



BiOrgaMST

Биоактивни органични и неорганични
авангардни материали и чисти технологии

Химикотехнологичен и Металургичен Университет



**Funded by the
European Union**

NextGenerationEU

**EXECUTIVE AGENCY
"PROGRAMME
EDUCATION"**



MINISTRY
OF EDUCATION
AND SCIENCE



**Научноизследователски Университет
проект №BG-RRP-2.004-0002, "BiOrgaMST"**

Научноизследователска група

„3.2.2. Изследване на биологична активност на биомолекули“



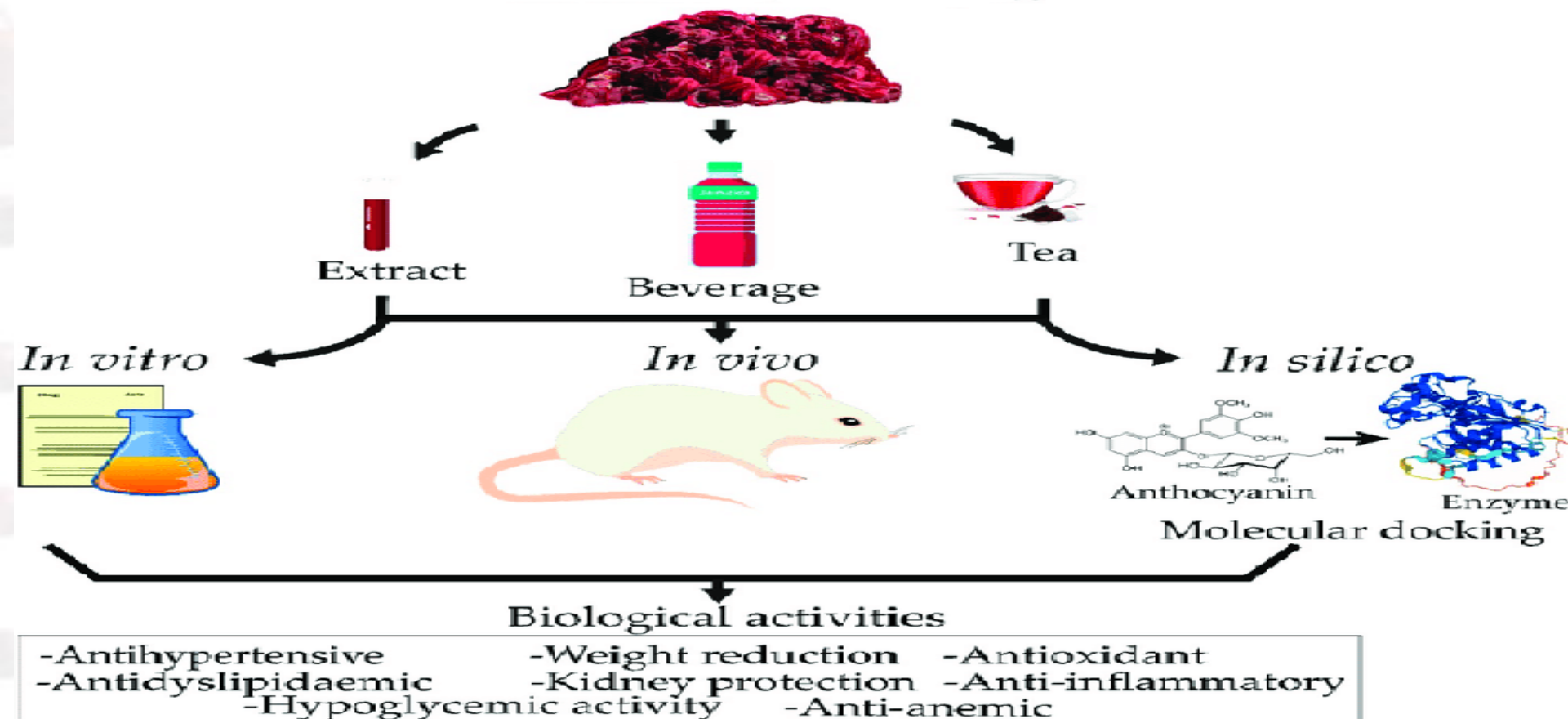
BiOrgaMCT

Биоактивни органични и неорганични
авангардни материали и чисти технологии

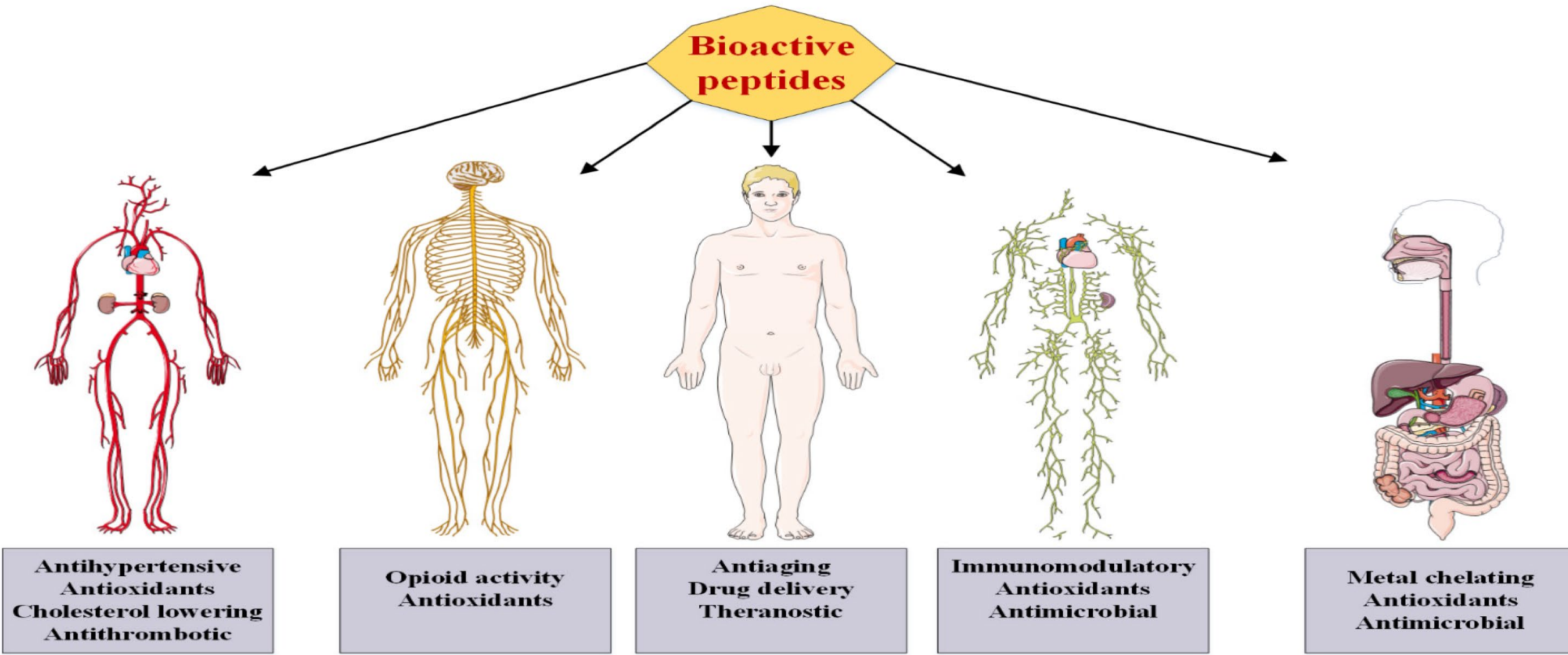


Funded by the
European Union

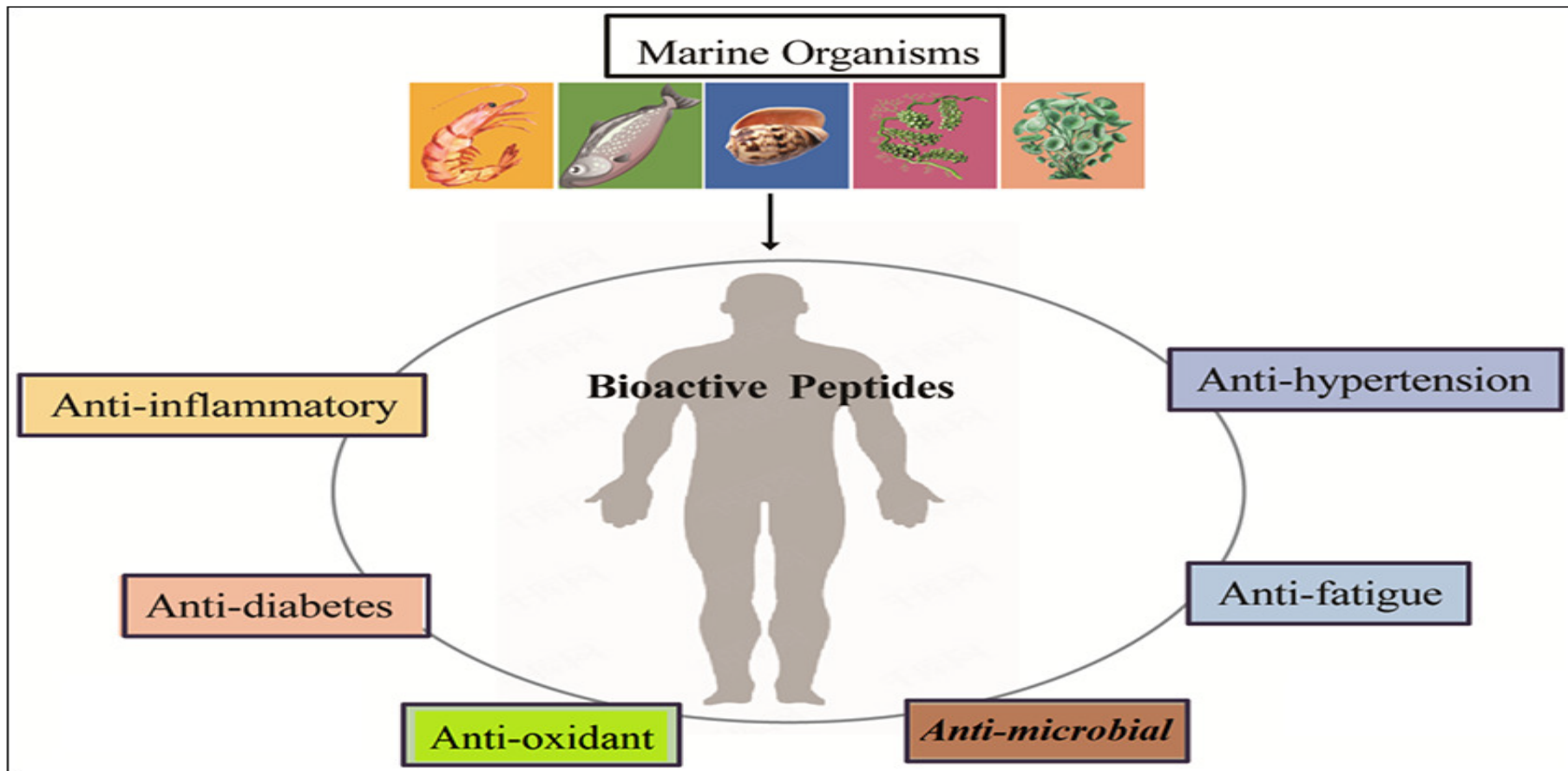
NextGenerationEU



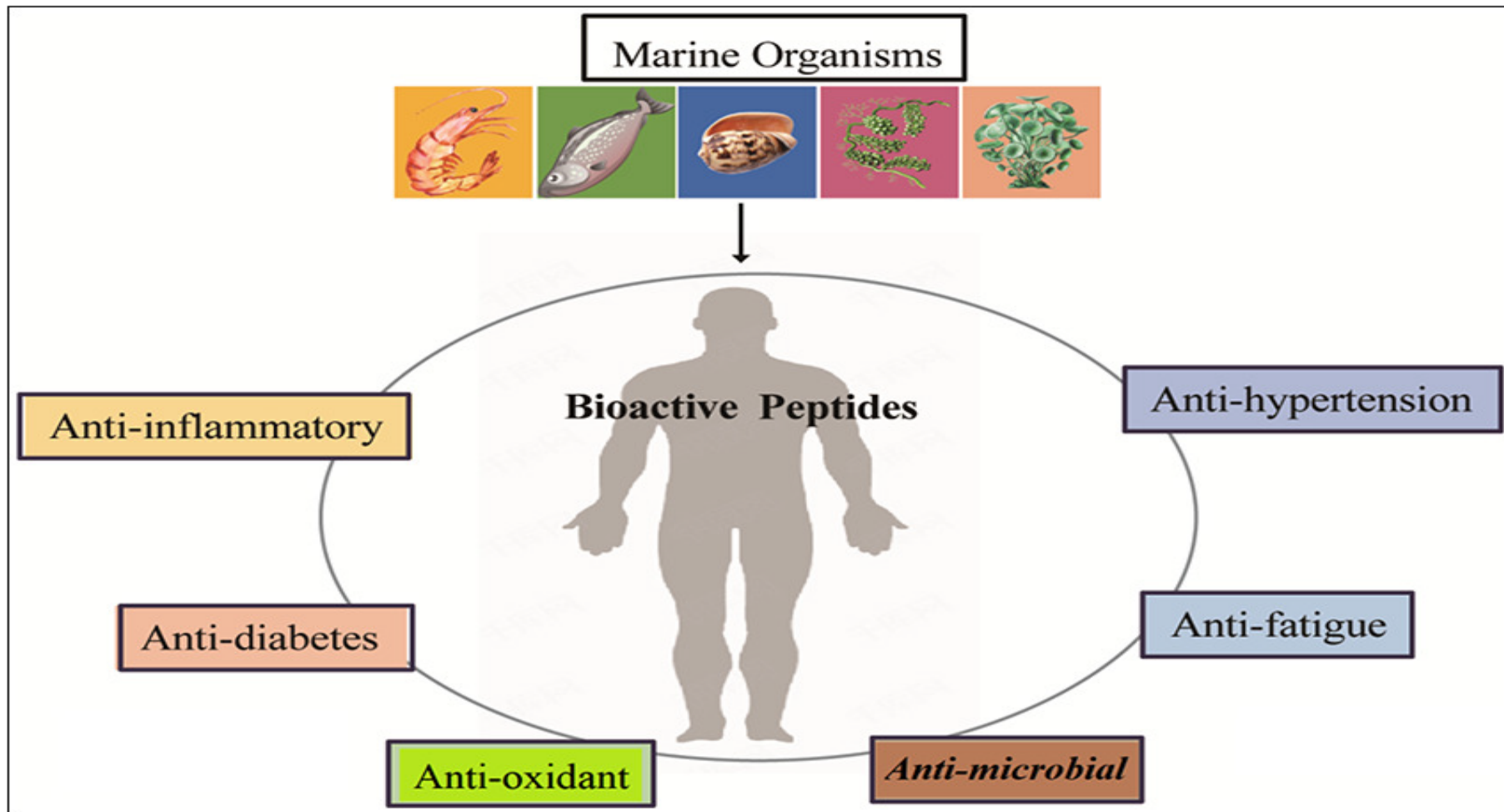
Интегрирането на няколко научни направления като химия, физикохимия, биология, микробиология, биотехнологии и др., допринася за дизайн на много нови съединения, определяне на техните структури, механизми на действие и потенциална биологична активност чрез *ин силико*, *ин vitro* и *ин vivo* подходи. Развитието на биомедицинските направления дава възможност на учените и промишлените предприятия за насочени и задълбочени изследвания върху нови молекули – **от синтеза до тяхното целенасочено приложение.**



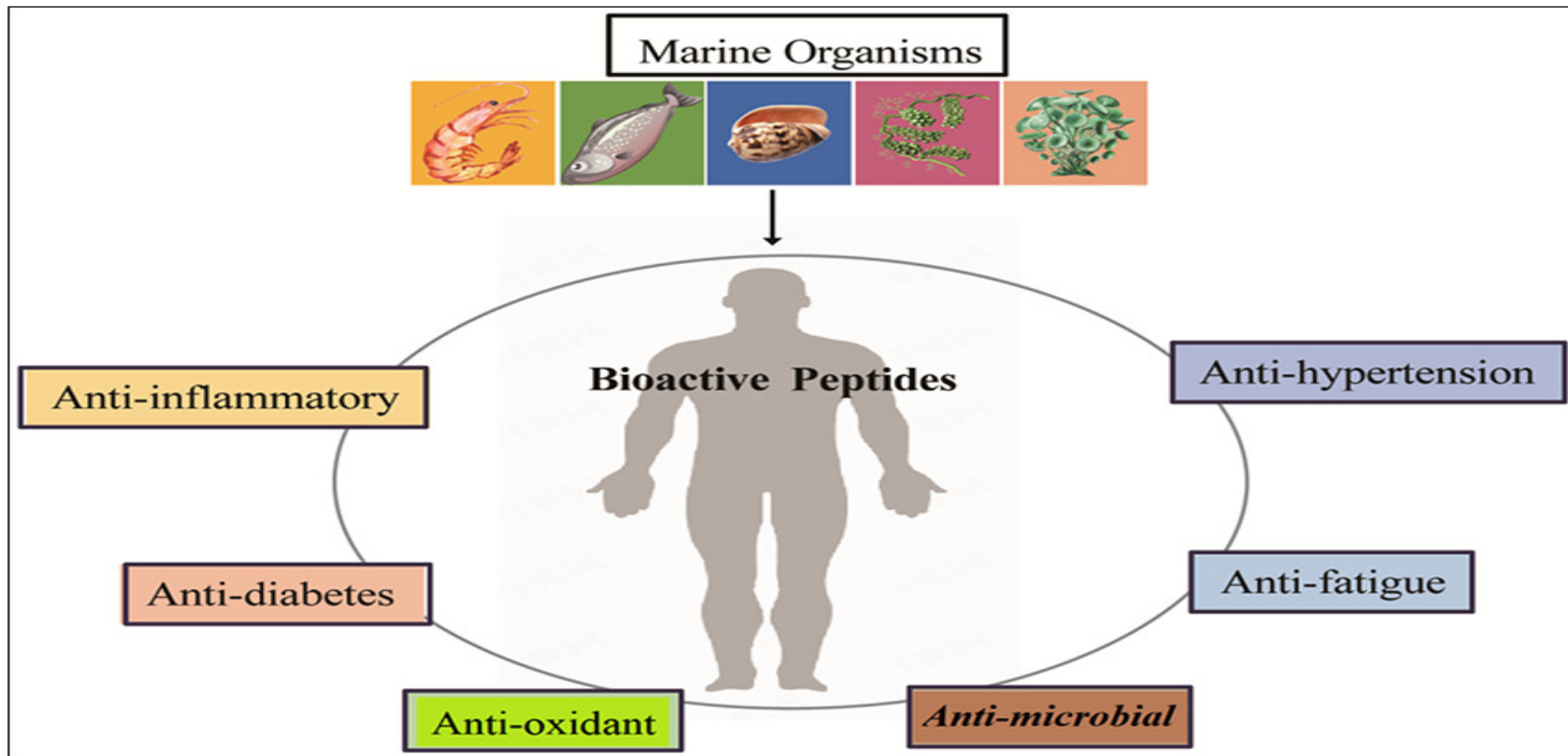
- широко изучаваните биологично активни вещества.
- невротрансмитери, невромодулатори, хормони, ензими и др.
- Синтетични и полусинтетични пептиди
- Синтез на с-я със сходни структури „пептидни миметици“



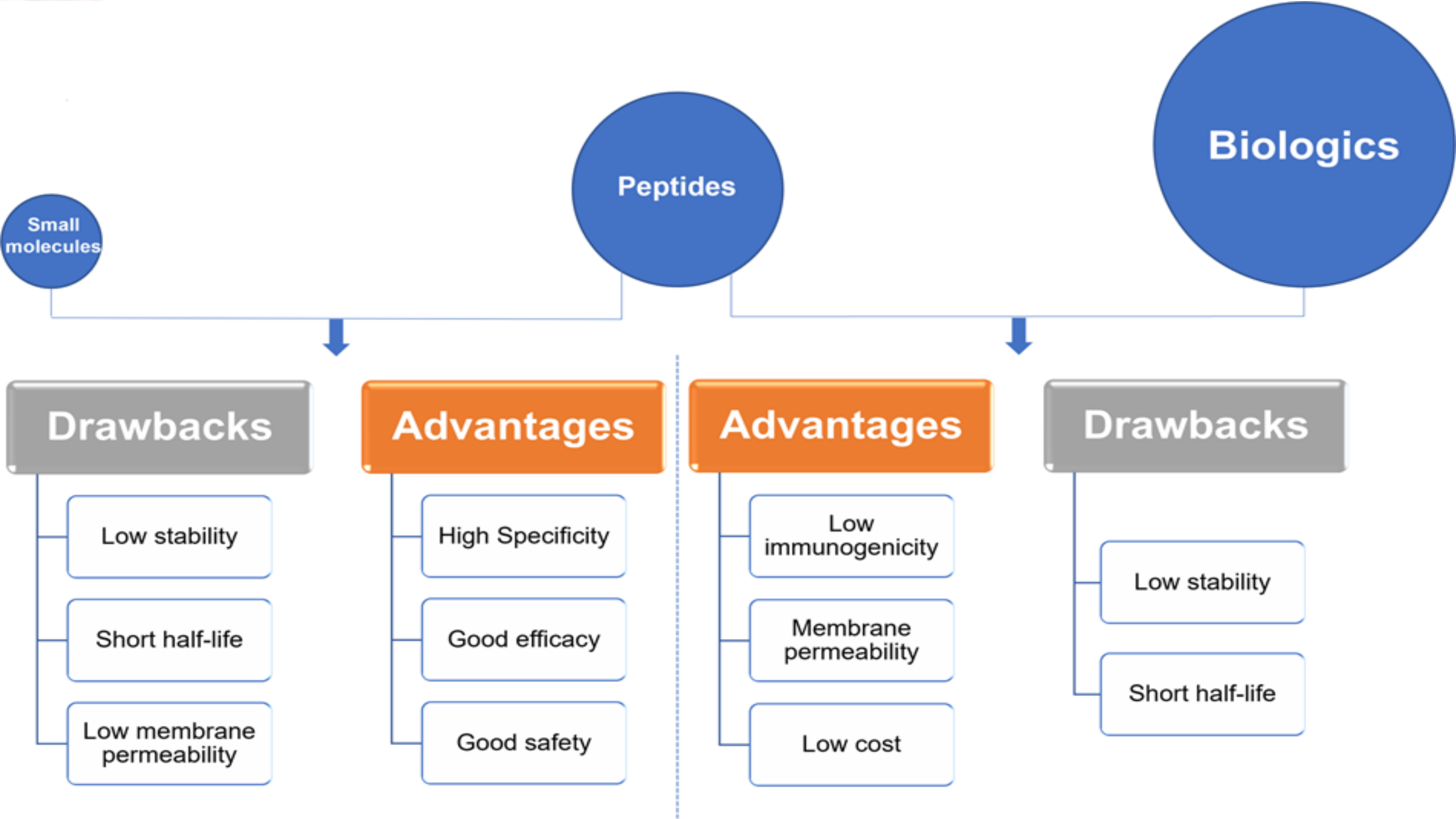
- ❑ нови производствени, модифицирани и аналитични технологии за разработване на пептидни лекарства
- ❑ модификация чрез химични и биологични методи, нови подходи и стратегии за третиране
- ❑ Голямо разнообразие от естествени и модифицирани пептиди използвани в биомедицината покриващи множество терапевтични области.

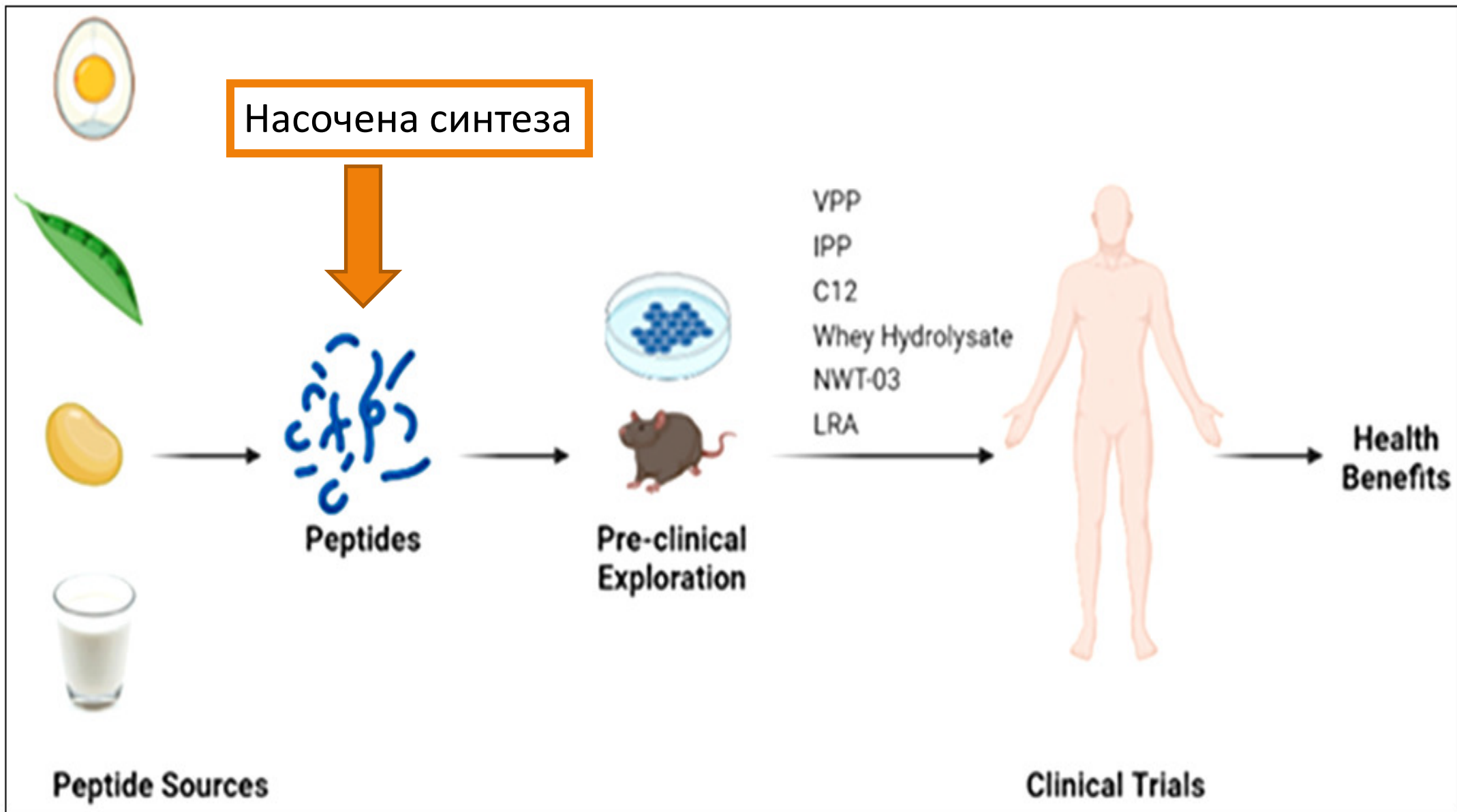


Биоактивните пептиди са намерили приложение в различни области като фармация, парфюмерия, козметика, хранително-вкусова промишленост. В медицинската практика те се използват главно в области като онкология, ендокринология, травматология, диагностика и др.



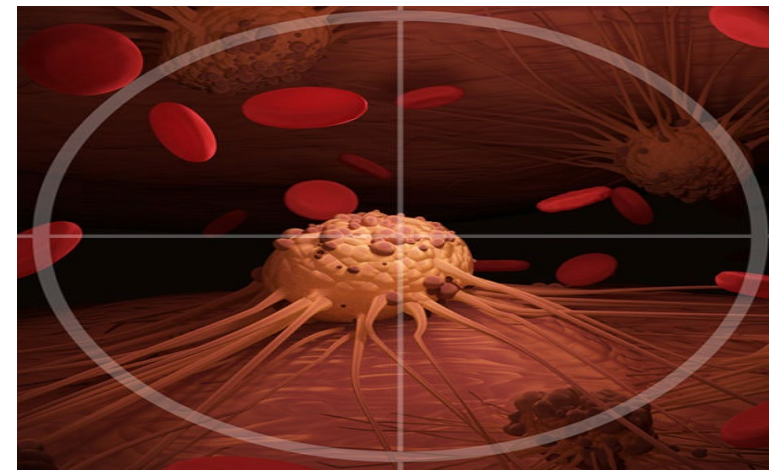
- 1950-те до 1990-те години – напредък в технологиите за пречистване и синтез на протеини, охарактеризиране и секвениране за разработване на пептидни лекарства
- Одобрени над 40 пептидни лекарства в света - синтетичен окситоцин, синтетичен вазопресин /дезмопресин – изкуствен диабет/ и рекомбинантен човешки инсулин





- лекарства прилагани на основата на модифицирани АК, *метални комплекси на аминокиселини и пептиди* като фероспартин, паматон, еналаприл, оксирич, магнерич и др.
- Пептиди директно насочени към раковите клетки, без да засягат нормалните клетки, се развива като алтернативна стратегия на конвенционалната химиотерапия и е част от съвременната таргетна терапия.
- Предимства - малък размер, бърз синтез и възможност за модифициране, способност за проникване в клетките, включително туморните, и добра биосъвместимост.
- метални йони като сребро (I), мед (II), желязо (II), желязо (III), цинк (II) и платина (II) и други, проявяват широка биологична активност.
- Проучвания показват, че свободни метали и лиганди са по-слабо активни, отколкото комплекси получени от тях.

В последните години акцент е създаването на комплекси, съдържащи метален йон инкорпориран в пептиден лиганд с цел изследване на тяхната структура, състав и биологична активност като потенциални противоракови средства.



WP1 Дейност 1.4. Синтез и охарактеризиране на метални комплекси с пептиден лиганд, съдържащ биоактивни метали



инж. Атанас Шопов

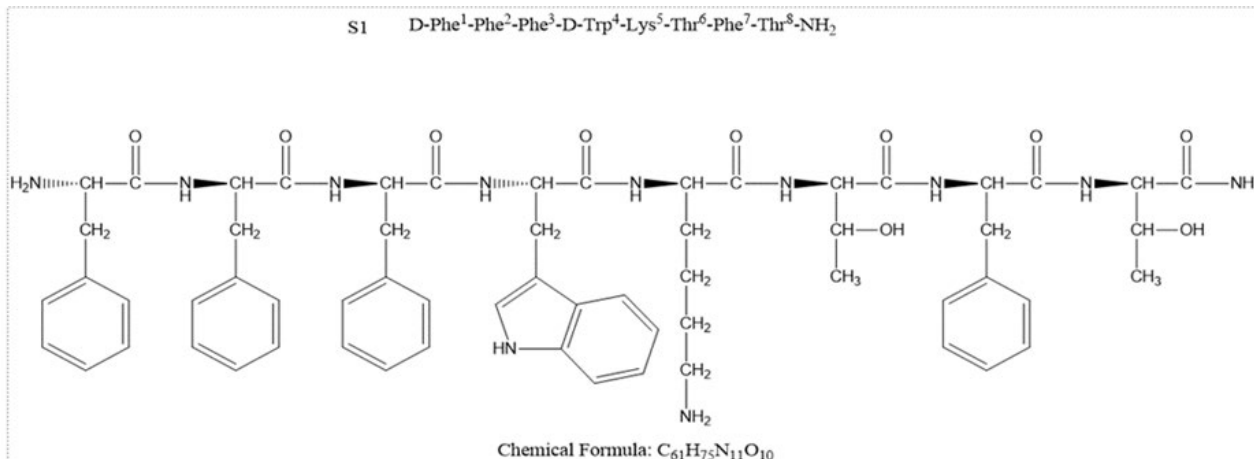


доц. Вероника Караджова

Целта на изследването е синтез и охарактеризиране на метален комплекс, съдържащи пептиден лиганд и биогенни елементи с потенциална биологична активност



Синтезиран е моделен пептид BIM23052 (D-Phe¹-Phe²-Phe³-D-Trp⁴-Lys⁵-Thr⁶-Phe⁷-Thr⁸-NH₂) с цел да се получат негови комплекси с биогенни метали



WP1 дейност 1.5. Биологично изследване на молекули с **противоракови**, **антимикробни**, **противовъзпалителни** свойства и **опиоидна** активност

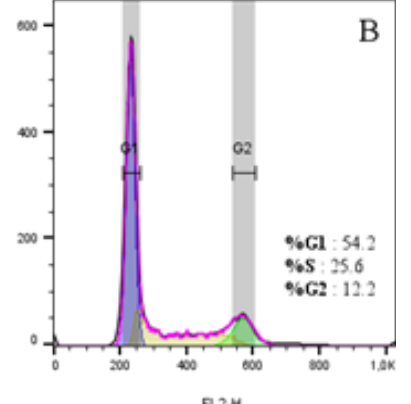
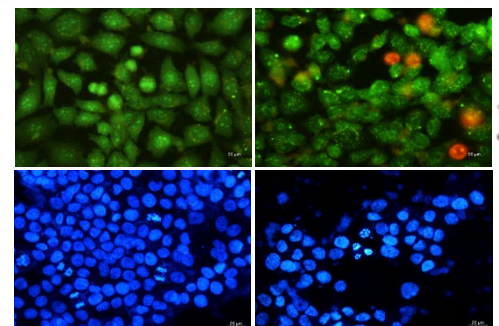
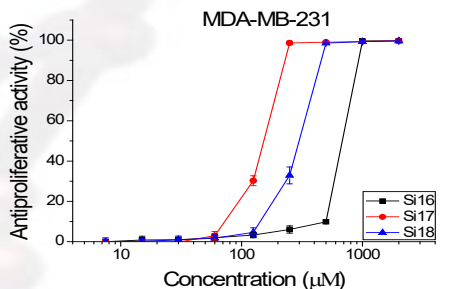
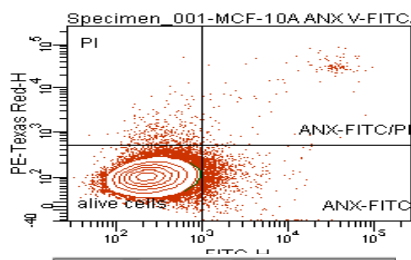
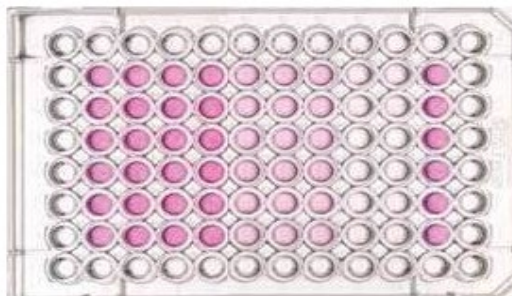
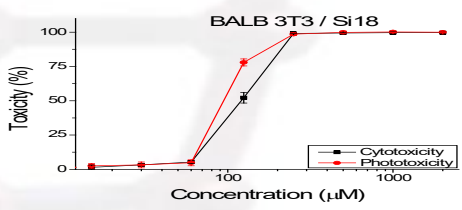


Тестиране на новосинтезирани молекули с потенциална противотуморна активност и приложение в онкологията



Туморни и нормални клетъчни култури

Тествани вещества

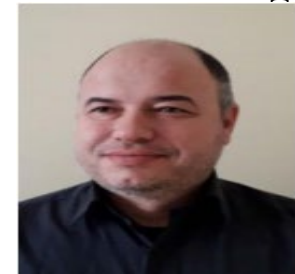


Тест за безопасност (Цитотоксичност / Фототоксичност)
Оценката за безопасност на новосинтезирани вещества е важна за опазване на човешкото здраве. Веществата с ниска токсичност могат да бъдат приложени в области, като медицина, фармацевция, козметика и др.

Тест за антипролиферативна и антитуморна активност
Този *in vitro* тест може за кратко време да определи антитуморния потенциал на новосинтезираните съединения.

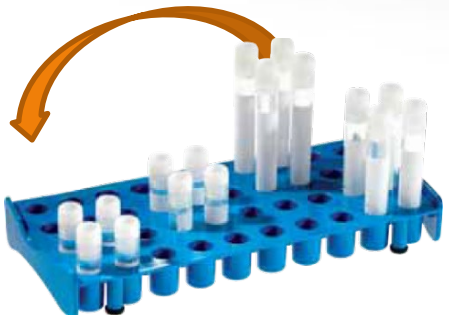
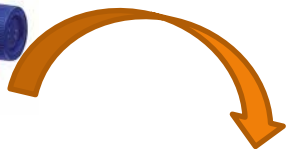
Флуоресцентна микроскопия
Чрез микроскопски анализ могат да бъдат регистрирани промени в клетъчната и ядрена морфология, настъпили в резултат от третиране с новосинтезираните вещества.

Флуцитометричен анализ
От анализите за определяне на апоптоза и клетъчен цикъл можем да получим допълнително информация за механизма на действие на изследваните вещества.

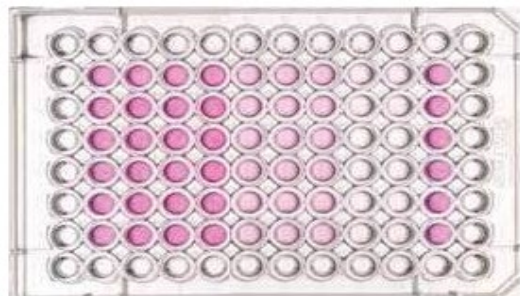


доц. И. Илиев д-р И. Суликовска д-р Р. Христова

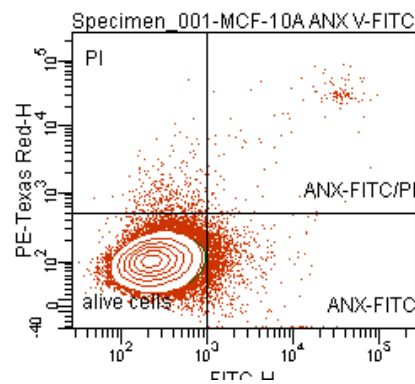
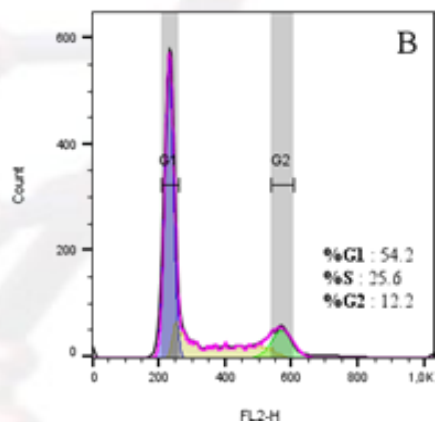
Тест за безопасност и антипролиферативна активност на новосинтезирани пептидни аналози и хетероциклени молекули



Туморни и нормални
клетъчни култури



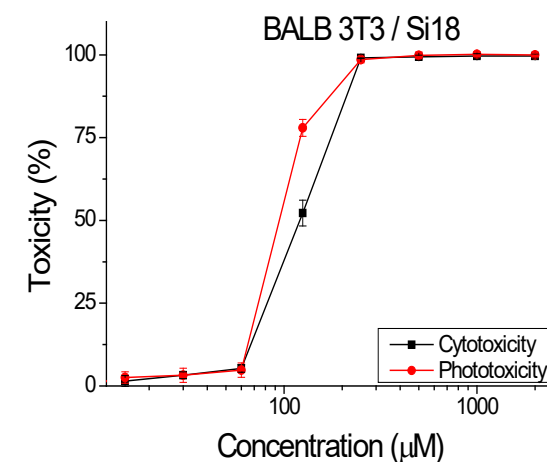
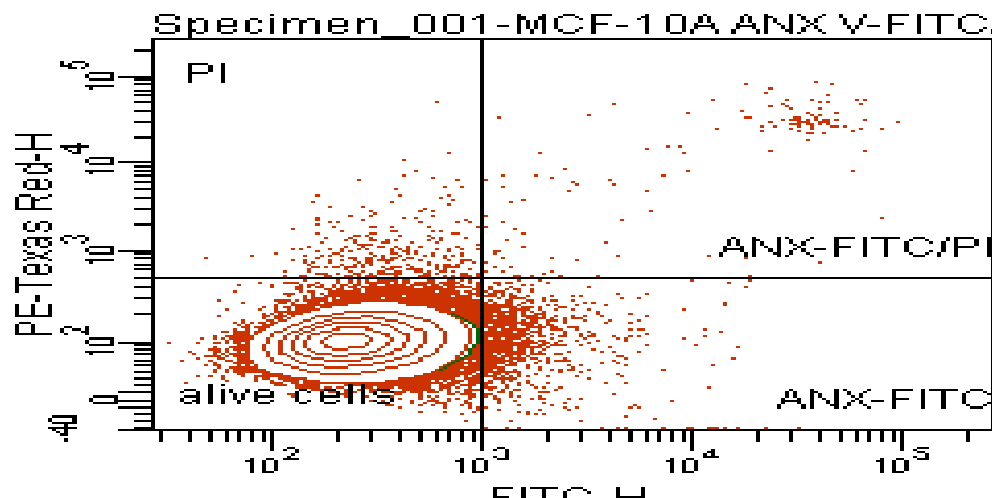
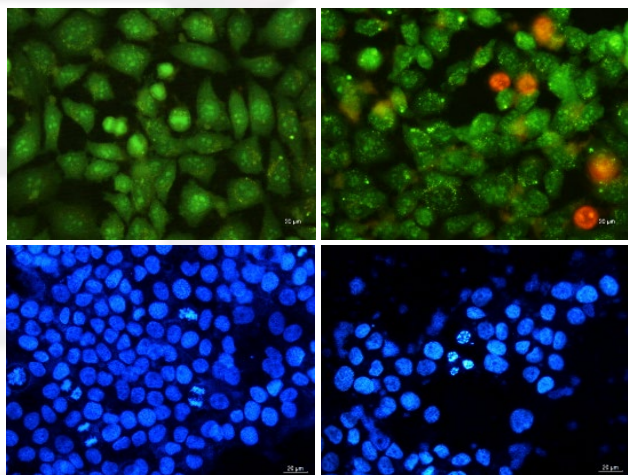
Тествани
вещества



Въведен е *in vitro* метод за определяне безопасността на новосинтезирани вещества (пептидни аналози и хетероциклени съединения). Методът определя за кратко време цитотоксичността, фототоксичния потенциал и антипролиферативна активност върху панел от нормални и туморни клетъчни линии на изследваните вещества. Получените резултати са маркер за безопасност и са обективна основа за изчисляване на стартовите дози, при допълнителни токсикологични *in vivo* експерименти.

Веществата показали високо ниво на безопасност могат да бъдат проучени за допълнителни биологични активности, като например антипролиферативна, регенеративна, антитуморна активност и др. Най-перспективните изследвани вещества могат да бъдат приложени в медицината, фармацевтиката и козметиката.

Антимикробните пептиди с противотуморна активност са голяма група биоактивни пептиди, които имат отношение към т.нар. **таргетна терапия**. Тя е една от най надеждните терапии при онкозаболявания, към която голяма част от учените и лабораториите в света имат интерес и работят с цел подобряването на специфичните свойства на тези пептиди и използването им за доставката на таргетни молекули до определени клетки или тъкани.



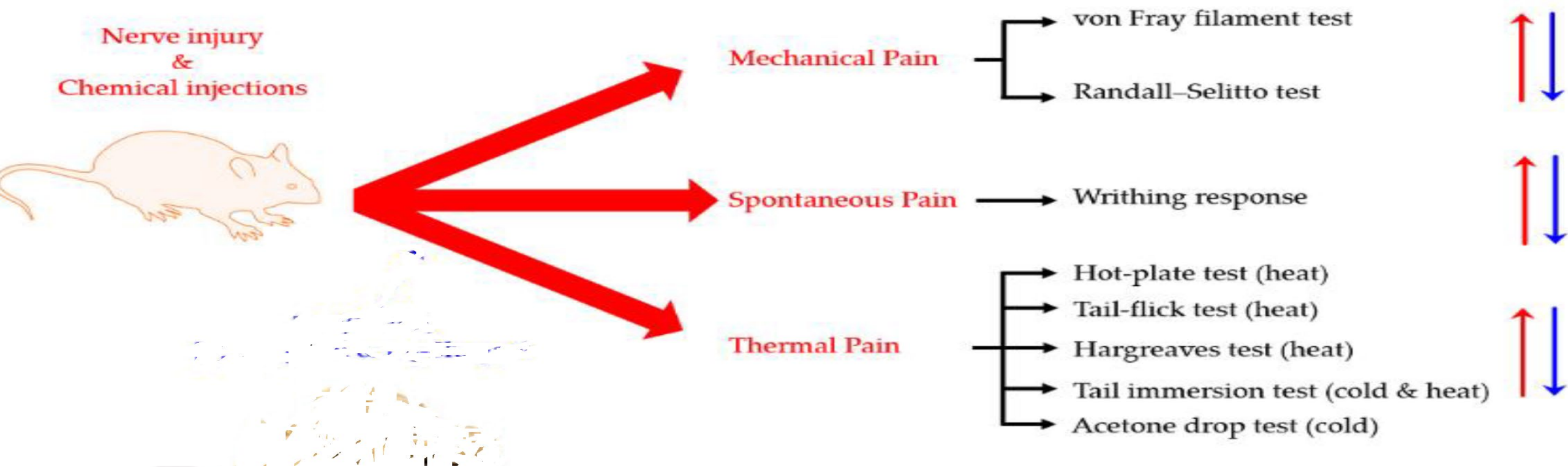
Чрез разработения в работната група *in vitro* метод са изследвани множество пептидни аналози на антимикробни пептиди (KLAKLAK, VIM-23052 и P11-4).

WP 1. Пептидни миметици и биоконюгати с потенциално приложение в медицината

1.5. Биологично изследване на молекули с противоракови, антимикробни, противовъзпалителни свойства и опоидна активност



- хроничната и острата болка често са страничен продукт на възпалителни реакции при наранявания и заболявания.
- Повечето лечения имат за цел основно да облекчат болката чрез намаляване на възпалителни реакции
- два основни класа противовъзпалителни лекарства, които се използват за лечение на възпаление и произтичащата от това болка: НСПВС и кортикостероидите
- идеалното противовъзпалително лекарство с аналгетично действие ще бъде молекула, която не пречи на COX1 и не потиска имунната система
- **интерес към разработването на пептиди, които биха могли имат свойства на идеално противовъзпалително и аналгетично лекарство**



Въпреки мощния аналгетичен ефект, опиоидните пептиди имат ограничено терапевтично приложение поради основни недостатъци в метаболитната стабилност, пропускливост на КМБ и бионаличност. Ето защо проучванията са насочени към преодоляване на проблемите и оптимизиране на терапевтичния потенциал. Понастоящем множество лекарства на базата на пептиди се предлагат на пазара благодарение на нови синтетични стратегии за оптимизиране на метаболизма и алтернативни начини на приложение. **Цел на РГ е разработване на опиоидни пептидомиметици като *терапевтични кандидати за лечение на болка*.**

WP 1. Пептидни миметици и биоконюгати с потенциално приложение в медицината

1.5. Биологично изследване на молекули с противоракови, антимикробни, противовъзпалителни свойства и опиодна /аналгетична/ активност

Чувствителността към болезнени стимули може да се променя от вещества с т. нар. **аналгетична активност**. Праговете на болка на интактни животни могат да бъдат сравнявани с праговете на болка при експериментални животни, третирани с вещества с потенциална **аналгетична активност**.



След въвеждане на **аналгетичното** вещество болковата чувствителност се определя чрез наблюдение на **реакцията на животното към постепенно нарастващ натиск върху задната лапа, поставена под „острието“ на апарата.**



**противоболков
ефект**

Методът **Raw pressure test** е класическа техника за измерване на ефективността на **аналгетиците**.

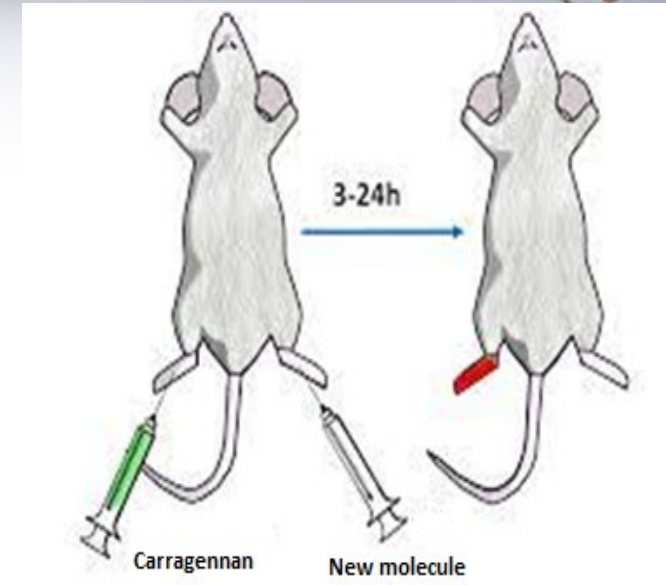


доц. Х. Ночева

WP 1. Пептидни миметици и биоконюгати с потенциално приложение в медицината и
1.5. Биологично изследване на молекули с противоракови, антимикробни,
противовъзпалителни свойства и опоидна активност



Изследване на **противовъзпалителна активност** на новосинтезирани биоконюгати върху модел на карагенан-индуцирано възпаление на задната лапа на плъхове и оценка на обема на оточната лапа чрез използване на плетизмометър.



Интраплантарното инжектиране на карагенан предизвиква рязко и прогресивно увеличаване на обема на инжектираната лапа. Този оток е пропорционален на интензивността на възпалителния отговор и е полезен параметър при оценката на противовъзпалителната активност.



Проф.Р.Николов

КАКВО Е НАПРАВЕНО КЪМ МОМЕНТА

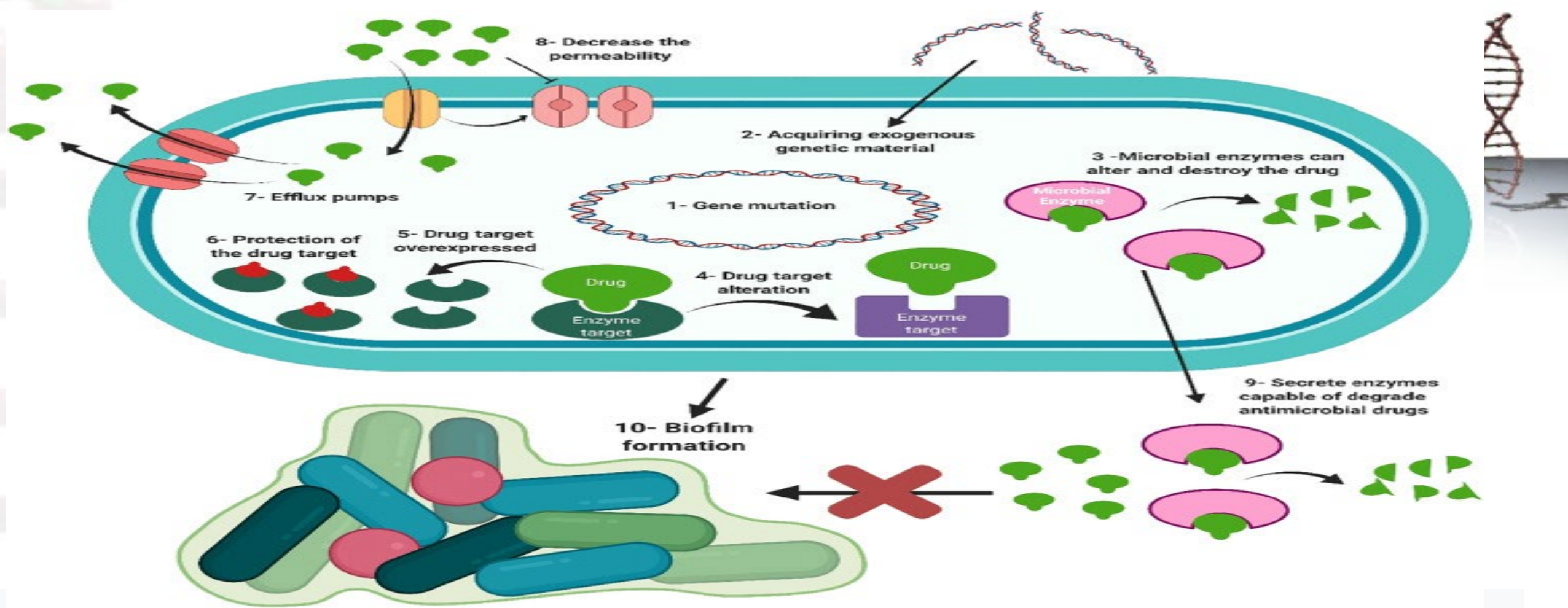


«Пептидни миметици и биоконюгати с потенциално приложение в медицината»
анализирани са общо 17 новосинтезирани вещества.

Всяко едно бе изследвано за проява на **аналгетична и противовъзпалителна активност.**

Веществата с проявена аналгетична активност
бяха допълнително изследвани с оглед доказване или отхвърляне участието на опиоидните
и канабиноидните рецептори в установения ефект.

Част от получените резултати бяха публикувани и представени на научни форуми.



- **антимикробна резистентност** световен медицински проблем
- **Синтетичните антимикробни пептиди** се считат за нови оръжия за борба срещу инфекции, причинени от резистентни към множество лекарства патогени.
- синтетичните пептиди са нови обещаващи молекули за защита на здравето на хората и животните.

WP 1. Пептидни миметици и биоконюгати с потенциално приложение в медицината и

1.5. Биологично изследване на молекули с противоракови, антимикробни, противовъзпалителни свойства и опоидна активност



Цел: Установяване чувствителността на различни таксономични групи микроорганизми спрямо новосинтезирани аналози на *темпорин*.

За контрола са използвани антибиотици с установен ефект върху изследваните щамове, както и темпорин /антимикробен пептид/.

Определяне на минимална инхибиторна концентрация на аналозите

Агар-дифузионен метод



Приложение на подобни структурни аналози:

- по-силно изразен антимикробен ефект на аналозите спрямо контролите;
- По-висока ефективност на действие при по-ниски концентрации на веществата;
- Заместители на антибиотици;
- Превенция на антибиотична резистентност.



Дейност 2.3. Изследване на стабилността на получените съединения в експериментална и реална биологична среда



Разработен е HPLC (ВЕТХ) метод за проследяване **хидролизната стабилност на новосинтезираните пептиди** в модална система имитиращи трите рН в човешкия организъм: рН=2 - стомах, рН=7 - кръв и рН=9 - тънки черва. Изследването на тази стабилност е важно за производството на лекарствените препарати. Използваната хроматографската система е на фирма Perkin-Elmer.

Анализа е проведен при стайна температура, дължина на вълната за сканиране 254 nm и инжекционен обем на пробата - 20 μ L.

Има публикувана статия с използваната методика:

1. *Danalev et al. Synthesis, Antiproliferative Effect Pharmaceuticals. 2023 Mar 31;15(4):1123. doi: 10.3390/pharmaceuticals15041123.*



Дейност 2.3. Изследване на стабилността на получените съединения в експериментална и реална биологична среда



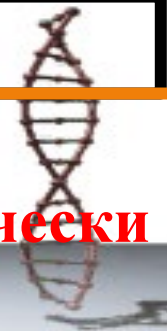
Разработен е **втори HPLC (VETX) метод** за проследяване хидролизната стабилност на новосинтезираните пептиди в модална система имитиращи трите рН в човешкия организъм и ензимите в тях.

При този метод са използвани ензими имитиращи реалната среда в стомаха /пепсин/, кръвна плазма или червата /трипсин/.

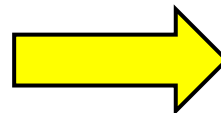
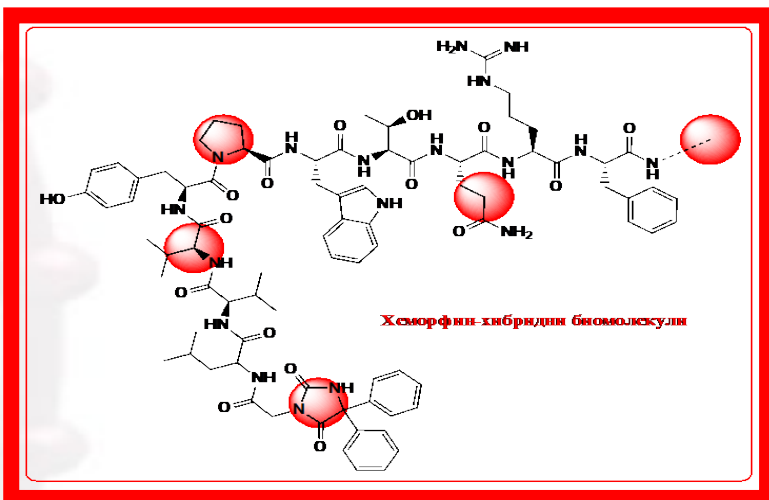
Изследването на тази стабилност е важно за фармакокинетиката на лекарствените препарати при прием. Използваният хроматограф е на фирма Perkin Elmer Series 100.



Има публикувана статия с използваната методика:
*Borisova, et al. Synthesis, In Silico Logp Study,
Pharmaceuticals 2023, 16, 1183*



2.4. Неврофармакологични изследвания на новосинтезираните съединения по отношение на потенциални антиконвулсивни, опиоидни, аналгетични и поведенчески дейности в експериментални модели на мишки



**Антиконвулсивен
ефект**

**Противоболков
ефект**

**Поведенчески
ефекти**





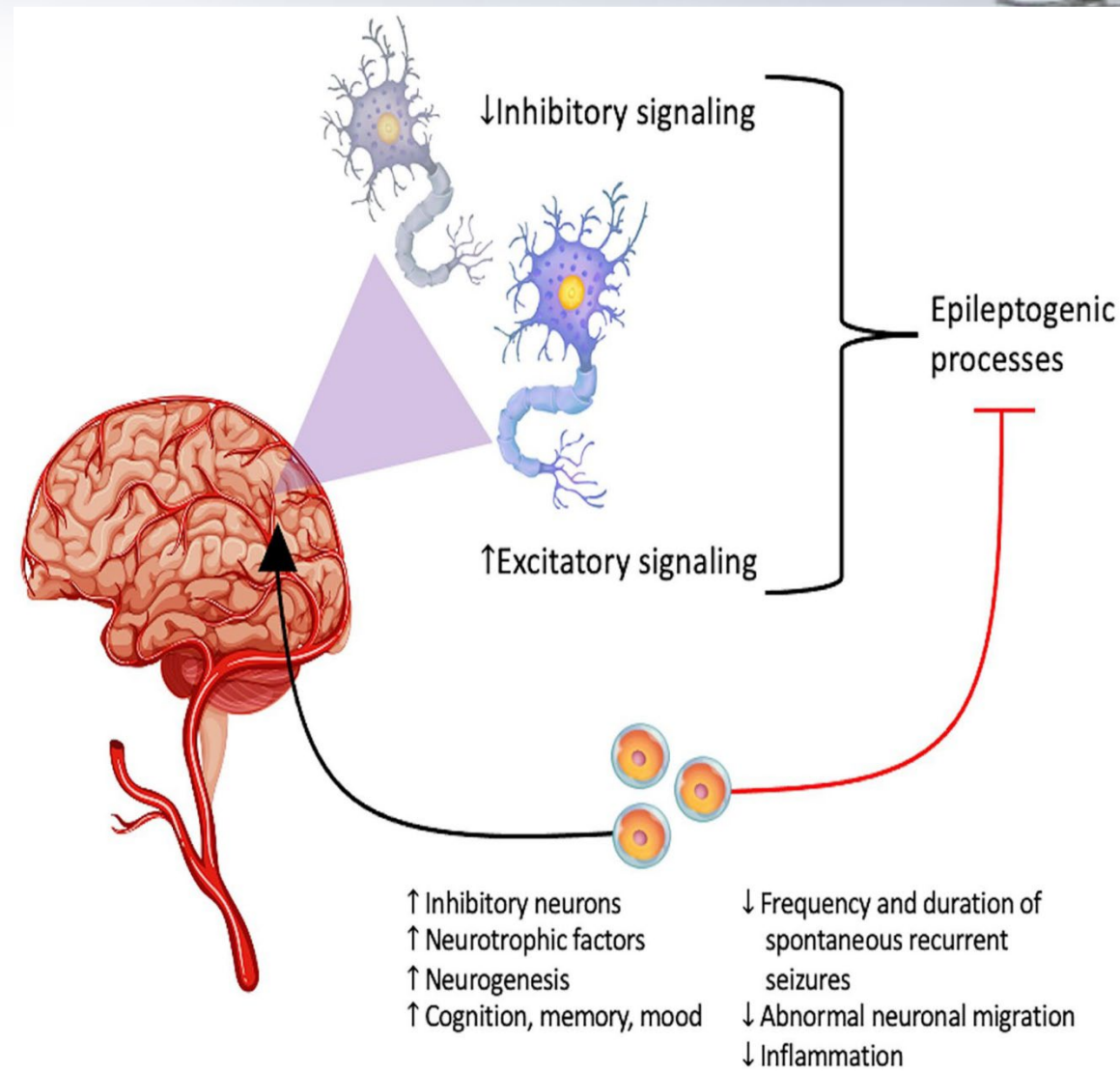
2.4. Неврофармакологични изследвания на новосинтезираните съединения по отношение на потенциални **антиконвулсивни**, опиоидни, **аналгетични и поведенчески** дейности в експериментални модели на мишки

- AED потискат гърчовата активност и по този начин значително подобряват качеството на живот на пациентите с епилепсия. Само две трети от пациентите постигат добър контрол на гърчовете при фармакологично лечение
- Патологични високи нива на неuropeптиди са открити в телесни течности на пациенти с епилепсия и животински модели
- Неuropeптидите могат да допринесат за дисбаланс чрез модулиране на ефекта на класическите възбуждащи и инхибиторни невротрансмитери.
- Много ендогенни пептиди, като адреноркортикотропен хормон, ангиотензин, холецистокинин, динорфин, галанин, грелин, неuropeптид Y, невротензин, соматостатин и тиротропин-освобождаващ хормон, са в състояние да **потискат гърчовете в мозъка**.
- Следователно, тези неuropeптиди и техните рецептори са привлекателни мишени за разработването на **нови антиепилептични лекарства (AED)**.



2.4. Неврофармакологични изследвания на новосинтезираните съединения по отношение на потенциални **антиконвулсивни**, опиоидни, **аналгетични и поведенчески** дейности в експериментални модели на мишки

- Фармакологични подходи за проучване на синтетични аналози на биологично активни ендогенни пептиди, съдържащи **неестествени аминокиселини и производни**.
- Неврофармакол. скрининги върху новосинтезирани аналози на **VV-hemorphin-7** /производни на ендогенни ХМБ продукти/, новосинтезирани **валорфиноподобни пептида** - Ad6-V и Ad7-V, с включена към пептидната им верига неприродна циклична аминокиселина и защитен адамантанов остатък, новосинтезирани пептидомиметици с кафеена и канелена киселина.



По работен пакет 4: Получаване и пречистване на биологично активни вещества от лечебни и ароматни растения чрез мембранно разделяне



Дейност 4.1: Проучване на нови алтернативи за валоризиране на отпадъчните продукти при производството на етерични масла от ароматни растения и билки с помощта на наномембранно разделяне

I. Изследване на биологична активност на отпадъчни фракции при производството на етерични масла

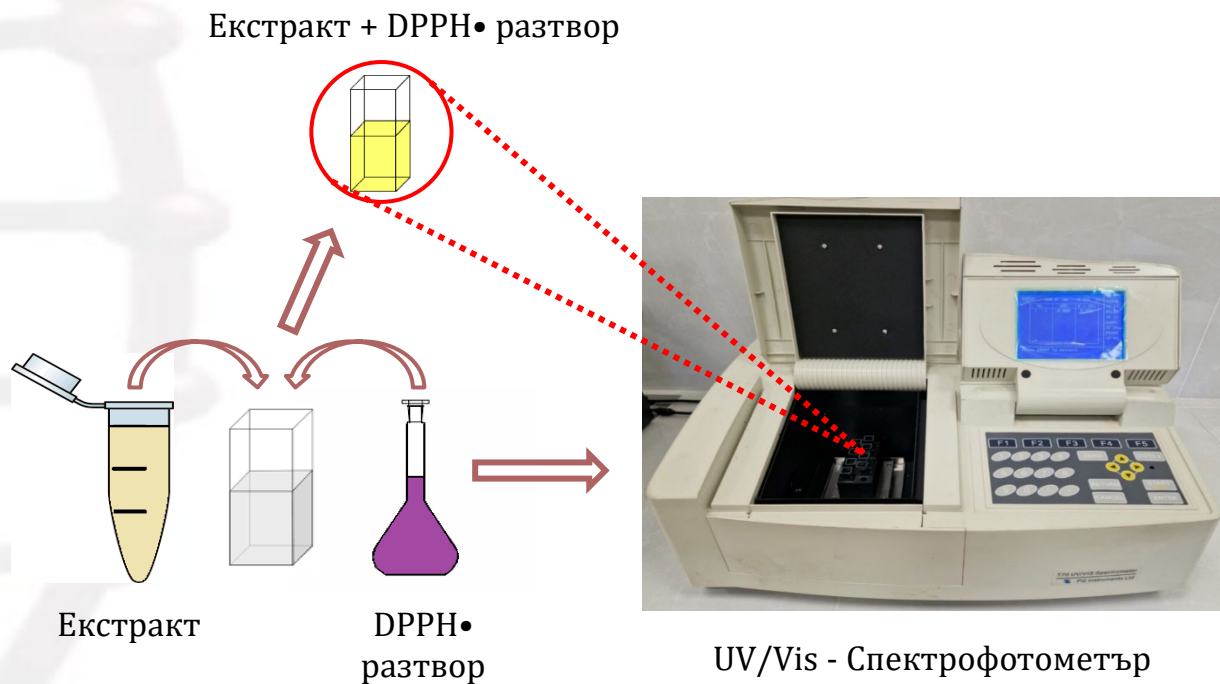
- Изследване на антиоксидантна активност (*DPPH метод*)
- Изследване на антибактериална активност (*Метод на микроразреждане в бульон; Диск-дифузионен метод*)

II. Нанофилтруване на отпадъчните продукти при производството на етерични масла от ароматни растения и билки

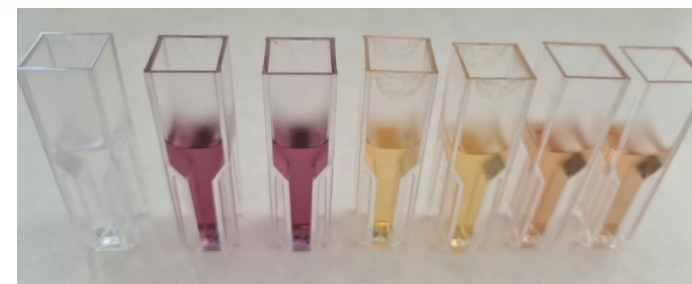
Изследване на антиоксидатна активност



- DPPH метод



Фигура 1. Схематично представяне на провеждането на експеримента за определяне на антиоксидантна активност, използвайки DPPH метод



Фигура 2. Изследвани проби за антиоксидантна активност, използвайки DPPH метод

Предимства на метода:

- Бърз и евтин
- Получават се високовъзпроизводими резултати
- Позволява определянето на антиоксиданти в сложни биологични системи при нормални условия (елиминира се рискът от термично разлагане на изследваните молекули)

Изследване на антибактериална активност

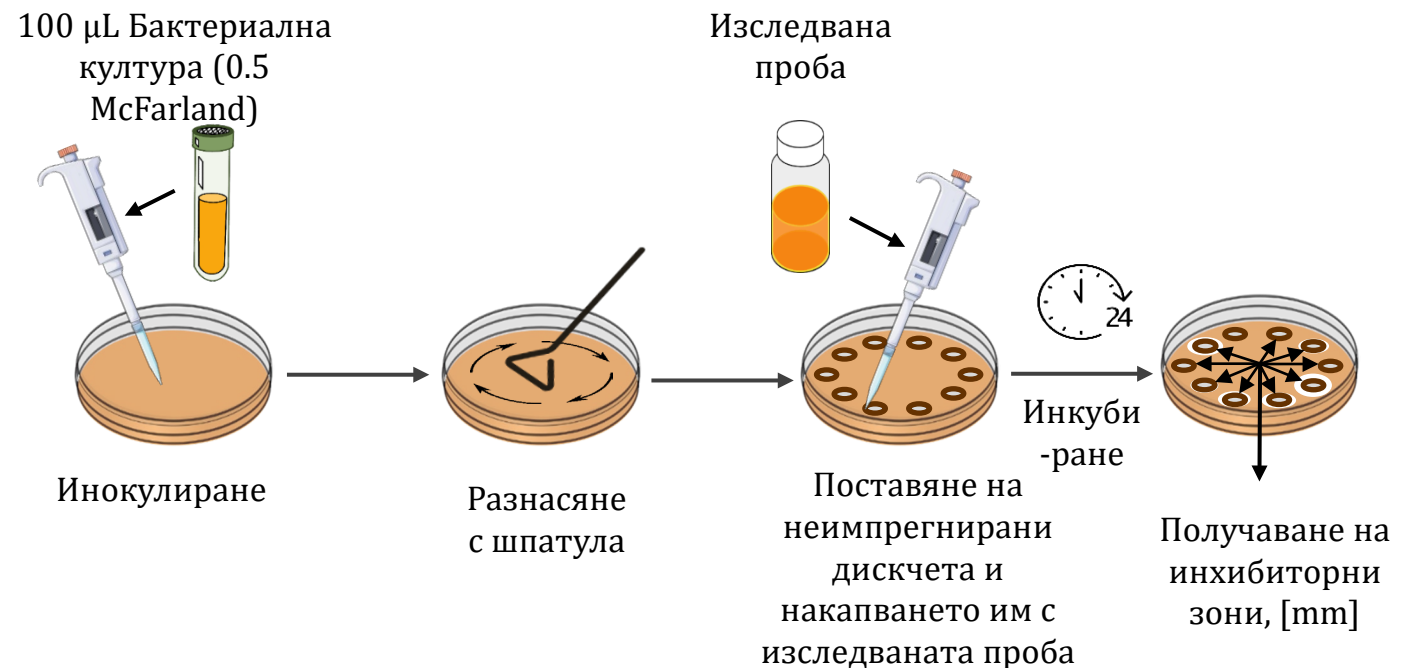


- Микроразреждане в бульон



Фигура 3. Microplate Reader с 96-ямкова плака

- Диск-дифузионен метод



Фигура 4. Схематично представяне на диск-дифузионният метод

Нанофилтруване

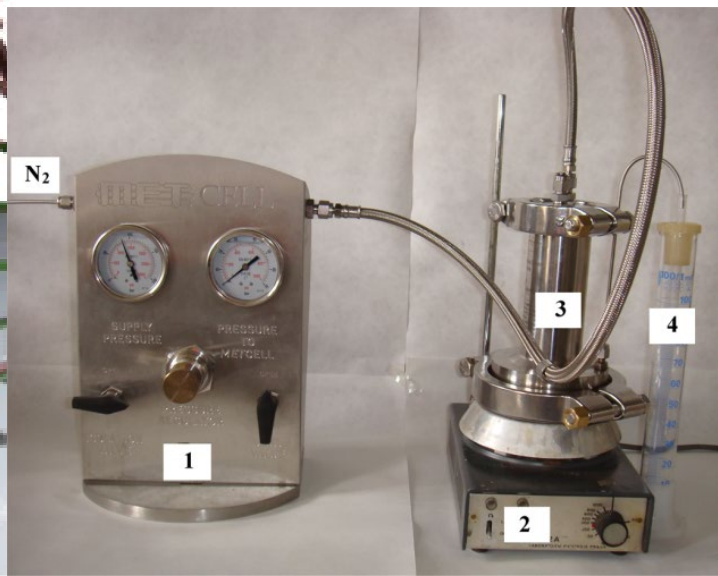
Дотук:



Бъдеща работа:

Разработен е експериментално валидиран в лабораторни условия модел на технология за валоризация, включваща нанофилтрация

- Разработване на мембрани за обратна осмоза и нанофилтрация с повишена устойчивост на замърсяване от биологично активни компоненти на лечебни и ароматни растения
- Разработване на високо интензивен мембранен модул



Фигура 5. MET cell (Evonik MET, UK): клетка с нормален поток за периодично филтруване. 54 cm² плоски мембрани.

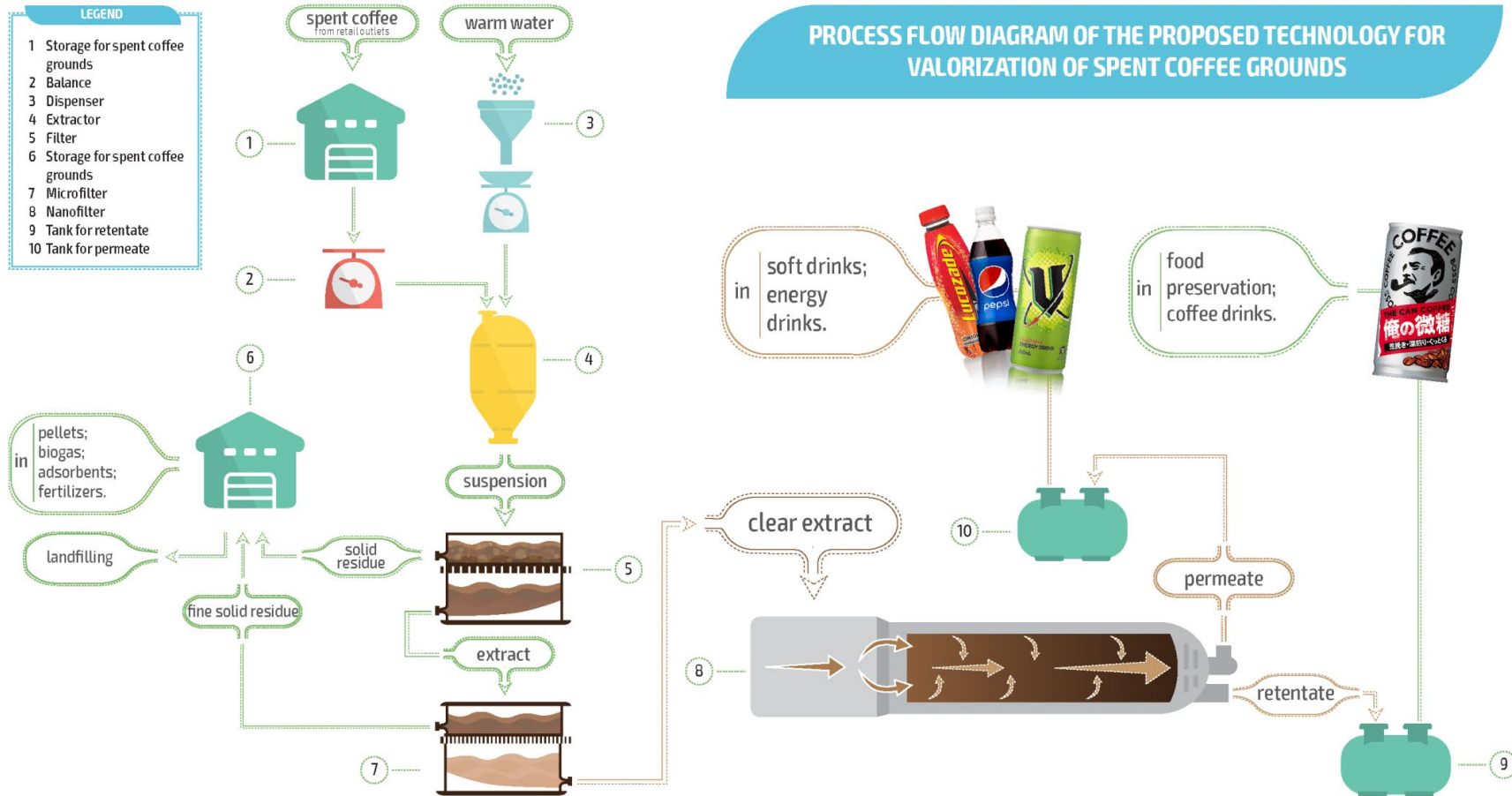
Приложения:

- Концентрирането или фракционирането чрез **нанофилтруване** може да се използва за получаване на вещества със силна **антиоксидантна, антимикробна и противовъзпалителна активност**, които могат да бъдат прилагани като **консерванти и функционални съставки** в храни, козметични продукти и лекарствени средства
- Интегриране на пълномащабният процес на мембранно разделяне в съществуващи софтуерни среди за симулация на химикотехнологични процеси

Индустриално приложение на мембранното разделяне

- Отпадъчно смяно кафе (SCGs)

Финален кръг на световен конкурс за иновативни проекти, организиран от глобалната компания Suntory



Като партньори в Дейност 2 участват учени от ИНБ и ИЕМПАМ с музей, ИОХЦФ на БАН и МУ-София, катедра „Фармакология“



**Благодаря Ви за вниманието
и подкрепата**