility in Ultrahigh Drug-Loaded Polymer Micelles. *Biomacromolecules*. 2019 Aug 12;20(8):3041-3056.

15.4. Структура досліджень.

Даний проект складатиметься з 5 основних етапів

1. Інкапсуляція водонерозчинних експериментальних протипухлинних препаратів на полі-2-оксазоліновому носію. Порівняння цитотоксичної активності та швидкості проникнення у злоякісні та псевдонормальні клітини-мішені вищезгаданих лікарських засобів та іммобілізованих на полі-2-оксазоліновому носії (2020 рік)
2. Дослідження потенційної здатності новітніх систем доставки ліків на полі-2-оксазоліновому носію долати набуту стійкість злоякісних клітин до хіміотерапії, обумовлену різними чинниками (2021 рік)
3. Дослідження впливу полі-2-оксазолінового носія з іммобілізованими на ньому протипухлинними засобами на індукцію апоптозу та функціональний стан мітохондрій злоякісних клітин у порівнянні з цими ж засобами у вільній формі. (2022 рік)
4. Вивчення потенційних побічних ефектів ліків, іммобілізованих на полі-2-оксазоліновому носії *in vivo* на експериментальних тваринах (миші), та у вільній формі (кардіо-, гепато-, нефро-, мієлотоксичність. (2023 рік)
5. Порівняння терапевтичної активності ліків, іммобілізованих на полі-2-оксазоліновому носії та у вільній формі *in vivo* на моделях мишачої лімфоми NK/Ly, меланоми B16 та її резистентної до ліків сублінії B16/adr (2024 рік)

В ході виконання **І етапу роботи** буде відпрацьовано регламент іммобілізації на полі-2-оксазоліновому наноносії структурно відмінних експериментальних лікарських засобів, які нерозчинні у воді (похідні 4-тіазолідонів, напівсинтетичні похідні алкалоїдів чистотілу, ангуциклінові антибіотики родини ландоміцинів, куркумін та ін.). Для цього будуть використані різні типи носіїв, що відрізняються між собою довжиною та структурою бічного ланцюга, який і є основою гідрофобного ядра міцели, куди інкапсулюється препарат. Для кожного із досліджуваних препаратів буде підібрано оптимальну структуру наноносія, із прицілом на забезпечення максимального навантаження засобу (мінімальна концентрація у воді 2 мг/мл) та стабільність у водних системах. Цитотоксична активність новітніх систем доставки ліків буде досліджена на панелі злоякісних та псевдонормальних клітин людини у порівнянні з цими ж ліками у вільній формі. Це, зокрема, Т-лейкоз людини лінії Jurkat, високометастатична аденокарцинома молочної залози людини лінії MDA-MD-231, карцинома шийки матки людини лінії HeLa, карцинома прямої кишки людини лінії HCT-116, гліома людини лінії U251. Запропонована нами панель злоякісних клітин охоплює основні види злоякісних новоутворень у людини (лейкоз, карцинома, гліома), і це дозволить швидко ідентифікувати специфічність дії новітніх систем доставки ліків. Також будуть використані псевдонормальні лінії клітин – кератиноцити людини лінії HaCat та клітини ембріональної нирки людини лінії HEK293. Це, в свою чергу, дозволить виявити, чи справді дія новосинтезованих систем доставки ліків є вибірковою лише до злоякісних клітин.

На **другому етапі роботи** буде досліджено потенційну здатність новітніх систем доставки ліків долати набуту стійкість злоякісних клітин до хіміотерапії, обумовлену різними чинниками.. Для цього буде використано унікальну панель злоякісних ліній клітин з фенотипом множинної медикаментозної резистентності, люб'язно наданими Інститутом біології клітини нашими партнерами з Інституту ракових досліджень Медичного університету Відня (наукова група проф. Вальтера Бергера) в рамках українсько-австрійського білатерального проекту. Це, зокрема, лейкоз людини лінії HL-60 та її сублінії HL-60/adr (надекспресія білка MRP-1) та HL-60/vinc (надекспресія Р-глікопротеїну), стійкі до доксорубіцину та вінкристину, відповідно. Також дію досліджуваних сполук буде вивчено щодо клітин карциноми прямої кишки людини лінії HCT116, які характеризуються нокаутом різних генів, задіяних в регуляції клітинного циклу та апоптозу (p53, Вах, p21), та клітин меланоми людини лінії FTSLA, чутливих та стійких до інгібітора Raf вемурафенібу. Такий вибір клітинних ліній для дослідження дозволить всебічно

оцінити ефективність іммобілізації експериментальних ліків на полі-2-оксазоліновому носію, порівнявши їх дію з тими ж ліками у вільній формі. Для виконання запланованих робіт будуть використані традиційні методи клітинної біології – аналіз проліферативної активності клітин за дії вищезгаданих сполук на 72 годину методом МТТ на мультипланшетному рідері, та на 24 годину – за допомогою фарбування барвником трипановим синім.

На третьому етапі досліджень буде порівняна проапоптична активність вищезгаданих наноконструктивів щодо злоскісних та псевдонормальних клітин людини (кератиноцити лінії HaCat, ембріональні клітини нирки людині лінії HEK293, ФГА-активовані лімфоцити здорових донорів), що дозволить оцінити, настільки їхня дія є по-справжньому таргетною. Детекція апоптозу проводитиметься методом проточної цитофлуориметрії із застосуванням FITC-міченого аннексину V та пропідій йодиду. Очікується, що у псевдонормальних клітинах рівень індукції апоптозу буде значно нижчий, ніж у злоскісних, при застосуванні ліків, іммобілізованих на носіях. Для з'ясування, яким саме шляхом – мітохондріальним, рецептор-опосередкованим, чи ER-опосередкованим – відбувається загибель клітин за дії вищезгаданих систем доставки ліків, нами буде визначено рівень активних форм кисню та функціональний стан мітохондрій злоскісних та псевдонормальних клітин методом проточної цитофлуориметрії. Як відомо, зростання рівня супероксид-аніонів тісно пов'язане з деполяризацією мітохондрій за дії проапоптичного чинника, тоді як продукція пероксиду водню без ознак супероксид-аніонів є ознакою позамітохондріальної індукції АФК – внаслідок стресу ендоплазматичного ретикулу, або ж активності НАДФ-дегідрогеназ у плазматичній мембрані. Детекція продукції H_2O_2 і O_2^- у часовому діапазоні (3,6,12,24 години) із застосуванням спеціальних флуоресцентних барвників (DCFDA та DHE, відповідно) дозволить ідентифікувати потенційне джерело оксидативного стресу за дії цих наноконструктивів у клітинах-мішенях, та зробити крок до з'ясування механізмів індукції апоптозу. Окремо буде досліджено функціональний стан мітохондрій у клітинах-мішенях за дії тих же концентрацій наноконструктивів та ліків у вільній формі шляхом фарбування барвником JC-1. Це дозволить співставити потенційну продукцію супероксид-аніонів за дії цих сполук (якщо такий феномен буде виявлено) із деполяризацією мітохондрій та, як наслідок, чітко ідентифікувати джерело цих АФК.

Для верифікації отриманих результатів буде проведено Вестерн-блот аналіз експресії білків, залучених у ранніх та пізніх стадіях апоптозу, за дії найбільш активного з досліджуваних дуальних інгібіторів кіназ, у злоскісних клітинах людини. Буде вивчено активації ініціаторних (каспаза-2,-8,-9) та ефекторних каспаз (-3,-6,-7) та розщеплення їх субстратів (PARP-1, DFF45), а також зміни у експресії про- і антиапоптичних білків родини Bcl-2 (Bax, Bcl-xL). Це дозволить підтвердити дані щодо оксидативного стресу, отримані на попередньому етапі досліджень, та чітко вказати на шлях індукції апоптозу досліджуваними наноконструктивами – мітохондріальний (через каспазу-9), рецептор-опосередкований (через каспазу-8) та ER-опосередкований (каспаза-2).

На четвертому етапі досліджень буде вивчено потенційні побічні ефекти системою доставки ліків які продемонстрували найвищу цитотоксичну активність та найбільшу вибірковість дії щодо пухлинних та псевдонормальних клітин у експериментах *in vitro*. Буде встановлено максимально переносиму та напівлетальну дозу цих наноконструктивів і порівняно її з ліками у вільній формі, та досліджено функціональний стан печінки, нирок, серця та кровотворної системи піддослідних тварин за різних доз вищезгаданих сполук. Аналіз формули крові піддослідних тварин буде проводитися на гематологічному аналізаторі крові Dymind DF50 VET, а оцінка біохімічних показників крові – на напівавтоматичному біохімічному аналізаторі Sinnova BS-3000M із застосуванням стандартних наборів на визначення аланін/аспартатамінотрансферази, гамма-глутамілтрансферази, лужної фосфатази, креатиніну та ін. Це дозволить провести всебічну оцінку потенційних побічних ефектів для новостворених систем доставки ліків та підібрати оптимальну дозу цих речовин для подальших досліджень.

На п'ятому етапі досліджень буде досліджено терапевтичний потенціал нанорозмірних форм ландоміцину А, 4-тіазолідонів, куркуміну, похідних берберину, які продемонстрували найвищу цитотоксичну активність та найбільшу вибірковість дії щодо пухлинних та псевдонормальних клітин у експериментах *in vitro*. Для цього буде використано перевивану меланому В16 у мишей, яка вважається однією з найбільш агресивних і високометастатичних пухлин. Буде проведено оцінку тривалості життя мишей-пухлиноносців, їх морфофункціонального стану, а також статусу імунної системи. Останнє буде здійснюватися шляхом автоматичного аналізу лейкограми піддослідних тварин на гематологічному аналізаторі

крові Dymind DF50 VET. На завершальному етапі досліджень буде проведено оцінку здатності нанокompatитів на основі полі-2-оксазоліну долати набуту стійкість пухлин до ліків *in vivo* – на моделі меланоми B16/adr, стійкої до доксорубіцину. Отримані результати буде використано для оцінки терапевтичної ефективності нвостворених систем доставки експериментальних ліків та зроблено відповідні висновки щодо доцільності подальшої модифікації їх хімічної структури для усунення небажаних побічних ефектів чи недостатньої протипухлинної дії (якщо такі недоліки будуть виявлені).

15.5. наявність матеріально-технічної бази для виконання роботи.

Відділ регуляції проліферації клітин і апоптозу Інституту біології клітини НАН України, яким керує керівник даного проекту, чл-кор НАНУ Стойка Р.С., володіє достатнім досвідом, науковим потенціалом, методичною та технічною базою для успішного виконання проекту. Виконавцями даного проекту мають протягом тривалого часу проводитися дослідження в галузі клітинної та молекулярної біології з метою вивчення механізмів злякисного переродження клітин тварин і людини та з'ясування принципів дії деяких протипухлинних препаратів та механізмів виникнення стійкості злякисних клітин до їх дії, що є серйозною проблемою в хіміотерапевтичному лікуванні онкологічних хворих. У відділі є необхідне обладнання для роботи по напрямку проекту – проточний цитофлуориметр BD FACScan, флуоресцентний мікроскоп Zeiss AxioImager A1, три прилади для білкового електрофорезу та Вестерн-блотингу, два CO2-інкубатори, мікропланшетний рідер для імуноферментативних аналізів (ELISA), біохімічний аналізатор крові Sinnova BS-3000M, гематологічний аналізатор крові Dymind DF50, ламінарні бокси для роботи з клітинними лініями, центрифуги та ін., віварій для експериментів *in vivo*. Тут зберігається колекція клітинних ліній, необхідних для виконання запропонованих досліджень, а також підтримуються лабораторні лінії мишей Balb/C і C57/B16, необхідні для підтримки лімфоми NK/Ly, лейкозу L1210, остеосаркоми K7M2 і меланоми B16 *in vivo*.

16. Техніко-економічне обґрунтування

н е м а є

17. Власна оцінка науково-технічного рівня розробки, що пропонується, яка очікується за результатами наукової, науково-технічної роботи

- | | |
|-------------------------------------|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> | немає аналогів у світі або краща за існуючі у світі аналоги |
| <input type="checkbox"/> | немає аналогів в Україні |
| <input type="checkbox"/> | краща за існуючі в Україні аналоги за всіма основними показниками |
| <input type="checkbox"/> | перевищує існуючі в Україні аналогічні розробки за окремими показниками |

18. Використання результатів роботи

18.1. Очікувані наукові та науково-практичні результати, об'єкти права інтелектуальної власності (ОІВ), які плануються до впровадження після завершення роботи

Найменування результатів, ОІВ	Назва підприємства, організації, де передбачається використовувати результати, ОІВ	Заплановані обсяги впровадження
Регламент іммобілізації водонерозчинних сполук різної структури на полі-2-оксазоліновому наноносії	Фармацевтичні компанії: ПАТ "Фармак", корпорація "Артеріум"	100 млн грн/рік

18.2. Шляхи та способи подальшого використання в суспільній практиці результатів виконання роботи

На сьогоднішній момент в Україні відсутнє власне виробництво протипухлинних препаратів, тому МОЗ змушений закуповувати за кордоном дорогі оригінальні версії препаратів, на які ніколи не вистачає коштів, або ж дешеві індійські генерики, якість яких є доволі сумнівною. Нанорозмірні системи доставки новітніх протипухлинних препаратів взагалі недоступні для пересічного громадянина внаслідок надзвичайно високої вартості. Саме тому необхідність впровадження у промислове виробництво власного вітчизняного протипухлинного препарату широкого спектру дії не викликає сумнівів. Не менш вжаливим є розробка і біо-тестування універсальної платформи для доставки різних гідрофобних протипухлинних препаратів, яку б можна було використати до широкого спектру лікарських засобів. Полі-2-оксазоліновий носій, який є наступним «еволюційним» етапом розвитку т.зв. плурононих триблок-кополімерів (які пройшли 2-у фазу клінічних досліджень в США), оптимально підходить для вирішення даних проблем, а технологія його отримання захищена європейським патентом, отриманим нашими німецькими колегами. Ця наноплатформа володіє усіма необхідними для цього характеристиками - доступність і дешевизна синтезу, надзвичайно висока стабільність, забезпечення водорозчинності навіть найбільш «проблемних» ліків за рахунок гнучкого підбору оптимальної структури полімеру та його бічних груп.

Проведення доклінічних досліджень новітніх фармацевтичних форм різних пекспериментальних протипухлинних засобів, заплановане в ході виконання даного проекту, дозволить виявити усі її потенційні слабкі та сильні сторони, при потребі – провести додаткову модифікацію хімічної структури носія для поліпшення його біологічної дії, та підготувати повний пакет документів по даній розробці для пропозицій потенційному інвестору. Можливо, у 2024 році вітчизняні фармацевтичні компанії будуть проявляти більший інтерес до оригінальних розробок, а не до виробництва генериків, як це має місце в даний час...

18.3. Потенційні споживачі наукових та науково-технічних результатів, об'єктів права інтелектуальної власності (ОІВ)

Країна	Назва підприємства, організації	Найменування результатів, ОІВ	Можливі обсяги споживання
Україна	Фармацевтичні компанії: ПАТ "Фармак", корпорація "Артеріум"	Протоколи іммобілізації різних водонерозчинних ліків на полі-2-оксазоліновому носії	100 млн грн/рік

19. Об'єкти права інтелектуальної власності (ОІВ), використання яких передбачається під час проведення досліджень (для прикладних досліджень та фундаментальних, де використовуються ОІВ)

н е м а є

20. Фінансові аспекти роботи

20.1. Загальна вартість роботи 1250,000 тис. грн.

словами: один мільйон двісті п'ятдесят тисяч грн.

20.2. Вартість роботи:

Роки виконання роботи	2020 р.	2021 р.	2022 р.	2023 р.	2024 р.
Вартість виконання робіт (тис. грн.)	250,000	250,000	250,000	250,000	250,000

21. Наукові ради (комітети, комісії) НАН України, ради регіональних наукових центрів НАН і МОН України, яких доцільно залучити до експертної оцінки запиту

Наукова рада Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (м. Київ)

Наукова рада біологічного факультету Львівського національного університету ім. Івана Франка (м. Львів)

Наукова рада Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ)

22. Кандидатури можливих експертів у галузі, до якої відноситься робота, що пропонується

Прізвище, ім'я, по батькові	Науковий ступінь, посада	Місце роботи
Колибо Денис Володимирович	д.б.н., проф., головний науковий співробітник	Ін-т біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України
Костерін Сергій Олексійович	академік НАН України, д.б.н., проф., заступник директора з наукової роботи	Ін-т біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України
Філоненко Валерій Вікторович	академік НАН України, д.б.н., проф., завідувач відділу	Ін-т молекулярної біології і генетики НАН України
Матишевська Ольга Павлівна	д.б.н., проф., провідний науковий співробітник	Ін-т біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України
Прилуцький Юрій Іванович	д.ф.-м.н., проф., професор	ІНЦ «Інститут біології» Київського національного університету ім. Т.Г.Шевченка
Федоренко Віктор Олександрович	д.б.н., проф., завідувач кафедри	Львівський національний університет імені Івана Франка

23. Додатки, що є невід'ємною частиною запиту:

1. Технічне завдання на виконання роботи (Додаток А).
2. Планова калькуляція кошторисної вартості роботи (Додаток Б).

05.03.2020

дата

Директор
Інституту біології клітини НАН України
академік НАН України



Андрій СИБІРНИЙ

М.П.

Науковий керівник роботи

Завідувач відділу
Інституту біології клітини НАН України
член-кореспондент НАН України

Ростислав СТОЙКА
(підпис)

Ростислав СТОЙКА

ПОГОДЖЕНО

Директор
Інституту біології клітини НАН України
академік НАН України


_____ Андрій СИБІРНИЙ
25255758 (підпис)
« 05 » _____ 2020 р.
М.П.

ЗАТВЕРДЖУЮ

Уповноважена особа НАН України

_____ (підпис)
« _____ » _____ 20__ р.
М.П.

ТЕХНІЧНЕ ЗАВДАННЯ
на виконання наукової (науково-технічної) роботи

«Імобілізація експериментальних протипухлинних препаратів на полі-2-оксазоліновому носію для додання набутої резистентності злоякісних клітин до хіміотерапії in vitro та in vivo»

Цільова програма фундаментальних досліджень НАН України «Перспективні фундаментальні дослідження та інноваційні розробки наноматеріалів і нанотехнологій для потреб промисловості, охорони здоров'я та сільського господарства» на 2020–2024 рр.

Інститут біології клітини НАН України

1. Рішення про затвердження роботи

2. Пріоритетний напрям розвитку науки і техніки

Фундаментальні наукові дослідження з найбільш важливих проблем розвитку науково-технічного, соціально-економічного, суспільно-політичного, людського потенціалу для забезпечення конкурентоспроможності України у світі та сталого розвитку суспільства і держави

3. Пріоритетний тематичний напрям наукових досліджень і науково-технічних розробок

Фундаментальні проблеми наук про життя та розвиток біотехнологій

4. Код та назва наукового напрямку або проблеми з Основних наукових напрямів та найважливіших проблем фундаментальних досліджень у галузі природничих, технічних і гуманітарних наук (для фундаментальних досліджень)

2.2.4.4. Вивчення впливу наночастинок і нанокompatитів на метаболізм нормальних і пухлинних клітин та розробка підходів до таргетної терапії

5. Основний напрям наукової діяльності установи, за яким проводяться роботи

Дослідження молекулярних механізмів регуляції проліферації, диференціації та апоптозу у нормальних та пухлинних клітинах тварин і людини.

6. Мета роботи

Метою роботи є розробка та біо-тестування нових систем для доставки водонерозчинних ліків до злоякісних клітин на основі полі-2-оксазолінового носія, та подальші доклінічні дослідження цих наноплатформ на моделях експериментальних пухлин у мишей, стійких до дії ліків

7. Термін проведення роботи:

початок — 01 квітня 2020 р. ; закінчення — 31 грудня 2024 р.

Орієнтовний обсяг коштів на виконання роботи в цілому **1250,000** тис. грн.

та по роках

2020 р. — 250,000 тис. грн.

2021 р. — 250,000 тис. грн.

2022 р. — 250,000 тис. грн.

2023 р. — 250,000 тис. грн.

2024 р. — 250,000 тис. грн.

8. Календарний план роботи

№ з/п	Найменування основного етапу роботи	Термін виконання	Відповідальний виконавець
1	1. Інкапсуляція водонерозчинних експериментальних протипухлинних препаратів на полі-2-оксазоліновому носію. Порівняння цитотоксичної активності та швидкості проникнення у злоякісні та псевдонормальні клітини-мішені вищезгаданих лікарських засобів та іммобілізованих на полі-2-оксазоліновому носії	01 квітня 2020 р. - 31 грудня 2020 р.	член-кор. НАН України, д.б.н., проф., Р.С. Стойка; к.б.н., Р.Р. Панчук.

2	Дослідження потенційної здатності новітніх систем доставки ліків на полі-2-оксазоліновому носію долати набуту стійкість злоякісних клітин до хіміотерапії, обумовлену різними чинниками	01 січня 2021 р. - 31 грудня 2021 р.	член-кор. НАН України, д.б.н., проф., Р.С. Стойка; к.б.н., Р.Р. Панчук.
3	Дослідження впливу полі-2-оксазолінового носія з іммобілізованими на ньому протипухлинними засобами на індукцію апоптозу та функціональний стан мітохондрій злоякісних клітин у порівнянні з цими ж засобами у вільній формі	01 січня 2022 р. - 31 грудня 2022 р.	член-кор. НАН України, д.б.н., проф., Р.С. Стойка; к.б.н., Р.Р. Панчук.
4	Вивчення потенційних побічних ефектів ліків, іммобілізованих на полі-2-оксазоліновому носії <i>in vivo</i> на експериментальних тваринах (миші), та у вільній формі (кардіо-, гепато-, нефро-, мієлотоксичність)	01 січня 2023 р. - 31 грудня 2023 р.	член-кор. НАН України, д.б.н., проф., Р.С. Стойка; к.б.н., Р.Р. Панчук.
5	Порівняння терапевтичної активності ліків, іммобілізованих на полі-2-оксазоліновому носії та у вільній формі <i>in vivo</i> на моделях кишачої лімфоми NK/Ly, меланоми B16 та її резистентної до ліків сублінії B16/adr	01 січня 2024 р. - 31 грудня 2024 р.	член-кор. НАН України, д.б.н., проф., Р.С. Стойка; к.б.н., Р.Р. Панчук.

9. Зміст, основні вимоги до виконання роботи, рівня і способів її виконання

У ході виконання роботи буде ідентифіковано структурні елементи, що визначають здатність полі-2-оксазолінових наноносіїв до максимально ефективної інкапсуляції водонерозчинних експериментальних протипухлинних препаратів, а також досліджено їхню потенційну здатність долати набуту стійкість злоякісних клітин до хіміотерапії. Також буде порівняно механізми проапоптичної дії цих наноконструкцій на злоякісні та псевдонормальні клітини людини, індукцію ними оксидативного стресу та активації певних ініціаторних та ефекторних каспаз. На завершальному етапі роботи буде вивчено потенційні побічні ефекти та терапевтичну дію тих наноконструкцій, які продемонстрували найвищу активність та вибірковість дії у експериментах *in vitro*. Очікується, що за своїм протипухлинним потенціалом вони не поступатимуться комерційно доступним системам для доставки паклітакселу, докорубіцину та ін. Результати роботи буде опубліковано у фахових міжнародних журналах, а запропонований метод синтезу та іммобілізації різномірних ліків на полі-2-оксазоліновому носію буде запатентовано.

10. Наукові (науково-технічні) результати, що очікуються за основними етапами та роботою в цілому

У ході виконання роботи буде ідентифіковано структурні елементи, що визначають здатність полі-2-оксазолінових наноносіїв до максимально ефективної інкапсуляції водонерозчинних експериментальних протипухлинних препаратів, а також досліджено їхню потенційну здатність долати набуту стійкість злоякісних клітин до хіміотерапії. Також буде порівняно механізми проапоптичної дії цих наноконструкцій на злоякісні та псевдонормальні клітини людини, індукцію ними оксидативного стресу та активації певних ініціаторних та ефекторних каспаз. На завершальному етапі роботи буде вивчено потенційні побічні ефекти та терапевтичну дію тих наноконструкцій, які продемонстрували найвищу активність та вибірковість дії у експериментах *in vitro*. Очікується, що за своїм протипухлинним потенціалом вони не поступатимуться комерційно доступним системам для доставки паклітакселу, докорубіцину та ін. Результати роботи буде опубліковано у фахових міжнародних журналах, а запропонований метод синтезу та іммобілізації різномірних ліків на полі-2-оксазоліновому носію буде запатентовано.

11. Перелік науково-технічної та іншої документації, що надається по завершенню роботи

- звіт про виконання наукової роботи, оформленого відповідно до ДСТУ 3008-95 «Документація. Звіти у сфері науки і техніки. Структура і правила оформлення» зі списком публікацій за результатами виконання роботи у звітному році;
- публікації у міжнародних реферованих журналах по темі проекту
- кошторис фактичних витрат із розрахунками за статтями.

Науковий керівник роботи

Завідувач відділу
Інституту біології клітини НАН України
член-кореспондент НАН України

Ростислав СТОЙКА


(підпис)

Планова калькуляція кошторисної вартості наукової (науково-технічної) роботи

«Імобілізація експериментальних протипухлинних препаратів на полі-2-
оксазоліновому носію для долання набутої резистентності злоякісних клітин до
хіміотерапії in vitro та in vivo»
на 2020 рік

Термін виконання роботи: початок — 01.04.2020 р., закінчення — 31.12.2024 р.

№ з/п	Найменування статей витрат	КЕКВ	Сума, тис. грн.
1	Заробітна плата	2111	90,000
2	Нарахування на оплату праці	2120	19,800
3	Предмети, матеріали, обладнання та інвентар	2210	90,200
4	Видатки на відрядження	2250	5,000
5	Оплата електроенергії	2273	18,000
6	Оплата природного газу	2274	27,000
Разом:			250,000
в т.ч. накладні витрати			27,000
% їх до основної заробітної плати			30,0%

УСТАНОВА-ВИКОНАВЕЦЬ:

Директор
Інституту біології клітини НАН України
академік НАН України

25255758 Андрій СИБІРНИЙ

(підпис)

М.П.

Науковий керівник роботи
Завідувач відділу
Інституту біології клітини НАН України
член-кореспондент НАН України

Ростислав СТОЙКА

(підпис)