

**ЗАПИТ**  
**на проведення наукової (науково-технічної) роботи**

**1. Назва роботи**

Механізми дії нових дуальних інгібіторів кazeїнкiнази 2 та гістондеацетилази у таргетній хіміотерапії пухлин з медикаментозною резистентністю

**2. Вид тематики**

ІІ. Програмно-цільова та конкурсна тематика НАН України

**3. Назва цільової програми або цільового проєкту**

Цільова програма наукових досліджень НАН України «Геномні, молекулярні та клітинні основи розвитку інноваційних біотехнологій» на 2020–2024 рр.

**4. Назва розділу програми або напрям цільового проєкту**

н е м а є

**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 напрямку (проблеми) з Основних наукових напрямів та найважливіших проблем фундаментальних досліджень у галузі природничих, технічних і гуманітарних наук**

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

2.2.2.5. Пошук шляхів та засобів подолання резистентності патогенів та злоякісних клітин

2.2.4.3. Вивчення молекулярно-генетичних основ регуляції метаболічних процесів при пухлинній хворобі

## 10. Науковий керівник роботи

Панчук Ростислав Русланович, д.б.н., с.н.с., старший науковий співробітник, Інститут біології клітини НАН України  
телефон: +38 032 261 2287; факс: +38 032 261 2148; e-mail: rpanchuk@ukr.net

## 11. Відповідальні виконавці

Прізвище, ім'я та по батькові	Науковий ступінь, посада, місце роботи, телефон, електронна адреса	Підпис
Кащак 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	
Козак Юлія Сергіївна	к.б.н., молодший науковий співробітник, ІБК НАН України, тел.: (032)2612287, e-mail: juliana.kozzak@gmail.com	
Стойка Ростислав Стефанович	член-кор. НАН України, д.б.н., проф., завідувач відділу, ІБК НАН України, тел.: +38 032 261 2287, e-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua	

## 12. Установи - співвиконавці

н е м а є

## 13. Ключові слова

таргетна терапія, дуальні інгібітори кіназ, стійкість пухлин до ліків, апоптоз, *in vivo*

## 14. Резюме

Основним недоліком сучасної таргетної терапії раку є надзвичайно висока ціна новітніх високотехнологічних лікарських засобів (інгібітори протеїнкіназ та моноклональні антитіла) і швидкий розвиток набутої стійкості пухлин до них. Як наслідок, спочатку ці ліки демонструють феноменальні результати, практично повністю елімінуючи як пухлину, так і віддалені метастази, але всього лише за кілька місяців спостерігається потужний рецидив, проти якого медицина вже безсила. Причиною цього є дуже швидкий розвиток стійкості пухлин до новітніх хіміотерапевтичних засобів, що включає цілу серію перебудов геному та протеому злоякісних клітин. Частковим виходом із цієї ситуації може бути одночасне використання кількох різних таргетних протипухлинних засобів, які діють на різні ланки одного і того ж сигнального шляху. Це дозволяє суттєво знизити ризики виникнення стійкості пухлин до даного «коктейлю» ліків, однак викликає виражені побічні ефекти у пацієнтів, тому практично не застосовується у клінічній практиці. Крім того, ціна такої поліхіміотерапії буде захмарно високою навіть для пацієнтів США та Євросоюзу, і її не оплатить жодна страхова компанія.

Одним із шляхів збільшення селективності дії ліків та здешевлення лікування онкохворих є створення мультитаргетних інгібіторів протеїнкіназ, які здатні одночасно зв'язуватися з кількома різними білками-мішенями у злоякісних клітинах. Деякі з таких дуальних інгібіторів уже знаходяться на останніх стадіях клінічних досліджень (наприклад, інгібітори PI3 кінази/mTor, рецепторів епідермального фактору росту ErbB-1/ErbB-2 (HER-2), кіназ Raf-1/MEK 1/2). Однак усі вищезгадані дуальні інгібітори діють на онкобілки одного і того ж сигнального ланцюга, що суттєво звужує їхнє коло застосування у клінічній практиці. Крім того, злоякісні клітини доволі легко можуть виробити стійкість і до цього типу ліків, всього лише «активувавши» інший сигнальний шлях для проліферації і метастазування. Саме тому нами було запропоновано принципово інший підхід для створення мультитаргетних інгібіторів кіназ, обравши в якості мішеней два структурно та функціонально відмінні онкобілки – казеїнкіназу 2 та

гістондеацетилазу 1. Оскільки ці молекулярні мішені задіяні у різних сигнальних шляхах проліферації злоякісних клітин, шанси на те, що пухлини зможуть водночас набути стійкості до такого дуального інгібітора, є зникаюче малими.

Іноземні партнери проекту (наукова група проф. Ани Рамос, кафедра органічної хімії Університету св. Павла (Мадрид, Іспанія)) вже розробили дизайн таких інгібіторів *in silico*, та синтезували понад 50 сполук, з яких ними було відібрано 6 активних речовин, які демонстрували найвищі показники інгібування ензимів кazeїнкiнази 2 та гістондеацетилази 1 у безклітинних системах *in vitro*. Ключовим завданням даного проекту є біотестування новітніх дуальних інгібіторів *in vitro* на панелі злоякісних клітин, чутливих та резистентних до хіміотерапії, з'ясування молекулярних механізмів індукції апоптозу цими сполуками, та вивчення терапевтичного потенціалу речовин, які виявляться найактивнішими *in vitro*, на моделі меланому B16 у мишей та її сублінії B16/adr, стійкої до хіміотерапії.

У роботі буде використано сучасні клітинно-біологічні та біохімічні методи – проточна цитофлуориметрія, флуоресцентна мікроскопія, Вестерн-блот аналіз, визначення активності ензимів крові піддослідних тварин – маркерів гепато-, нефро- і кардіотоксичності.

В ході виконання I етапу роботи (2020 рік) буде досліджено структурно-функціональні закономірності, що визначають цитотоксичну активність новітніх інгібіторів кazeїнкiнази-2 та гістондеацетилази-1 щодо злоякісних та псевдонормальних клітин *in vitro*. Це дозволить ідентифікувати ті структурні елементи у молекулі новітніх дуальних інгібіторів SK2-HDAC, за рахунок яких реалізується протипухлинний потенціал цих сполук. На II етапі проекту (2021 рік) буде вивчено потенційну здатність нових дуальних інгібіторів кazeїнкiнази 2 та гістондеацетилази долати набуту стійкість пухлин до ліків, зумовлену різними чинниками (надекспресія Р-глікопротеїну, білка MRP-1, нокаут генів p53, Вах, p21, надекспресія кiнази MEK 1/2). На III етапі проекту (2022 рік) заплановано дослідження механізмів індукції апоптозу, індукції оксидативного стресу та функціонального стану мітохондрій у злоякісних та псевдонормальних клітинах людини дуальними інгібіторами SK2-HDAC1. Очікується, що у псевдонормальних клітинах рівень індукції апоптозу буде значно нижчий, ніж у злоякісних, при застосуванні одних і тих же доз дуальних інгібіторів кiназ. 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 кiназ, у злоякісних клітинах людини. Це дозволить підтвердити дані щодо оксидативного стресу, отримані на попередньому етапі досліджень, та чітко вказати на шлях індукції апоптозу досліджуваними інгібіторами – мітохондріальний (через каспазу-9), рецептор-опосередкований (через каспазу-8) чи ER-опосередкований (каспаза-2).

На IV етапі роботи (2023 рік) буде детально вивчено потенційні побічні ефекти (гепато-,нефро-, мієло-, кардіотоксичність) найактивніших інгібіторів SK2-HDAC1 щодо експериментальних тварин (миші) із застосуванням сучасних біохімічних методів та приладів (напівавтоматичний біохімічний аналізатор крові Sinnova BS-3000M, 5-диференційний гематологічний аналізатор крові Dymind DF50 Vet). Завершальним завданням роботи (2024 р.) будуть доклінічні дослідження терапевтичної дії найактивніших інгібіторів SK2-HDAC1 щодо експериментальних пухлин у мишей -меланому B16 та її сублінії B16/adr, стійкої до ліків. Отримані результати дадуть змогу оцінити терапевтичну ефективність новітніх дуальних інгібіторів SK2-HDAC1 у лікуванні меланому у порівнянні з традиційними лікарськими засобами, а також проаналізувати їх потенційні побічні ефекти на організм піддослідних тварин. Все це дозволить зробити висновки щодо доцільності подальшого впровадження цього класу сполук у клінічну практику як альтернативу іншим відомим таргетним препаратам.

## **15. Обґрунтування доцільності виконання роботи**

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

Таргетна терапія раку поряд із імунотерапією на сьогодні вважаються одним із найбільш перспективних підходів для лікування онкологічних захворювань. Але, незважаючи на значні успіхи фармацевтичних компаній у створенні високоефективних ліків, їхня загальна терапевтична ефективність наразі залишає бажати кращого. Причиною цього є надзвичайно швидкий розвиток стійкості пухлин до новітніх таргетних хіміотерапевтичних засобів, що включає цілу серію перебудов геному та протеому злоякісних клітин. Це, зокрема, вторинні генетичні зміни у цільових онкобілках, активація механізмів обхідної сигналізації та гіперактивація верхніх чи нижніх ланок сигнальних шляхів, на які діє таргетний препарат

(Garraway et al., 2012). Як наслідок, таргетна терапія вкрай ефективна в короткостроковому періоді, але не дозволяє забезпечити стабільну ремісію пухлини більше ніж на 6-9 місяців (Benvenuti et al, 2007). Цю проблему можна вирішити шляхом створення складних схем поліхіміотерапії, що поєднують кілька таргетних та традиційних лікарських препаратів, які діють на максимально широке коло мішеней. Але такі схеми лікування є надзвичайно дорогою, а їх застосування супроводжується розвитком тяжких побічних ефектів у пацієнтів. Саме тому пошук новітніх універсальних методів для таргетної терапії пухлин є надзвичайно актуальною задачею сучасної онкології і медицини.

У даному проекті нами запропоновано альтернативний підхід для вирішення цієї проблеми, що ґрунтується на поєднанні фармакофорів інгібіторів кількох протеїнкіназ у одній молекулі. Такі дуальні інгібітори кіназ повинні володіти рядом бажаних характеристик: збільшеним протипухлинним потенціалом у порівнянні з вихідними речовинами, вищою селективністю дії, а також нечутливістю до більшості механізмів стійкості злоякісних клітин до таргетної терапії. Крім того, використання однієї сполуки для інгібування активності кількох онкобілків-мішеней є значно кращим для якості життя пацієнта у порівнянні з комбінованою терапією окремими таргетними інгібіторами – адже при цьому суттєво знижуються як потенційні побічні ефекти хіміотерапії, так і вартість лікування онкохворого. Саме тому розробка та впровадження у клінічну практику подібних мультитаргетних інгібіторів протеїнкіназ має очевидне соціальне та економічне значення.

В якості мішеней нами було обрано дві онкобілки – казеїнкіназа 2 та гістондеацетилаза 1, які відіграють важливу роль у проліферації злоякісних клітин. Такі дуальні інгібітори вже були синтезовані іноземними партнерами проекту з кафедри органічної хімії Університету св. Павла (Мадрид, Іспанія), та пройшли попередні дослідження *in silico* та на здатність інгібувати активність вищезгаданих ензимів у безклітинних системах.

## 15.2. Стан розроблення проблеми.

«Золота ера» таргетних хіміотерапевтичних засобів розпочалася в 2001 році після гучного впровадження на ринок новітнього засобу для лікування лейкозів – іматинібу, розробленого компанією Novartis. Цей інгібітор онкобілка ABL демонстрував феноменально високі результати у лікуванні хронічних мієлобластних лейкозів, і проявляв мінімум побічних ефектів на організм пацієнтів – тобто ті цілі, які були недосяжними для традиційної хіміотерапії пухлин. Не дивно, що на засоби таргетної терапії у науковому світі покладалися особливі сподівання. Її сприймали як на прорив у лікуванні раку, що дозволить раз і назавжди покінчити з цією проблемою сучасності. На жаль, подальші розробки у цій галузі не виправдали покладених на них очікувань. Далеко не всі таргетні засоби терапії демонстрували направлену дію, яка була так пафосно анонсована, їхня вартість була надзвичайно високою для пересічних громадян, а клінічна ефективність – короткотривалою за рахунок швидкого розвитку набутої стійкості пухлин до ліків. Щоб усунути останній недолік, було запропоновано розробити множинні інгібітори кіназ – тобто ліки, які можуть одночасно діяти на дві і більше мішеней. Одним із прикладів успішної реалізації такої ідеї є лапатиніб – дуальний інгібітор рецепторів епідермального фактору росту ErbB1 та ErbB2, що випускається компанією GlaxoSmithKline і є дуже ефективним при лікуванні певних типів раку молочної залози та легень людини (Burriss et al, 2004). Ще однією історією успіху є створення дуального інгібітора кіназ Raf/MEK RO5126766, який наразі проходить III фазу клінічних досліджень на пацієнтах і обіцяє бути ефективним у лікуванні меланом, резистентних до класичних інгібіторів Raf (вемурафеніб) (Wada et al, 2014). Однак у всіх випадках дуальні інгібітори розробляють до споріднених онкобілків, що належать або до однієї родини (як у випадку з лапатинібом), або ж до ланок одного і того сигнального шляху (RO5126766). В даній роботі нами запропоновано поєднати у одній молекулі фармакофори інгібіторів двох структурно і функціонально відмінних протеїнкіназ – казеїнкінази 2 та гістондеацетилази.

Серин/треонінова протеїнкіназа СК2 (казеїнкіназа 2) задіяна у модуляції множинних сигнальних шляхів, що беруть участь у виживанні та функції гемопоетичних клітин, і тому є перспективною мішенню для розробки новітніх засобів таргетної терапії (Dominguez et al., 2009; Trembley et al., 2009; Piazza et al, 2012). СК2 конститутивно експресується у багатьох типах клітин. У нормальних клітинах СК2 рівномірно локалізована у всьому ядерному і цитоплазматичному просторах, тоді як у злоякісних клітинах СК2 в основному зосереджена у ядерному компартменті (Faust et al., 1999; Laramas et al., 2007). Ця різниця в розподілі СК2 може бути важливою з точки зору її біохімічної функції при раку. Гіперекспресія СК2 спостерігається



у багатьох гематологічних новоутвореннях, таких як хронічний мієлоїдний лейкоз (Martins et al., 2010), множинна мієлома (ММ; Piazza et al., 2006), Т-клітинні гострі лімфоцитарні лейкози (Т-ALL; Silva et al., 2008), і гострий мієлоїдний лейкоз (AML; Kim et al., 2007; Quotti Tubi et al., 2013). Більш того, збільшення активності СК2 у вищеперелічених захворюваннях корелювала з поганим прогнозом (Trembley et al., 2009). Всі ці дослідження ідентифікують СК2 як перспективну терапевтичну мішень для розробки нових таргетних засобів для лікування пухлин гематологічного ряду. Як наслідок, один із інгібіторів цього ензиму – СХ-4945 (сілмітасертиб) – продемонстрував позитивні результати на 2-й фазі клінічних досліджень в США на пацієнтах з холангіосаркомою, а також з лейкозами (Prins et al., 2013). Ще однією перевагою СХ-4945 над традиційними хімотерапевтичними засобами є пероральне використання хворими, що суттєво розширює можливості його застосування у клініці.

Не менш важливу роль у розвитку раку відіграють епігенетичні зміни у злоякісних клітинах, такі як метилювання/деметилювання ДНК та ацетилювання/деацетилювання гістонів. Ці процеси регулюються двома типами ензимів – гістон деацетилазами (HDAC) та гістон ацетилтрансферазами (HAT) (Eckschlager et al., 2017). Деацетилювання гістонів за допомогою HDAC посилює їх взаємодію з ДНК, ущільнюючи структуру хроматину, що призводить до інгібування транскрипції генів (Grunstein et al, 1997), а деацетилювання негістонових білків – до їх деградації через убіквітин-протеасомний шлях (Glozak et al, 2005). Це робить дані ензими перспективною мішенню для таргетної терапії. Було показано, що інгібітори HDAC індукують зупинку злоякісних клітин у певних фазах клітинного циклу, в подальшому призводячи до їх апоптозу, також вони пригнічують пухлино-індукований ангиогенез і модулюють імунну відповідь (Eckschlager et al., 2017). Деякі з цих сполук, зокрема вориностат, ромидепсин і беліностат, були схвалені Управлінням продовольства і медикаментів США (FDA) для лікування Т-клітинних лімфом, а панбіностат – для множинної мієломи (Kim et al, 2011).

Таким чином, і до кезінінази 2, і до гістондеацетилази уже створено ряд перспективних інгібіторів, які показали свою терапевтичну ефективність у клінічній практиці. Однак з фармацевтичної точки зору ці сполуки недалеко посунулися від розробок 20-річної давності, адже їх створення ніяк не вирішило фундаментальну проблему таргетної терапії – як уникнути розвитку стійкості пухлин до високоселективних інгібіторів? Тим не менше, вихід з цієї ситуації очевидний – поєднати фармакофори інгібіторів двох різних кіназ у одній молекулі. Такий крок дозволить на кілька порядків знизити шанс розвитку набутої стійкості пухлин до новітнього інгібітора, адже ймовірність одночасної появи у клітині-мішені двох «правильних» мутацій у двох еволюційно відмінних білках є зникаюче малою.

Ця задача була успішно вирішена нашими іспанськими колегами, які розробили дизайн таких інгібіторів *in silico*, синтезували понад 50 сполук, та відібрали з них 6 найбільш активних речовин, які демонстрували найвищі показники інгібування ензимів кезінінази 2 та гістондеацетилази 1 у безклітинних системах. Задачею наступного етапу роботи, який і буде виконуватися в рамках даного проекту, є біотестування даних сполук *in vitro* на панелі злоякісних клітин, чутливих та резистентних до хімотерапії, з'ясування молекулярних механізмів індукції апоптозу цими сполуками, та вивчення терапевтичного потенціалу речовин, які виявляються найактивнішими *in vitro*, на моделі меланоми В16 у мишей.

### Цитована література

1. Dominguez I., Sonenshein G. E., Seldin D. C. (2009). Protein kinase CK2 in health and disease: CK2 and its role in Wnt and NF-kappaB signaling: linking development and cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 1850–1857.
2. Trembley J. H., Wang G., Unger G., Slaton J., Ahmed K. (2009). Protein kinase CK2 in health and disease: CK2: a key player in cancer biology. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 1858–1867.
3. Piazza F. A., Ruzzene M., Gurrieri C., Montini B., Bonanni L., Chioetto G., et al. (2006). Multiple myeloma cell survival relies on high activity of protein kinase CK2. *Blood* 108, 1698–1707.
4. Faust R. A., Niehans G., Gapany M., Knapp D., Cherwitz D., Davis A., et al. (1999). Subcellular immunolocalization of protein kinase CK2 in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31, 941–949.
5. Laramas M., Pasquier D., Filhol O., Ringeisen F., Desxotes J.-L., Cochet C. (2007). Nuclear localization of protein kinase CK2 catalytic subunit (CK2a) is associated with poor prognostic factors in human prostate cancer. *Eur. J. Cancer* 43, 928–934.

6. Martins L. R., Lúcio P., Silva M. C., Anderes K. L., Gameiro P., Silva M. G., et al. (2010). Targeting CK2 overexpression and hyperactivation as a novel therapeutic tool in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 15, 2724–2731.
7. Piazza F., Manni S., Ruzzenem M., Pinna L. A., Gurrieri C., Semenzato G. (2012). Protein kinase CK2 in hematologic malignancies: reliance on a pivotal cell survival regulator by oncogenic signaling pathways. *Leukemia* 26, 1174–1179
8. Silva A., Yunes J. A., Cardoso B. A., Martins L. R., Jotta P. Y., Abecasis M., et al. (2008). PTEN posttranslational inactivation and hyperactivation of the PI3K/Akt pathway sustain primary T cell leukemia viability. *J. Clin. Invest.* 118, 3762–3774.
9. Kim J. S., Eom J. I., Cheong J. W., Choi A. J., Lee J. K., Yang W. I., et al. (2007). Protein kinase CK2 $\alpha$  as an unfavorable prognostic marker and novel therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res.* 13, 1019–1028.
10. Quotti Tubi L., Gurrieri C., Brancalion A., Bonaldi L., Bertorelle R., Manni S., et al. (2013). Inhibition of protein kinase CK2 with the clinical-grade small ATP-competitive compound CX-4945 or by RNA interference unveils its role in acute myeloid leukemia cell survival, p53-dependent apoptosis and daunorubicin-induced cytotoxicity. *J. Hematol. Oncol.* 6:78.
11. Trembley J. H., Wang G., Unger G., Slaton J., Ahmed K. (2009). Protein kinase CK2 in health and disease: CK2: a key player in cancer biology. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 1858–1867.
12. Burris HA. Dual kinase inhibition in the treatment of breast cancer: initial experience with the EGFR/ErbB-2 inhibitor lapatinib. *Oncologist.* 2004;9 Suppl 3:10-5.
13. Wada M, Horinaka M, Yamazaki T, Katoh N, Sakai T. The dual RAF/MEK inhibitor CH5126766/RO5126766 may be a potential therapy for RAS-mutated tumor cells. *PLoS One.* 2014 Nov 25;9(11):e113217.
14. Eckschlager T, Plch J, Stiborova M, Hrabeta J. Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. *Int J Mol Sci.* 2017 Jul 1;18(7). pii: E1414. doi: 10.3390/ijms18071414.
15. Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature.* 1997;389:349–352.
16. Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene.* 2005;363:15–23
17. Kim HJ, Bae SC. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *Am J Transl Res.* 2011 Feb;3(2):166-79. Epub 2010 Dec 26.
18. Garraway LA, Jänne PA. Circumventing cancer drug resistance in the era of personalized medicine. *Cancer Discov.* 2012 Mar;2(3):214-26. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0012. Epub 2012 Feb 28.

### 15.3. Досвід і доробок авторів.

Наукова група керівника проекту, д.б.н., с.н.с. Панчука Р.Р. вже тривалий час співпрацює з колегами з кафедри органічної хімії Університету св. Павла (Мадрид, Іспанія), які спеціалізуються на синтезі новітніх інгібіторів протеїнкіназ. Результатом такої співпраці є три статті у престижних журналах *RSC Advances* та *Organic Biomolecular Chemistry* з сумарним імпаکت-фактором 9,8.

На першому етапі нашої співпраці було проведено біотестування новітніх інгібіторів казеїнкінази 2, та показано їх значно вищу (у 2-3 рази) цитотоксичну активність щодо злоякісних клітин у порівнянні з класичним інгібітором цього ензиму ТВВ (4,5,6,7-тетрабромобензотріазол) (Swider et al, 2015). На другому етапі досліджень було зроблено першу спробу отримати високоефективні дуальні інгібітори казеїнкінази 2 та гістондеацетилази, та показано, що одна з синтезованих сполук демонструє на 50% вищу цитотоксичну активність у порівнянні з синергічною дією двох окремих інгібіторів цих ензимів – ТВВ та вориностату (Purwin et al, 2016). В той же час спроби наших колег створити високоефективні інгібітори казеїнкінази 2 та матриксних металопротеїназ були невдалими із-за недостатньо сильного зв'язування цих сполук з обидвома ензимами у безклітинних системах *in vitro* (Pastor et al, 2019). Саме тому було прийнято рішення удосконалити наші результати по створенню дуальних інгібіторів казеїнкінази 2 та гістондеацетилази, що дозволило б посилити їх протипухлинну активність мінімум у 2-3 рази із вихідними сполуками.

Результати попереднього скринінгу 6 новітніх інгібіторів, синтезованих нашими колегами, показали суттєве (до 5 раз) зростання цитотоксичної активності сполуки TFG-AC11 у порівнянні з речовиною TFM-DM35, описаною у попередній статті 2016 року.

Такі результати було досягнуто шляхом заміни залишку триазолу на дві метильні групи у довгому

аліфатичному ланцюзі, що зв'язує два фармакофори інгібіторів. Також показано позитивний ефект від додавання залишку вторинного аміну до молекули дуальних інгібіторів, що також призводило до посилення їх цитотоксичної активності *in vitro*. В той же час залишається невідомим, чи будуть зберігатися виявлені вище ефекти новітніх сполук на моделях *in vivo*, а також їх потенційна здатність долати набуту стійкість злоякісних клітин до традиційної та таргетної терапії. Вирішенню цих задач і буде присвячено даний проект.

#### Наукометричні показники виконавців проекту:

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

#### Публікації виконавців проекту по тематиці роботи

1. Pastor M, Zapico JM, Coderch C, Maslyk M, Panchuk R, de Pascual-Teresa B, Ramos A. From a MMP2/CK2 multitarget approach to the identification of potent and selective MMP13 inhibitors // *Org Biomol Chem.* – 2019. – V. 17, Is. 4. – P. 916-929 (IF=3,423)
2. 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=3.10)
3. Swider R., Maslyk M., Zapico J. M., Coderch C., Panchuk R., Skorokhyd N., Schnitzler A., Niefind K., de Pascual-Teresa Beatriz, Ramos A. Synthesis, Biological Activity and Structural Study of New Benzotriazole-Based Protein Kinase CK2 inhibitors // *RSC Advances.* – 2015. – V. 5. – P. 72482-72494 (IF= 3.10).

#### Інші публікації виконавців 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 C<sub>60</sub> 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., Matyichuk 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  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 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., Semenovich D.S., Moiseenok A.G., Stoika R.S. Antioxidants selenomethionine and D-pantethine differentially affect doxorubicin's action on glutathione system in human leukemia cells varying in their resistance to chemotherapy *in vitro.* *Biol. Stud.* 2018: 12(2); 13–24
6. 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
7. 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-pantethine 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)
8. Kobylinska L.I., Klyuchivska O.Y., Grytsyna I.I., Finiuk N., Panchuk R.R., Starykovych 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)

9. **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)
10. Prylutska S.\*, **Panchuk R.\***, Gołuński G.\*, Skivka L, Prylutskyy Yu., Hurmach V., Skorokhyd N., Borowik A., Wozniwodzka A., Piosik J. , Kyzyma O., Garamus V., Bulavin L., Evstigneev M., Buchelnikov A., Stoika R. , Berger W., Ritter U., Scharff P.C<sub>60</sub> 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)
11. 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)
12. **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)
13. Kobylynska 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)
14. Prylutska S.V., Skivka L.M., Didenko G.V., Prylutskyy Yu.I., Evstigneev M.P., Potebnya G.P., **Panchuk R.R.**, Stoika R.S., Ritter U., Scharff P. Complex of C<sub>60</sub> fullerene with doxorubicin as a promising agent in antitumor therapy // *Nanoscale Research Letters* – 2015. – V. 10. – P. 499. (IF=3,12)
15. **Panchuk R.R.**, Prylutska S.V., Chumak V.V., Skorokhyd N.R., Lehka L.V., Evstigneev M.P., Prylutskyy Yu.I., Berger W., Heffeter P., Scharff P., Ritter U., Stoika R.S. Application of C<sub>60</sub> 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)
16. 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  $\beta$ -Diketonates // *J Med Chem.* – 2015. – V. 58, N. 9. – P. 3984-3996. (IF=6,26)
17. 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- $\kappa$ B translocation // *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* – 2015. – V. 121 (Pt A). – P. 91-96. (IF=2,99)
18. **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).

#### 15.4. Структура досліджень.

Даний проект складатиметься з 5 основних етапів

1. Вивчення структурно-функціональних закономірностей, що визначають цитотоксичну активність новітніх інгібіторів казеїнкінази-2 та гістондеацетилази-1 щодо злоякісних та псевдонормальних клітин *in vitro* (2020 рік)
2. Дослідження потенційної здатності новітніх дуальних інгібіторів кіназ долати набуту стійкість злоякісних клітин до хіміотерапії, обумовлену різними чинниками (2021 рік)
3. Дослідження механізмів індукції апоптозу, індукції оксидативного стресу та функціонального стану мітохондрій у злоякісних та псевдонормальних клітинах людини дуальними інгібіторами СК2-HDAC1 (2022 рік)
4. Вивчення потенційних побічних ефектів (гепато-,нефро-, мієло-, кардіотоксичність) найактивніших інгібіторів СК2-HDAC1 щодо експериментальних тварин (миші) (2023 рік)
5. Аналіз терапевтичної активності найактивніших інгібіторів СК2-HDAC1 щодо мишей з перевиваною меланою B16 та її сублінією B16/adr, стійкої до хіміотерапії (2024 рік)



В ході виконання **I етапу роботи** цитотоксична активність нових дуальних інгібіторів кazeїнкінази 2 та гістондеацетилази буде досліджена на панелі злoякісних та псевдонормальних клітин людини. 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 злoякісних клітин охоплює основні види злoякісних новоутворень у людини (лейкоз, карцинома, гліома), тому її використання дозволить швидко проаналізувати специфічність дії новітніх дуальних інгібіторів. 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 сполук є вибірковою лише щодо злoякісних клітин.

Крім того, в ході виконання I етапу буде проведено аналіз структурно-функціональних закономірностей, що визначають протипухлинну дію найактивніших представників дуальних інгібіторів CK2-HDAC1. Зокрема, буде ідентифіковано ті мотиви в молекулі інгібіторів, які забезпечують найвищу цитотоксичну активність щодо злoякісних клітин і помірну – щодо псевдонормальних, а також виявлено ті структурні елементи новітніх інгібіторів, які навпаки, послаблюють їх протипухлинний потенціал. Отримані результати в подальшому буде використано для дизайну та хімічного синтезу наступного покоління даних інгібіторів іспанськими партнерами проекту (група проф. Ани Рамос, Університет св. Павла, Мадрид).

На **другому етапі роботи** буде досліджено потенційну здатність новітніх інгібіторів CK2-HDAC1 долати набуту стійкість злoякісних клітин до хіміотерапії, обумовлену різними чинниками.. Для цього буде використано унікальну панель злoякісних ліній клітин з фенотипом множинної медикаментозної резистентності, люб'язно наданими Інституту 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 вінкрістину, 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 як цитотоксичну активність новітніх дуальних інгібіторів кіназ щодо злoякісних клітин людини, так і їх потенційну здатність долати набуту стійкість пухлин до традиційної та таргетної хіміотерапії. 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 інгібіторів щодо злoякісних та псевдонормальних клітин людини (кератиноцити лінії HaCat, ембріональні клітини нирки людини 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 злoякісних, при застосуванні одних і тих же доз дуальних інгібіторів кіназ. Для з'ясування, яким саме шляхом – мітохондріальним, рецептор-опосередкованим, чи ER-опосередкованим – відбувається загибель клітин за дії вищезгаданих інгібіторів, нами буде визначено рівень активних форм кисню та функціональний стан мітохондрій злoякісних та псевдонормальних клітин методом проточної цитофлуориметрії. Як відомо, зростання рівня супероксид-аніонів тісно пов'язане з деполаризацією мітохондрій за дії проапоптичного чинника, тоді як продукція пероксиду водню без ознак супероксид-аніонів є ознакою позамітохондріальної індукції АФК – внаслідок стресу ендоплазматичного ретикулуму, або ж активності НАДФ-дегідрогеназ у плазматичній мембрані. Детекція продукції  $\text{H}_2\text{O}_2$  і  $\text{O}_2^-$  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 інгібіторів 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 інгібіторів шляхом фарбування барвником JC-1. Це

дозволить співставити потенційну продукцію супероксид-аніонів за дії цих сполук (якщо такий феномен буде виявлено) із деполіаризацією 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 злоякісних 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 антиапоптотичних 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 інгібіторами – мітохондріальний (через каспазу-9), рецептор-опосередкований (через каспазу-8) та ER-опосередкований (каспаза-2).

На **четвертому етапі досліджень** буде вивчено потенційні побічні ефекти дуальних інгібіторів кіназ, які продемонстрували найвищу цитотоксичну активність та найбільшу вибіркковість дії щодо пухлинних та псевдонормальних клітин у експериментах *in vitro*. Буде встановлено максимально переносиму та напівлетальну дозу інгібіторів CK2-HDAC1 у мишей, 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 Sinnowa 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 сполук-лідерів та підібрати оптимальну дозу цих речовин для подальших досліджень.

На **п'ятому етапі досліджень** буде досліджено терапевтичний потенціал дуальних інгібіторів кіназ, які продемонстрували найвищу цитотоксичну активність та найбільшу вибіркковість дії щодо пухлинних та псевдонормальних клітин у експериментах *in vitro*. Для цього буде використано перевивану меланому B16 у мишей, яка вважається однією з найбільш агресивних і високометастатичних пухлин. Буде проведено оцінку тривалості життя мишей-пухлиноносіїв, 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 інгібіторів CK2-HDAC1 долати набуту стійкість пухлин до ліків *in vivo* – на моделі меланоми B16/adr, стійкої до доксорубіцину. Отримані результати буде використано для оцінки терапевтичної ефективності дуальних інгібіторів CK2-HDAC1 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, де працює керівник даного проекту, д.б.н. Панчук Р.Р., 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 злоякісного переродження клітин тварин і людини та з'ясування принципів дії деяких протипухлинних препаратів та механізмів виникнення стійкості злоякісних 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 CO<sub>2</sub>-інкубатори, мікропланшетний рідер для імуноферментативних аналізів (ELISA), біохімічний аналізатор крові Sinnowa 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
Технологія напівпромислового синтезу новітніх дуальних інгібіторів казеїнкінази 2 та гістондеацетилази	Вітчизняні фармацевтичні компанії - ПАТ "Фармак", корпорація "Артеріум"	50 млн грн/рік - за умов виходу на ринки СНД і Східної Європи.
Протоколи доклінічних досліджень дуальних інгібіторів казеїнкінази 2 та гістондеацетилази 1 на моделях експериментальних пухлин у мишей	Фармацевтичні компанії України: ПАТ "Фармак", корпорація "Артеріум"	Дані протоколи доклінічних досліджень є складовим елементом портфолію щодо синтезу та виробництва новітніх дуальних інгібіторів кіназ, який буде пропонуватися потенційним інвесторам-фармацевтичним компаніям. Запланований обсяг впровадження новітніх таргетних засобів на ринку Східної Європи та СНД - 50 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. Зрозуміло, що про вітчизняні засоби таргетної терапії раку взагалі мова не йде – і як наслідок, лише одиниці онкохворих в Україні здатні за власний кошт оплатити космічно дорогу вартість цих засобів, один курс лікування якими може становити 100 000 доларів США.

Саме тому актуальність і економічна доцільність від створення новітніх засобів таргетної терапії раку та їх подальшого впровадження у вітчизняну клінічну практику, не викликає сумнівів. Дуальні інгібітори казеїнкінази 2 та гістондеацетилази, синтезовані іспанськими партнерами даного проекту, є перспективними протипухлинними препаратами, які можуть бути позбавлені традиційних недоліків таргетної терапії – високої ціни, короткотривалого терапевтичного ефекту та швидкого набуття пухлинами стійкості до них.

В ході виконання роботи буде проведено повномасштабне біо-тестування 6 найбільш перспективних представників даної родини сполук, включно з дослідженнями на перевиваній моделі меланоми В16 у мишей. Якщо ці речовини проявлять високу терапевтичну ефективність *in vivo*, а також продемонструють низькі побічні ефекти на внутрішні органи та імунну систему піддослідних тварин, це вказуватиме на доцільність їх впровадження у клінічну практику. У цьому випадку виконавці проекту будуть захищати свої інтелектуальні права шляхом

оформлення європейського патенту, та шукати потенційних інвесторів – вітчизняних та європейських фармацевтичних компаній, зацікавлених у випуску такої продукції.

### 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"	Технологія напівпромислового синтезу дуальних інгібіторів казеїнкінази та гістондеацетилази	50 млн грн/рік - для ринку СНД і Східної Європи

### 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 1200,000 тис. грн.

словами: один мільйон двісті тисяч грн.

### 20.2. Вартість роботи:

Роки виконання роботи	2020 р.	2021 р.	2022 р.	2023 р.	2024 р.
Вартість виконання робіт (тис. грн.)	240,000	240,000	240,000	240,000	240,000

### 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
Філоненко Валерій Вікторович	академік НАН України, д.б.н., проф., завідувач відділу	Ін-т молекулярної біології і генетики НАН України
Мінченко Олександр Григорович	член-кореспондент НАН України, д.б.н., проф., завідувач відділу	Ін-т біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України
Фільченков Олексій Олексійович	к.б.н., с.н.с., старший науковий співробітник	Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім.Р.С.Кавецького НАН України
Магишевська Ольга Павлівна	д.б.н., проф., провідний науковий співробітник	Ін-т біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України
Федоренко Віктор Олександрович	д.б.н., проф., завідувач кафедри	Львівський національний університет імені Івана Франка
Рибальченко Володимир Корнійович	д.б.н., проф., завідувач сектору	НДС мембранології і цитології ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка

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

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

04.03.2020

дата

Директор  
Інституту біології клітини НАН України  
академік НАН України



Андрій СИБІРНИЙ

М.П.

Науковий керівник роботи

Старший науковий співробітник  
Інституту біології клітини НАН України  
д.б.н., с.н.с.

Ростислав ПАНЧУК  
(підпис)

Ростислав ПАНЧУК



ПОГОДЖЕНО

Директор  
Інституту біології клітини НАН України  
академік НАН України

Андрій СИБІРНИЙ

(підпис)

«09» березня 2020 р.

М.П.

ЗАТВЕРДЖУЮ

Співкоординатор Програми  
академік НАН України

Сергій КОМІСАРЕНКО

(підпис)

«\_\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

М.П.

### ТЕХНІЧНЕ ЗАВДАННЯ

на виконання наукової (науково-технічної) роботи

**«Механізми дії нових дуальних інгібіторів казеїнкінази 2 та гістондеацетилази у таргетній хіміотерапії пухлин з медикаментозною резистентністю»**

**Цільова програма наукових досліджень НАН України «Геномі, молекулярні та клітинні основи розвитку інноваційних біотехнологій» 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)**

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

2.2.2.5. Пошук шляхів та засобів подолання резистентності патогенів та злоякісних клітин

2.2.4.3. Вивчення молекулярно-генетичних основ регуляції метаболічних процесів при пухлинній хворобі

#### **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 ідентифікація молекулярних механізмів, що лежать в основі протипухлинної активності новітніх дуальних інгібіторів казеїнкінази 2 та гістондеацетилази, особливо їх здатності долати набуту стійкість до традиційної та таргетної хіміотерапії. Ключовим завданням проекту є доклінічні дослідження найактивніших сполук-лідерів на моделях експериментальних пухлин у мишей, чутливих та стійких до хіміотерапії.

### **7. Термін проведення роботи:**

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

Орієнтовний обсяг коштів на виконання роботи в цілому **1200,000** тис. грн.  
та по роках

2020 р. — 240,000 тис. грн.

2021 р. — 240,000 тис. грн.

2022 р. — 240,000 тис. грн.

2023 р. — 240,000 тис. грн.

2024 р. — 240,000 тис. грн.

## 8. Календарний план роботи

№ з/п	Найменування основного етапу роботи	Термін виконання	Відповідальний виконавець
1	Вивчення структурно-функціональних закономірностей, що визначають цитотоксичну активність новітніх інгібіторів кazeїнкінази-2 та гістондеацетилази-1 щодо злоякісних та псевдонормальних клітин <i>in vitro</i>	01 квітня 2020 р. - 31 грудня 2020 р.	член-кор. НАН України, д.б.н., проф., Р.С. Стойка; д.б.н., с.н.с., Р.Р. Панчук; к.б.н., Ю.С. Козак; Н.Р. Скорохід; к.б.н., Н.І. Кащак.
2	Дослідження потенційної здатності новітніх дуальних інгібіторів кіназ 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; д.б.н., с.н.с., Р.Р. Панчук; к.б.н., Ю.С. Козак; Н.Р. Скорохід; к.б.н., Н.І. Кащак.
3	Дослідження механізмів індукції апоптозу, індукції оксидативного стресу та функціонального стану мітохондрій у злоякісних та псевдонормальних клітинах людини дуальними інгібіторами CK2-HDAC1	01 січня 2022 р. - 31 грудня 2022 р.	член-кор. НАН України, д.б.н., проф., Р.С. Стойка; д.б.н., с.н.с., Р.Р. Панчук; к.б.н., Ю.С. Козак; Н.Р. Скорохід; к.б.н., Н.І. Кащак.
4	Вивчення потенційних побічних ефектів (гепато-,нефро-, мієло-, кардіотоксичність) найактивніших інгібіторів CK2-HDAC1 щодо експериментальних тварин (миші)	01 січня 2023 р. - 31 грудня 2023 р.	член-кор. НАН України, д.б.н., проф., Р.С. Стойка; д.б.н., с.н.с., Р.Р. Панчук; к.б.н., Ю.С. Козак; Н.Р. Скорохід; к.б.н., Н.І. Кащак.
5	Аналіз терапевтичної активності найактивніших інгібіторів CK2-HDAC1 щодо мишей з перевиваною меланою B16 та її сублінією B16/adr, стійкої до хіміотерапії	01 січня 2024 р. - 31 грудня 2024 р.	член-кор. НАН України, д.б.н., проф., Р.С. Стойка; д.б.н., с.н.с., Р.Р. Панчук; к.б.н., Ю.С. Козак; Н.Р. Скорохід; к.б.н., Н.І. Кащак.

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

У ході виконання роботи буде ідентифіковано структурні елементи новітніх дуальних інгібіторів казеїнкінази 2 та гістондеацетилази, які відповідають за їх таргетну дію на злякисні клітини людини та потенційну здатність долати набуту стійкість злякисних клітин до хіміотерапії. Також буде порівняно механізми проапоптичної дії цих сполук на злякисні 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 інгібіторів, які продемонстрували найвищу активність та вибірковість дії у експериментах *in vitro*. Очікується, що за своїм протипухлинним потенціалом вони не поступатимуться іншим таргетним засобам. Результати роботи буде опубліковано у фахових міжнародних журналах, а запропонований метод синтезу новітніх інгібіторів буде запатентовано.

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

У ході виконання роботи буде ідентифіковано структурні елементи новітніх дуальних інгібіторів казеїнкінази 2 та гістондеацетилази, які відповідають за їх таргетну дію на злякисні клітини людини та потенційну здатність долати набуту стійкість злякисних клітин до хіміотерапії. Також буде порівняно механізми проапоптичної дії цих сполук на злякисні 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 інгібіторів, які продемонстрували найвищу активність та вибірковість дії у експериментах *in vitro*. Очікується, що за своїм протипухлинним потенціалом вони не поступатимуться іншим таргетним засобам. Результати роботи буде опубліковано у фахових міжнародних журналах, а запропонований метод синтезу новітніх інгібіторів додатковими 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

Старший науковий співробітник  
Інституту біології клітини НАН України  
д.б.н., с.н.с.

  
(підпис)

Ростислав ПАНЧУК



**Планова калькуляція кошторисної вартості наукової (науково-технічної) роботи**

**«Механізми дії нових дуальних інгібіторів казеїнкінази 2 та гістондеацетилази у таргетній хіміотерапії пухлин з медикаментозною резистентністю»  
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	80,000
2	Нарахування на оплату праці	2120	17,600
3	Предмети, матеріали, обладнання та інвентар	2210	98,400
4	Видатки на відрядження	2250	4,000
5	Оплата електроенергії	2273	24,000
6	Оплата природного газу	2274	16,000
<b>Разом:</b>			<b>240,000</b>
в т.ч. накладні витрати			24,000
% їх до основної заробітної плати			30,0%

**УСТАНОВА-ВИКОНАВЕЦЬ:**

Директор  
Інституту біології клітини НАН України  
академії НАН України

  
\_\_\_\_\_ Андрій СИБІРНИЙ

М.П.

Науковий керівник роботи  
Старший науковий співробітник  
Інституту біології клітини НАН України  
д.б.н., с.н.с.

  
\_\_\_\_\_ Ростислав ПАНЧУК

(підпис)