

**„БИОТЕХНОЛОГИЧНИ ПРОИЗВОДСТВА” - ХОРИЗОНТ 2020**

# **“От научните разработки на биологично активни компоненти към внедряване в производството”**

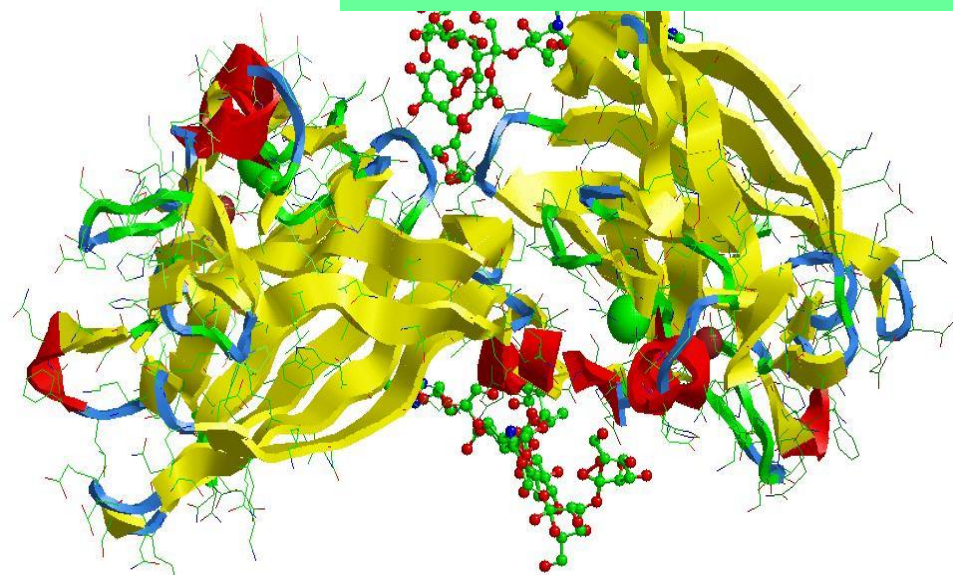


Институт по органична  
химия с център по  
фитохимия, БАН

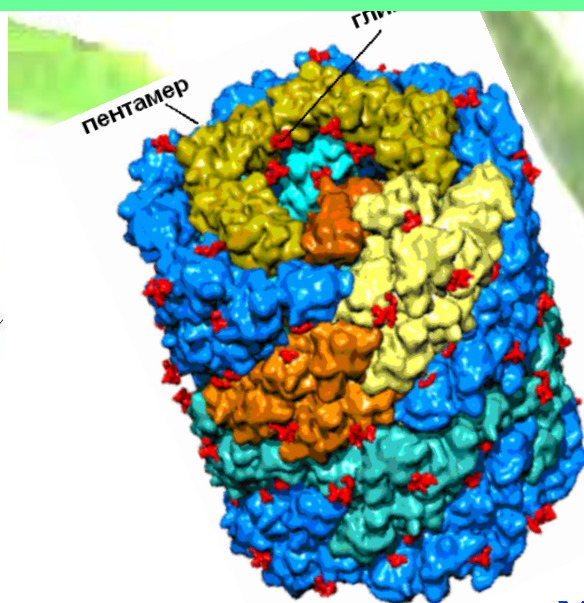
проф. д-р, инж. Павлина Долашка  
[pda54@abv.bg](mailto:pda54@abv.bg)

# АКТИВНИ КОМПОНЕНТИ

- от ХЕМОЛИМФАТА И СЛУЗТА - Хемоцианини и пептиди
- от ГЪБИЧНИ ЩАМОВЕ И ДРОЖДИ - Супероксид дисмутази

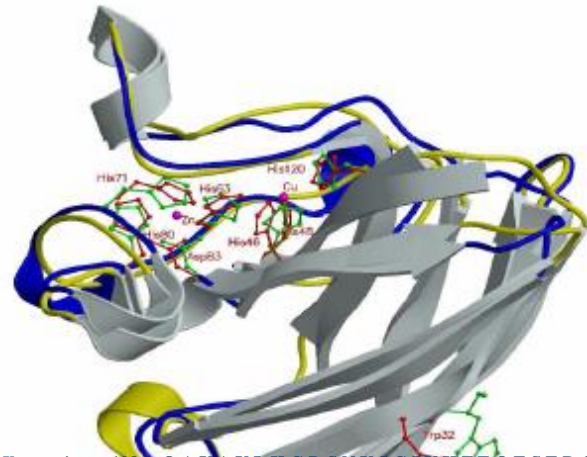


Супероксид дисмутаза



Хемоцианин

# Cu/Zn-SOD, изолирана от гъбичен щам *Humicola lutea* и

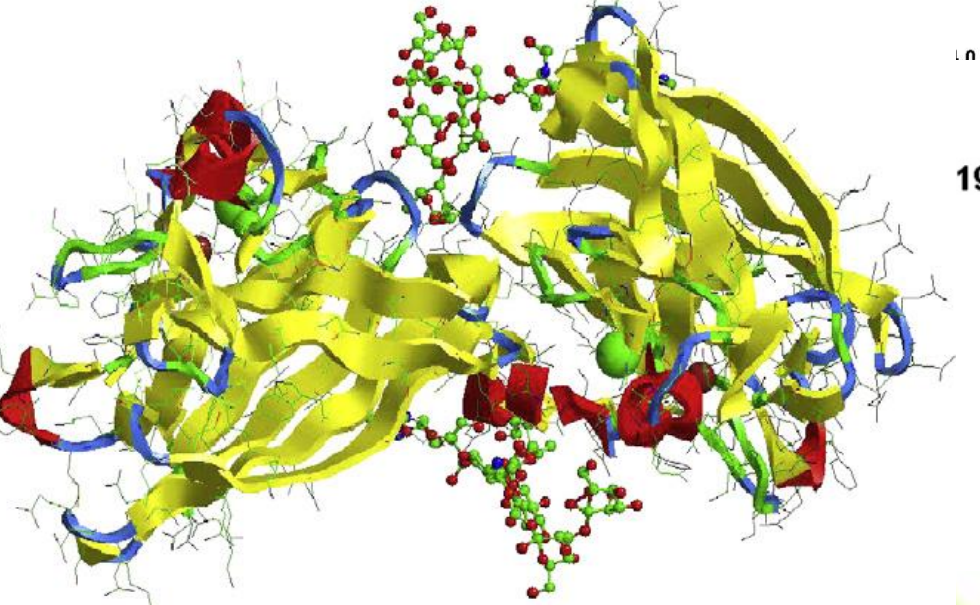
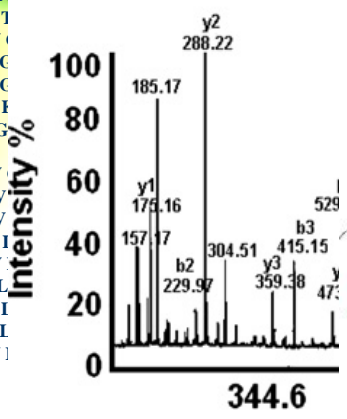
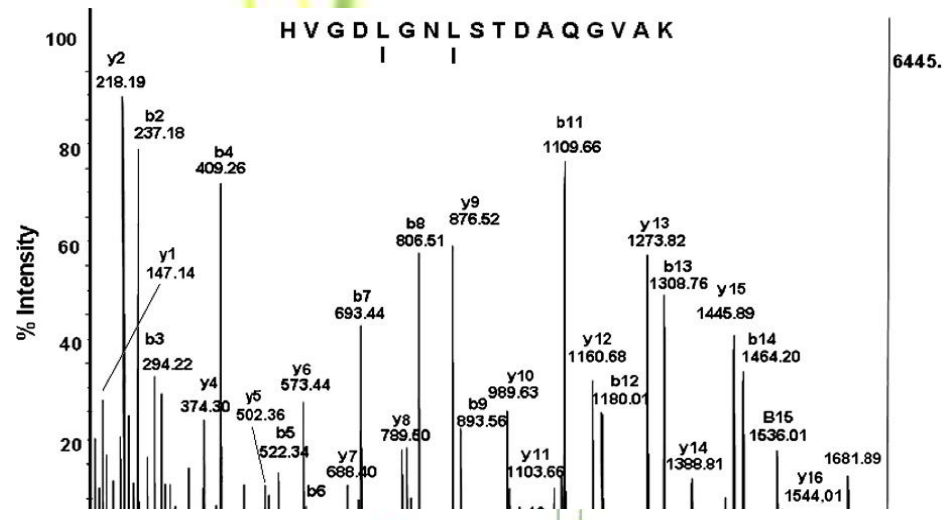


<i>K. marxianus</i> 1984	OAVAVLKGDSNVSGIVKFEQSESDQSTKEVWNI <sup>1</sup> TGNSPNALRGF
<i>K. marxianus</i> L3	L3NAVAVLKGDSNVSGIVRFEQSESDQSTKISWEIT <sup>1</sup> GNANALRGF
<i>S. cerevisiae</i>	QAVAVLKGDAQVSGVAKFEQASESEPTTVSYEIA <sup>1</sup> GNSPNAERGF
<i>C. famata</i>	QAVAVLRGDSKIVGVVIFEQSSSDPTFITWEIS <sup>1</sup> GNANALRGF
<i>A.niger</i>	KAVAVIRGDSKIVSGTVIFEQANENTPTTISWNI <sup>1</sup> TGHDANAERGF
<i>A.oryzae</i>	KAVAVLRGDSKISGTVTFEQADANAPTTVSWNI <sup>1</sup> TGHDANAERAF
<i>A. fumigatus</i>	KAVAVLRGDSKITGTVTFEQADENSPTTVSWNI <sup>1</sup> KGNDPNAKRGF
<i>H. lutea</i>	KAVAVLRGDSKITGTVTFEQANESAPTTVSWNI <sup>1</sup> TGHDPAERGF
<i>N.crassa</i>	KAVAVVRGDSNVKGTVIFEQSESEAPTTITYDI <sup>1</sup> SIGNDPNAKRG

<i>K. Marxianus</i> 1984	HSHEFGDNTNGCTSAGPHFDPSA
<i>K. marxianus</i> L3	HIHEFGDNNSNGCTSAGPHFNPK
<i>S. cerevisiae</i>	HIHEFGDATNGCVSAGPHFNPFK
<i>C. famata</i>	HVHTFGDNTNGCTSAGPHFNPF
<i>A.niger</i>	HVHQFGDNTNGCTSAGPHFNPF
<i>A.oryzae</i>	HVHQFGDNTNGCTSAGPHFNPF
<i>A. fumigatus</i>	HVHQFGDNTNGCTSAGPHFNPF
<i>H. lutea</i>	HIHQEGDNTNGCTSAGPHYNPF
<i>N.crassa</i>	HIHTEFGDNTNGCTSAGPHFNPH

<i>K. marxianus</i> 1984	DAQGVAKGSKQDLLIKLIFQSVV
<i>K. marxianus</i> L3	DAQGVAKGSVTDKHKVLIGPLSV
<i>S. cerevisiae</i>	DENGVAKGSFKDSLKLIKLGITSVV
<i>C. famata</i>	DTSGVAKGSKQDLFVKLIGQNSII
<i>A.niger</i>	DAEGNAVGSKQDKLVKLIQAESV
<i>A.oryzae</i>	DAEGNAVGSKQDKLIKLIQAESV
<i>A. fumigatus</i>	DAEGNAVGSKQDKLIKLIQAESV
<i>H. lutea</i>	DAEGNAVGSVQDKLIKVIQAESII
<i>N.crassa</i>	DAQGNAKGTVTDNLVKLIGPESV

<i>K. marxianus</i> 1984	KTGNAGSRPACGVIGLNTN
<i>K. marxianus</i> L3	KTGNAGGRVACGVIGISN
<i>S. cerevisiae</i>	KTGNAGPRPACGVIGLNTN
<i>C. famata</i>	KTGNAGARLACGVIGLNTNPKNS
<i>A.niger</i>	KTGNAGPRPACGVIGIAA
<i>A.Oryzae</i>	KTGNAGARPACGVIGIA
<i>A. fumigatus</i>	KTGNAGARPACGVIGIA
<i>H. lutea</i>	KTGNAGPRPACGVIGIA
<i>N.crassa</i>	KTGNAGPRPACGVIGISQ



от дрожди *Kluveromyces yeast* BIMCC 1984

# Потенциален терапевтичен ефект на ензима Cu/Zn-SOD от *H. lutea* 103

❖ Третирането на белите мишки с 500 Е Cu/Zn-SOD от *H. lutea* 103 увеличава преживяемостта им до 86% при грипна инфекция от вирус A/Aichi (H3N2)



❖ Третирането на хамстери с трансплантиран тумор на Графи с Cu/Zn-SOD води до забавяне на туморния растеж, особено когато е приложен в ранните стадии на туморната прогресия. На 10-ия ден след трансплантацията се отчита 73-75% намаление в размерите на тумора.

## Механизъм:

➤ Появата на туморни образувания води до повишено ниво на свободни окси-радикали и намаляване на нивото на антиоксидантните ензими в клетките.

➤ Добавянето на ензим SOD води до неутрализиране на свободните радикали и предпазва клетките от увреждане.

# Кислород-пренасящи гликопротеини “хемоцианини”

keyhole limpet  
*Megathura crenulata*



Marine snail *Rapana venosa*



*Haliotis tuberculata*



Градински охлюв *Helix lucorum*



*Cancer pagurus*

# Охлювите *Helix aspersa* се отглеждат във ферми



# ПРОДУКТИ

## Гликопротеин – хемоцианин

### Екстракти от охлюви



проф. Стефанович

Проф. Фьолтер

проф. Ван Биимен

ООД „Био компоненти“

“Dr. Lurrane”,  
Italy

“Immunodiagnostic”,  
Germany

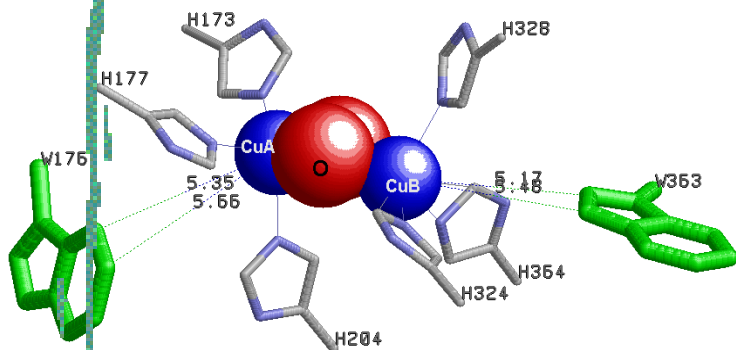
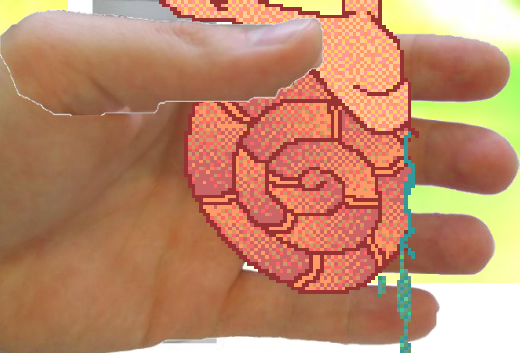
“Biohainaut”,  
Belgium

Болница,  
Австрия

Клиника “Персенк”  
гр. София

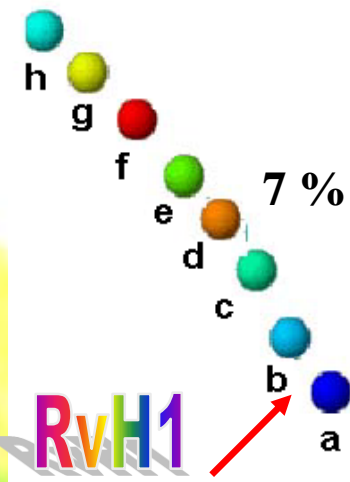
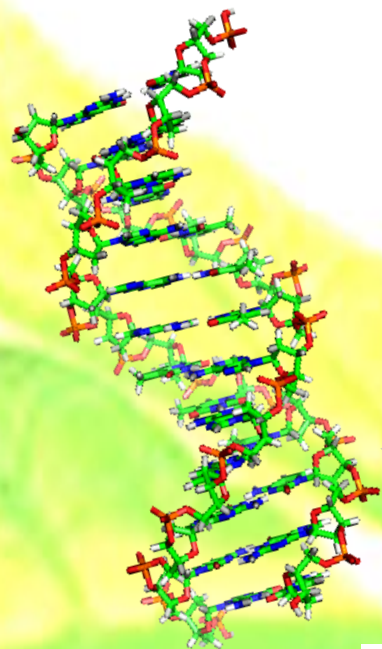
# Изолиране на хемоцианин от охлюви

Хемоцианинът е разтворен в хемолимфата на охлювите и осъществява пренос на кислород до всички клетки. След задълбочено изследване, колективът от ИОХЦФ-БАН е доказал, че този протеин притежава антивирусни и антитуморни свойства.



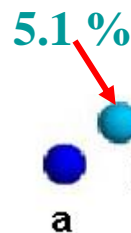


# Структура на хемоцианин от *Rapana venosa*



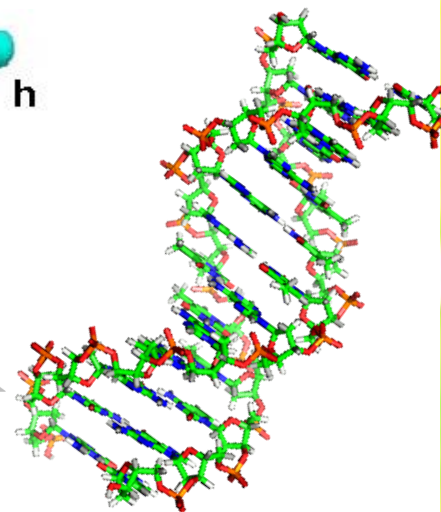
420 kDa

1.8 %

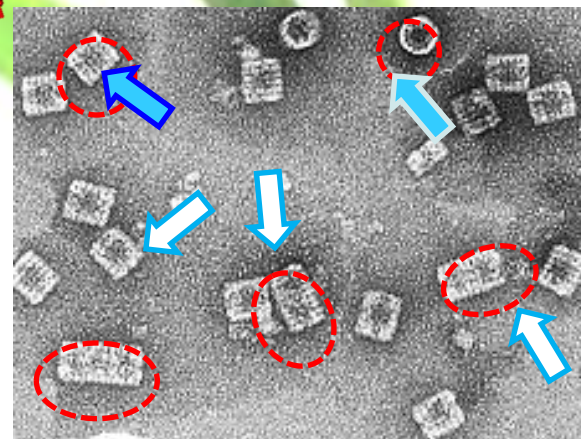
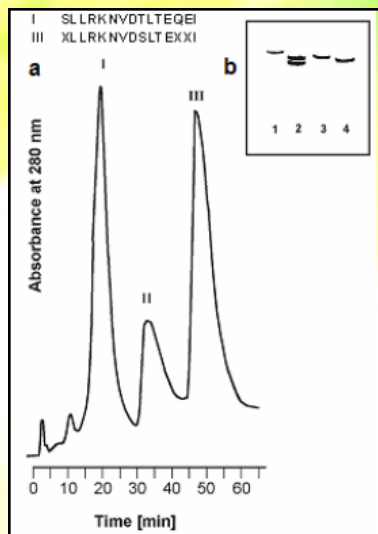
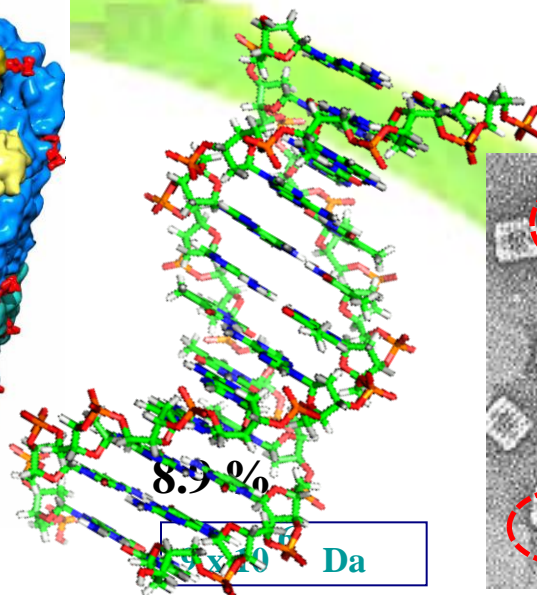
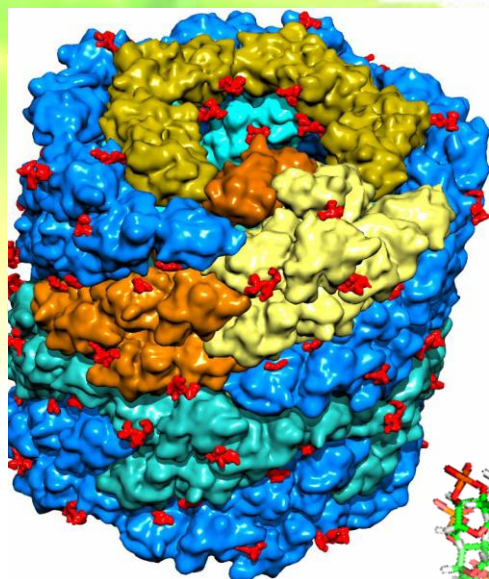


400 kDa

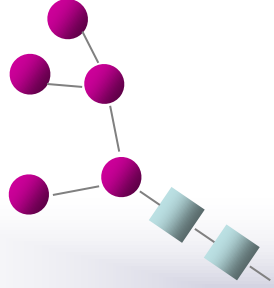
1.1 %



4.4 %



## Два главни подхода

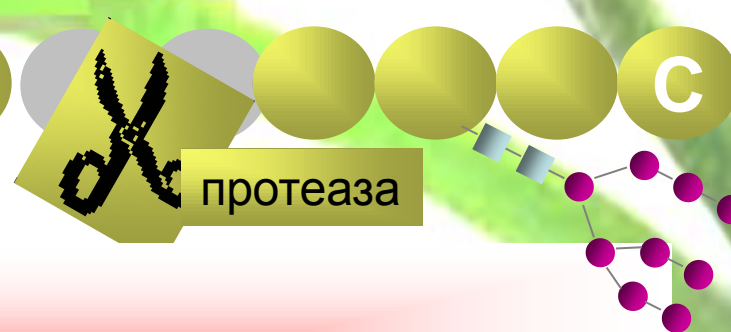


## Гликопептиди

- изолиране на гликопептиди
- идентифициране на *N*-гликозилираните центрове
- анализирани на гликопептидите чрез  $\mu$ LC/ESI-MS/MS, LC-MS-Q-Trap, или нано-ESI масспектрометрия

Гликопротеин

RvH1



протеаза

## Гликани

- изолиране на гликани
- анализ чрез MALDI-TOF-MS, CE-MS и Q-Trap-

# Приложения на продукти от охлюви и раци

Хранителната индустрия:  
като храни и добавки



Козметиката



Фармацията и медицината



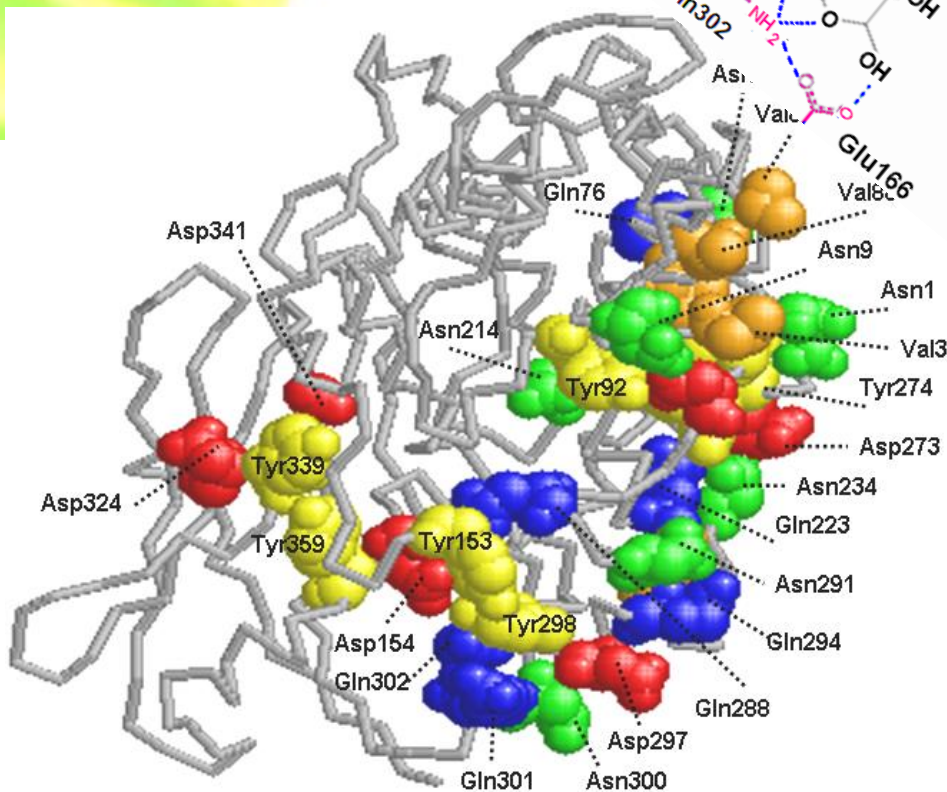
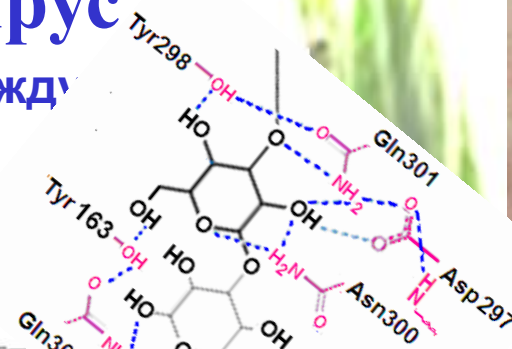
# **ПОТЕНЦИАЛЕН ТЕРАПЕВТИЧЕН ЕФЕКТ**

- ❖ **АНТИВИРУСЕН ЕФЕКТ**
- ❖ **АНТИТУМОРЕН ЕФЕКТ**
- ❖ **АНТИБАКТЕРУАЛЕН ЕФЕКТ**

# Антивирусен ефект на хемоцианини

## Херпес симплекс вирус

Херпесът засяга граничните зони между кожата и лигавиците на устата, носа и др.



11 протеини от  
структурната  
обвивка на HSV-1 са  
документално  
изучени

# Приложение на хемоцианините



Biosyn Arzneimittel GmbH



**IMMUCOTHEL®**

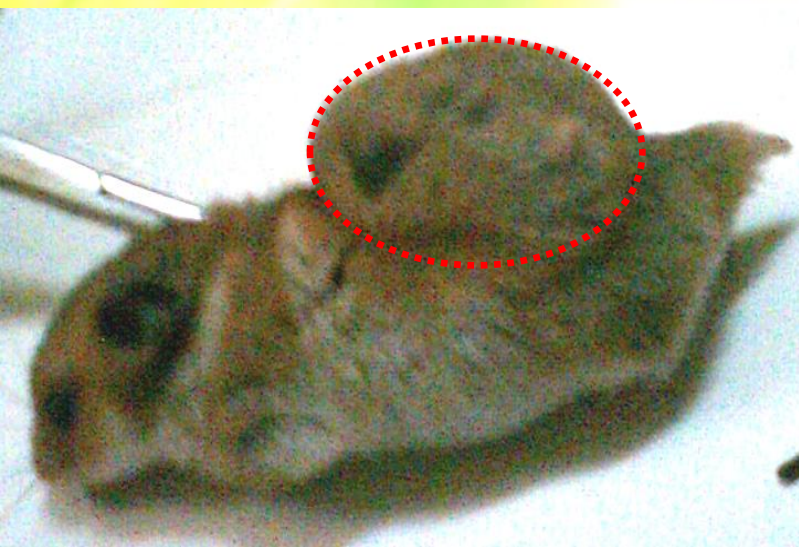
Лекарствен препарат на базата на хемоцианин срещу тумор на пикочен мехур

Калифорнийска мида  
*Megathura crenulata*

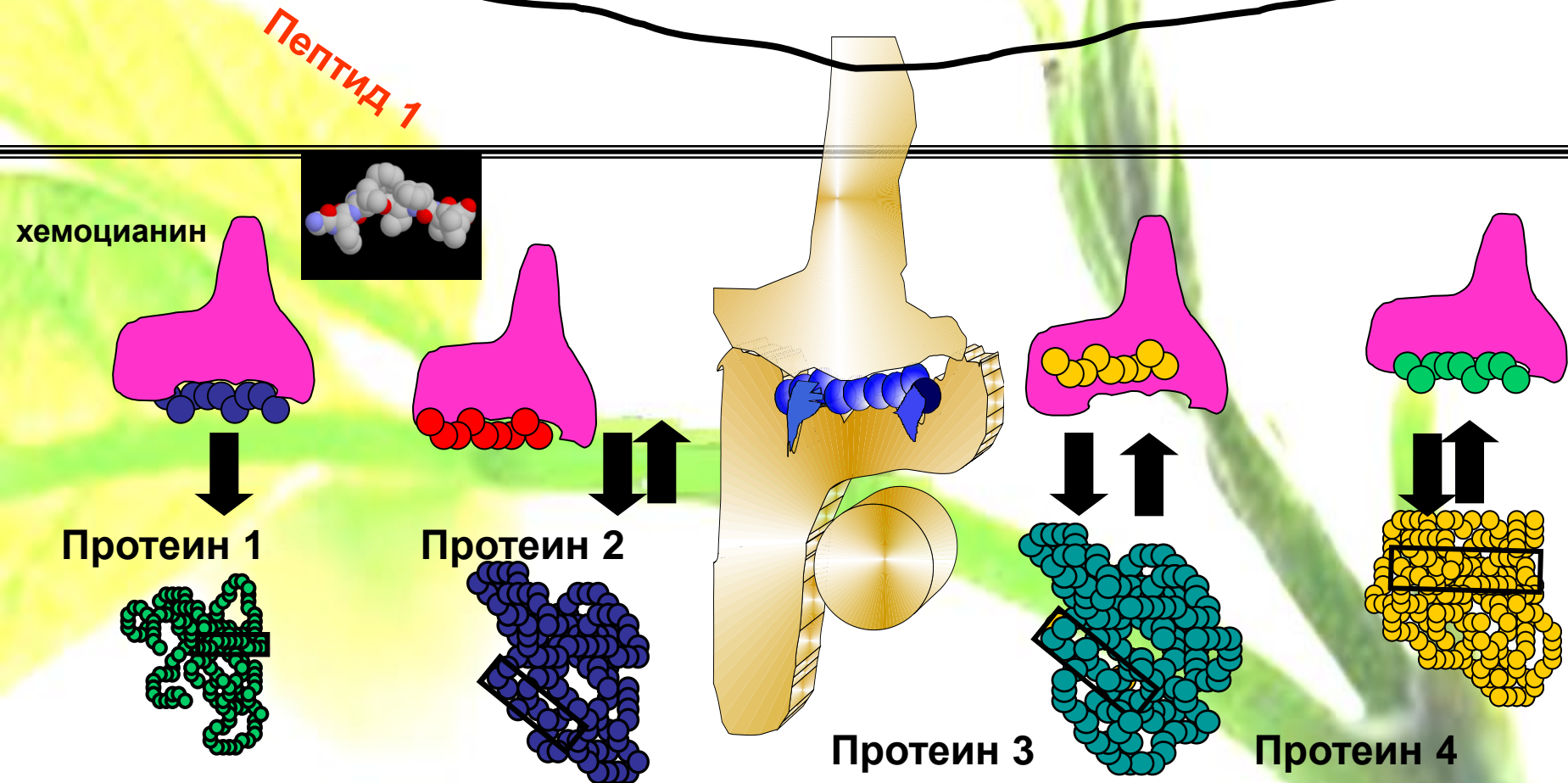


# Антитуморен гел за третиране на миелоидния тумор на Графи

- ❖ Миелоидният тумор на Графи първоначално е тестван на заразени мишки с вирус на Графи, след което е адаптиран върху хамстери чрез подкожно инокулиране;
- ❖ Третиране на туморното образование чрез инжектиране с робот на активната фракция на хемоцианина;
- ❖ Третиране на туморното образование с активната фракция на хемоцианина, включена в гел.



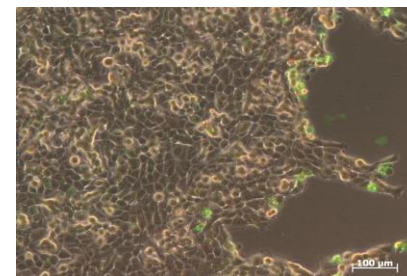
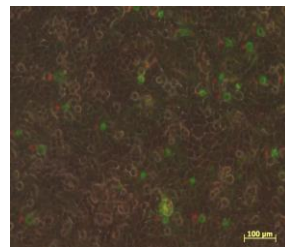
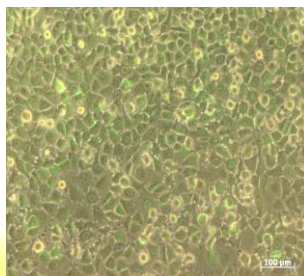
Хемоцианините, изолирани от *Helix vulgaris* и *Rapana venosa*, са високо имуногенни протеини, които стимулират едновременно клетъчния и хуморалния имунитет. Поради тази причина тези протеини са подходящи за използване като молекулни носители и адюванти при профилактични и терапевтични имунологични препарати.



Хемоцианините от молюски индуцират синтеза на специфични антитела, тъй като първичните им аминокиселинни последователности силно се различават от тези при бозайниците и са разпознаваеми от имунната система



# Антитуморен ефект на хемоцианините



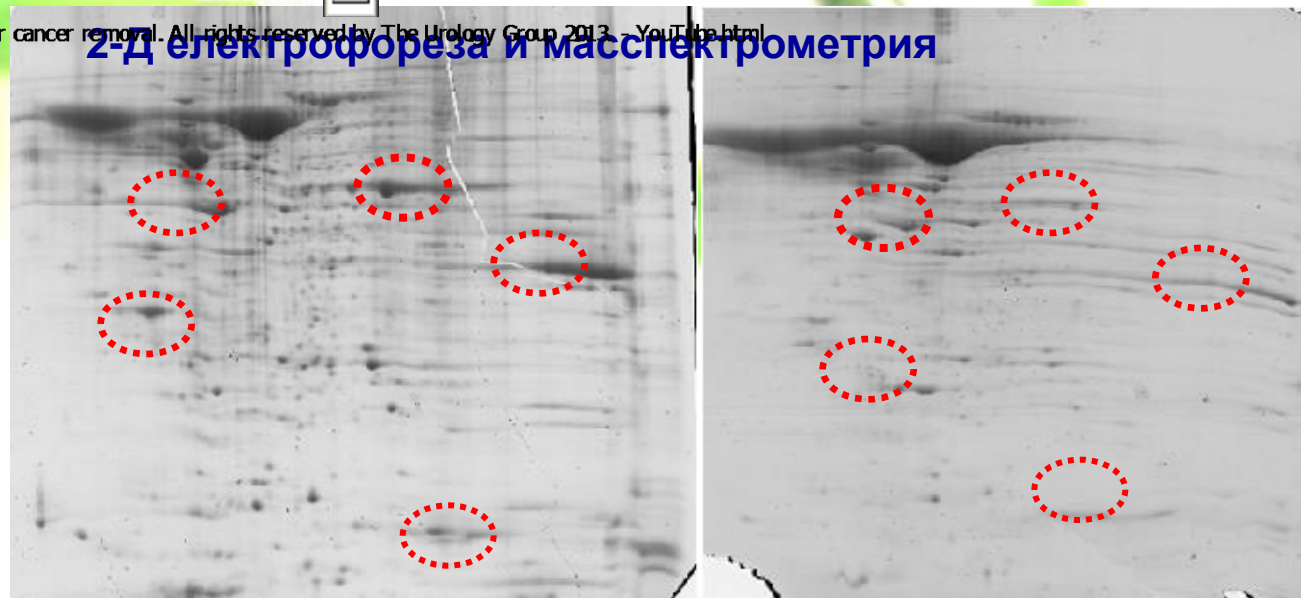
## ПРОТЕОМЕН АНАЛИЗ

Човешки туморни клетъчни линии HT1197, T-24 и Cal-29, третирани с различни хемоцианини – след 24 и 48 час

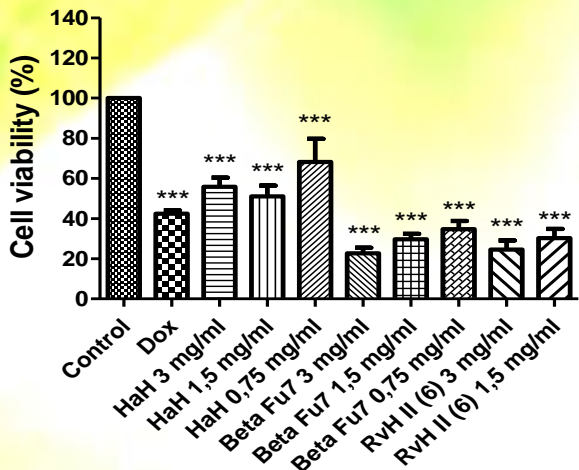


Bladder cancer removal. All rights reserved by The Urology Group 2013. YouTube.html

## 2-D електрофореза и маспектрометрия



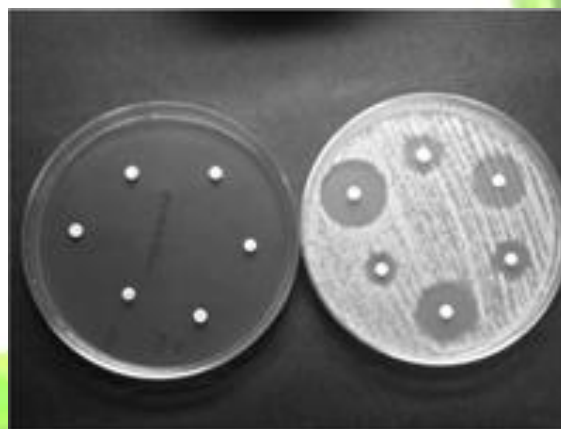
Преди - След третиране с хемоцианин *H. aspersa*



# АНТИБАКТЕРИАЛЕН ЕФЕКТ



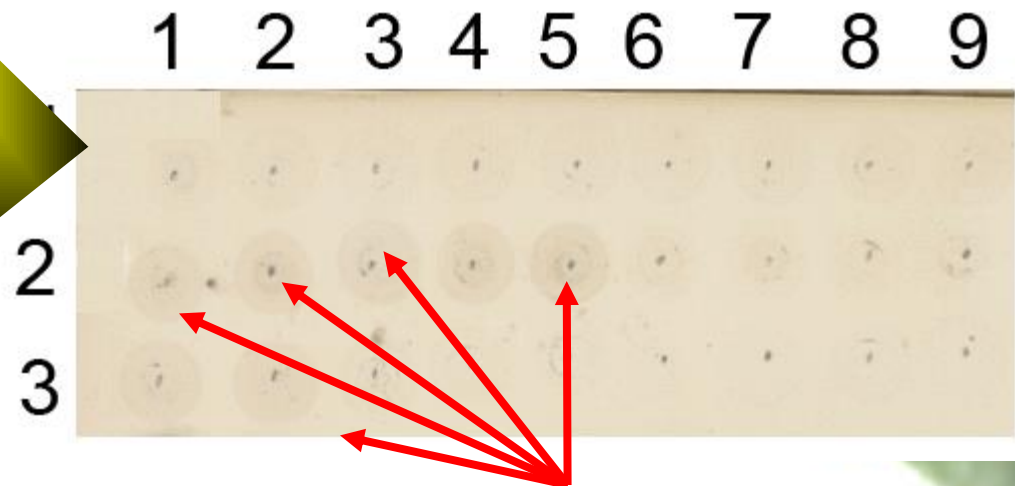
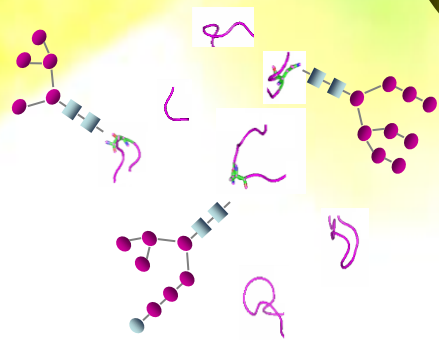
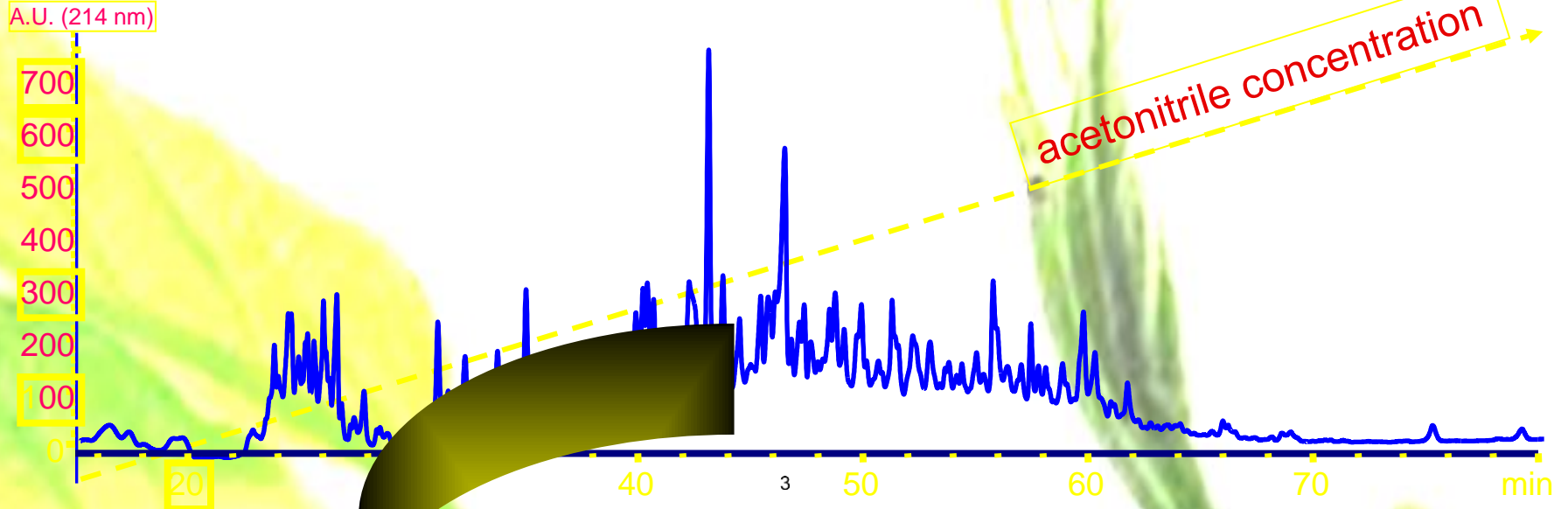
Department of Dermatology,  
University of Tübingen, Germany



Медицински център  
"ПОЛИМЕД"

- ❖ Антибактериален ефект на активни пептиди от хемолимфата;
- ❖ Антибактериален ефект на хемоцианини от хемолимфата;
- ❖ Антибактериален ефект на активни пептиди от слюзта;
- ❖ Тестът за антибактериална активност беше проведен срещу бактериите: *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* и др.

# ПЕПТИДИ И ГЛИКОПЕПТИДИ



Orcinol/ $H_2SO_4$  test on the isolated glycopeptides

# Антибактериална активност на хемоцианин

градински охлюв *L. persa*

*Bacillus subtilis*:

*E. coli* 3397:

от рак *Cancer pagurus*

SU1

SU2

SU3

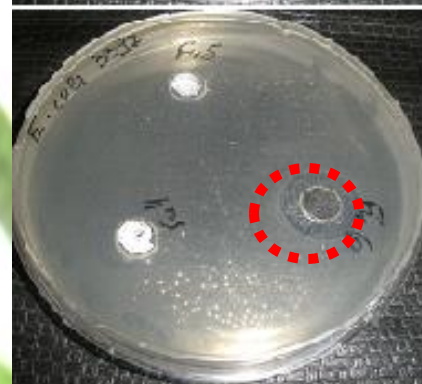
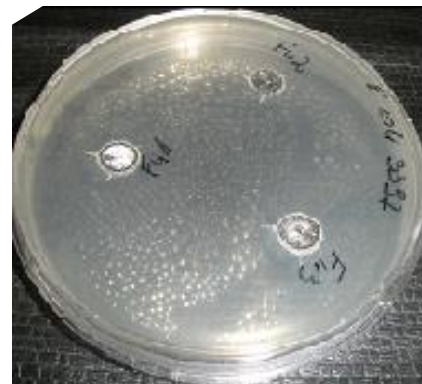
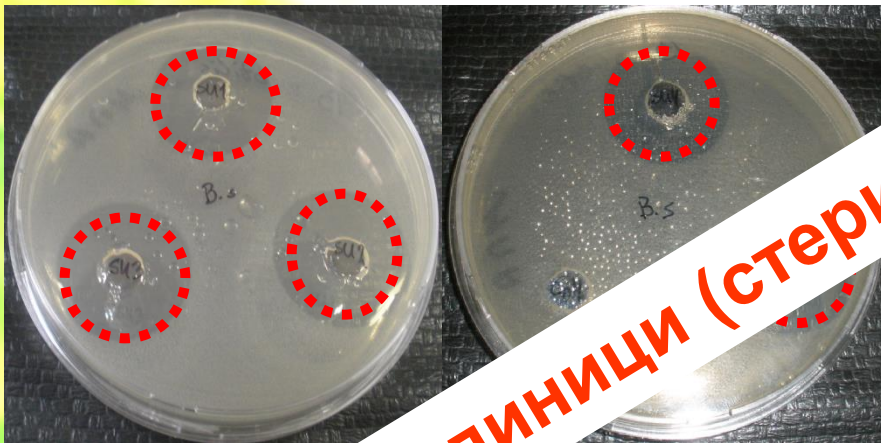
SU4

SU5

CpH

*Bacillus subtilis*

*Staphylococcus epid.1093*



*Escherichia coli* 3397

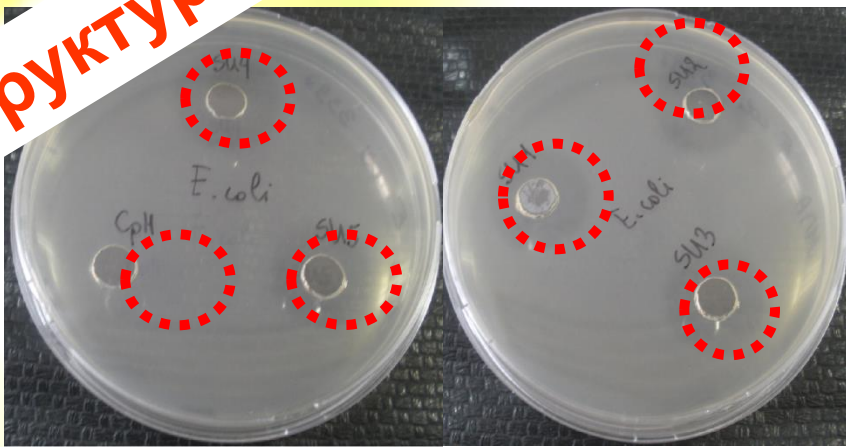
SU1

SU2

SU4

SU5

CpH



**Структурни субединици (стерилна зона 10 – 13 мм)**

# Слуз от охлюви – богат източник на биологично-активни вещества



Събирането на слуз от охлюви се извършва напълно безопасно за самите животни, в рамките на съответните изисквания и норми.



## Екстракти от охлюви



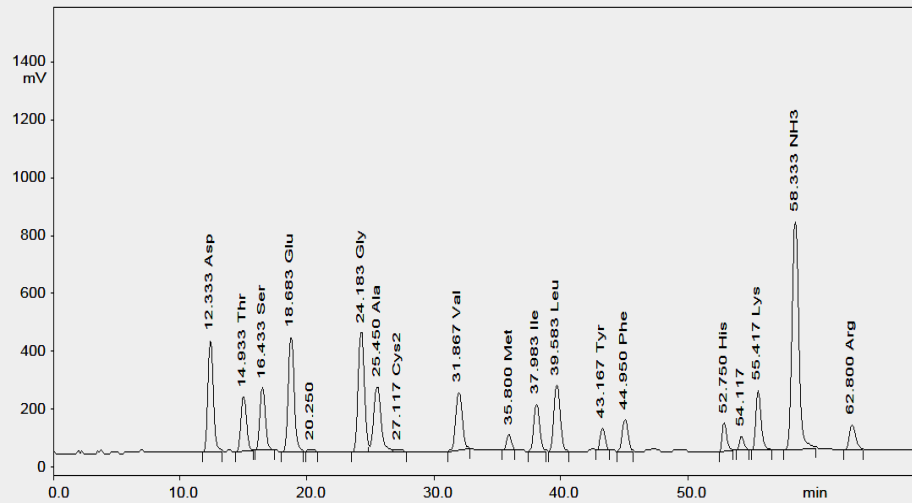
Градински охлюв *Helix aspersa*

*Helix vulgaris*



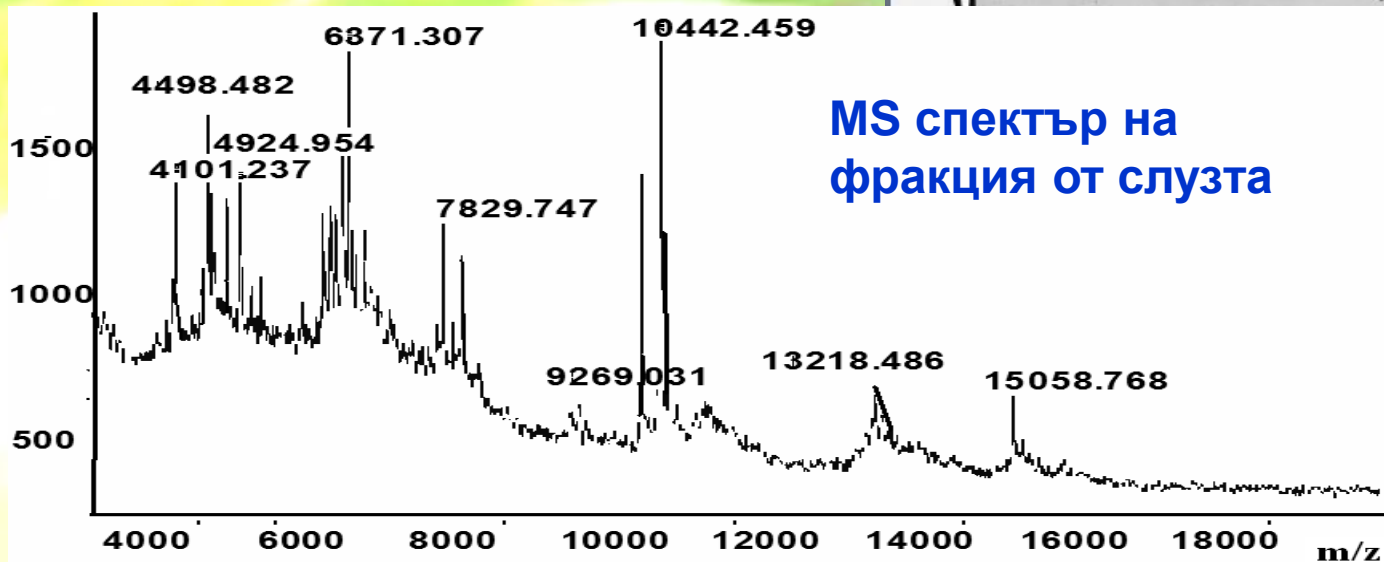
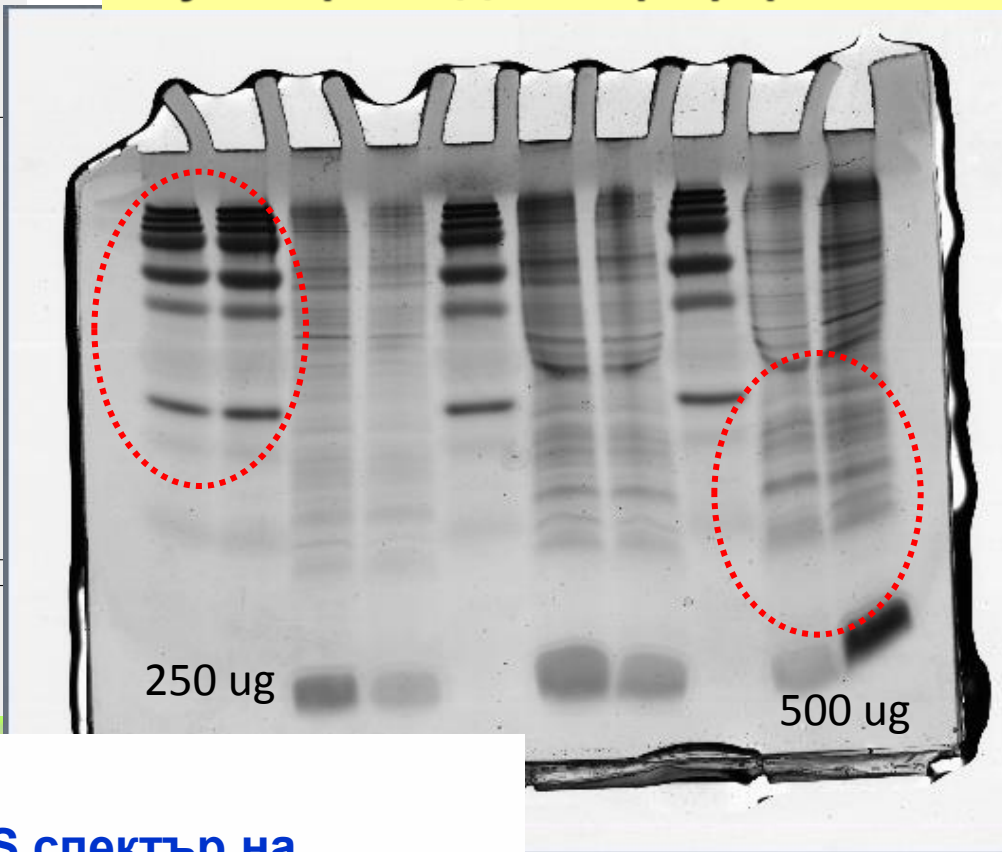
# Аминокиселинен анализ на фракциите

Sample Identifier: **Sample 1**  
Chromatogram: I:\Uni\_Tueb\2013\1307171\ASA1\Chromatogramme\A1-5700178  
Injected on: 23.07.2013      Injected at: 18:36



Calculation Method : External Standard  
Calibration Method : One Point  
Factor: 4.000000e+000

# Анализ на компонентите в слюта чрез 1-Д електрофореза

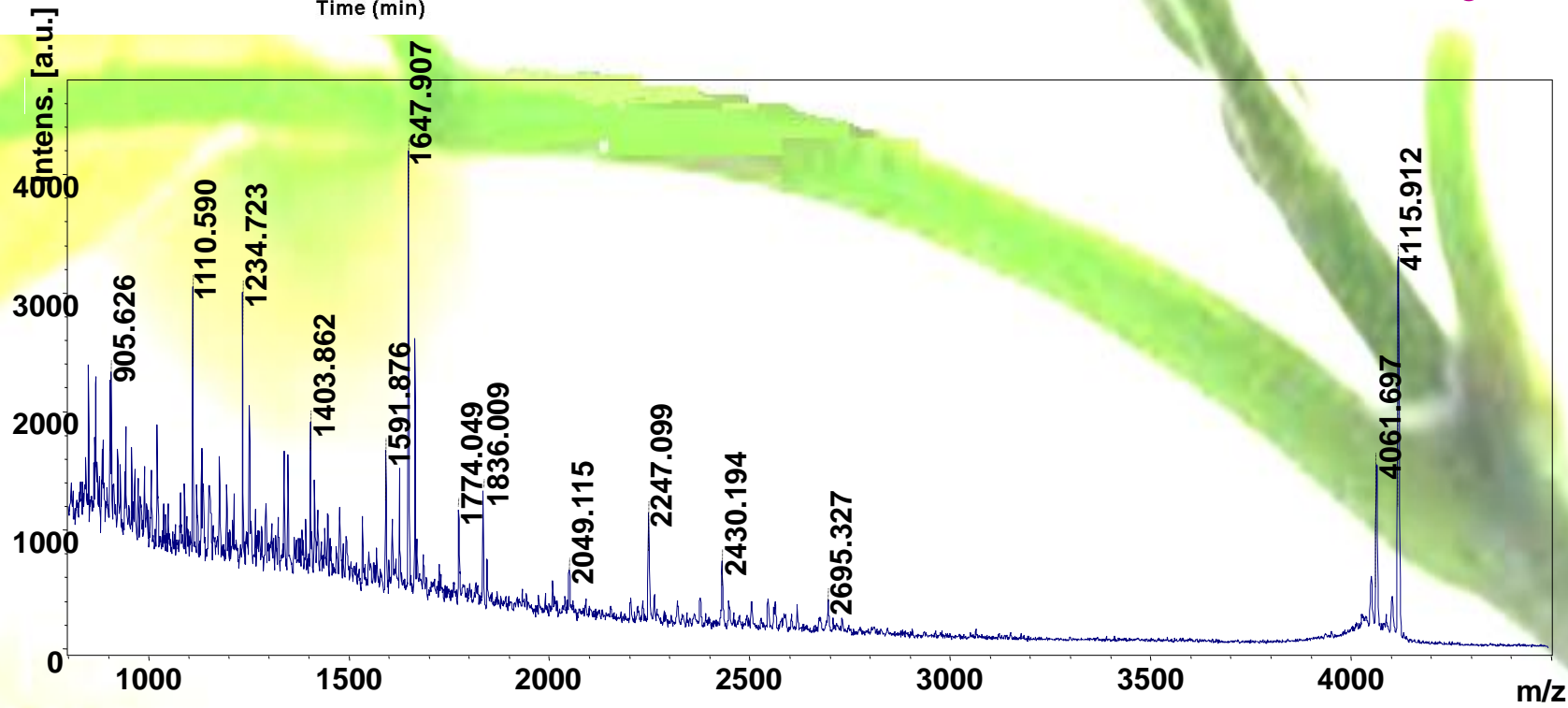
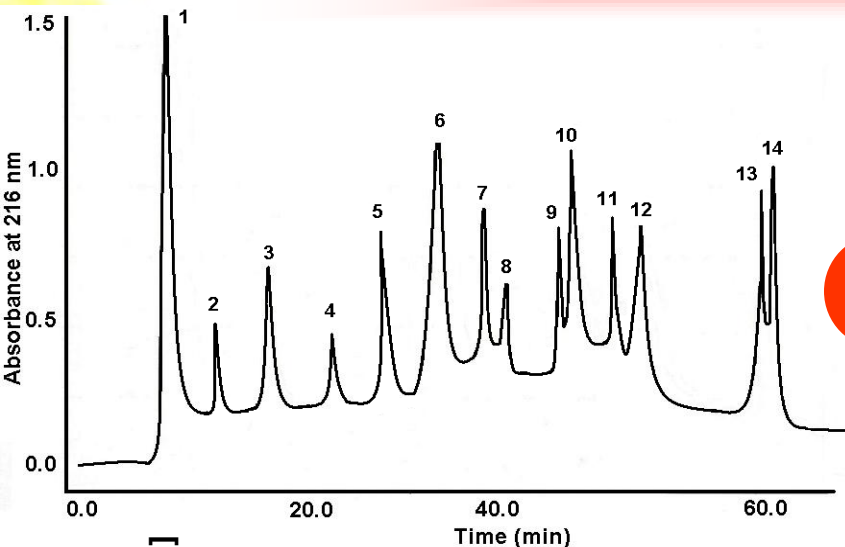


MS спектър на фракция от слюта



# ИЗОЛИРАНЕ И ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА КОМПОНЕНТИ В СЛУЗТА

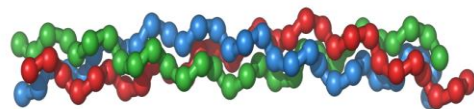
анализ MALDI-TOF-MS, CE-MS и Q-Trap-MS



VIHEVGTSH,  
 SLEERDIQSLQ,  
 RNHFDEYDNLDFNH,  
 RNHFDEYDNLDFNHQ,  
 AGVGVKDVTRL,  
 VREGVLPDP,  
 IDSLEERDIQSLQ,  
 DVTNVFNKL,  
 HFVDHIT,  
 VPLNKIR,  
 VPGVKKP,  
 DEAVSLRDA,  
 AGEIESLR,  
 SQDEAVSLRDA,  
 DHEDLGYGYDN,  
 DWTSPGNELP,  
 SEYGIVVVRE,  
 GHIDDASADTV,  
 FDPPEGAE,  
 DPPIGHNEEGHE,  
 VNDLTDSEVANL,  
 DLTNLGLSPK,  
 LDPHILPDP,  
 YVDPSNGNTV  
 EYGIVVVREANTD,  
 QDEAVSLRDA,  
 LDPHILPDP,  
 GGETEMPFEFDR,  
 HIDDASADTV,  
 SEYGIVVVREANTD

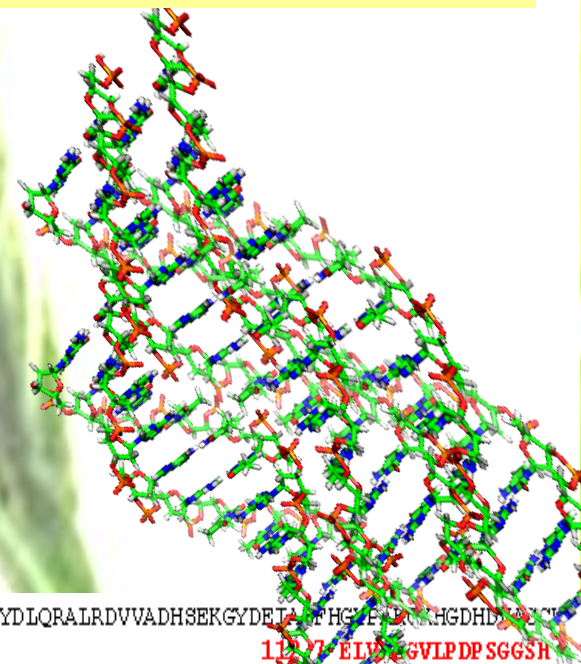
# Пептиди, хомоложни на колагена

EASEYGIVVVR,  
 VIHEVGTSH,  
 HLEVEVR,  
 DQYNLGQVY,  
 DDLTLNGLSPKA,  
 SGHIDDASADTV,  
 VNEILK,  
 NYPIENLVS,  
 SSDVNPDPVT,  
 EEASEYGIVVVR,  
 QQDQGLGGFEA,  
 DPHILPDP,  
 EYGIVVVR,  
 EITDQLKE,  
 DLTNLGLSPKA,  
 SEYGIVVVR,  
 DQGLGGFEAIAG,  
 SGKVAGEDAVTT,  
 LGHDVH,  
 VDPSNGNTV,  
 GGETEMPFEFN,  
 ADVEVHV,  
 DQGLGGFEA,  
 DHEDLGYGY,  
 SHHVHYDDE,

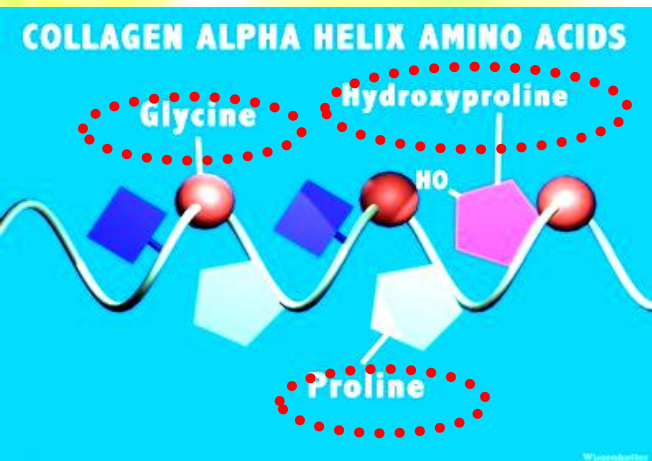


VIHEVGTSH,  
 SLEERDIQSLQ,  
 RNHFDEYDNLDFNH,  
 RNHFDEYDNLDFNHQ,  
 AGVGVKDVTRL,  
 VREGVLPDP,  
 IDSLEERDIQSLQ,  
 DVTNVFNKL,  
 HFVDHIT,  
 VPLNKIR,  
 VPGVKKP,  
 DEAVSLRDA,  
 AGEIESLR,  
 SQDEAVSLRDA,  
 DHEDLGYGYDN,  
 DWTSPGNELP,  
 SEYGIVVVRE,  
 GHIDDASADTV,  
 FDPPEGAE,  
 DPPIGHNEEGHE,  
 VNDLTDSEVANL,  
 DLTNLGLSPK,

# Пептиди, хомоложни на хемоцианин



Helix BHLHVRKNVDRKLTKEDELYDLQRALRDVVADHSEKGYDEI...  
 Helix HGDPNFPTWHRLLVVQLEQALKDKGLTFGVPEYDWTQELHDE...  
 Helix INFWBHLHYEGEVHVGDRTYHTSRAIDERLY...  
 Helix QFEVSHNYIHSLVGGRSQYSLSSLEYTIYDPIFFLHHSNVERLFQIYTEVQKYRESKGE...  
 Helix GQRVICDIBHLHRGYFAPLEPFSRDSNPFVTKENS SPEKALTNSAAFQYSYDDLTLNGL...  
 Helix SPKAIADLIKEKQSHDRADFELHNIGASADVVRVVCVDLDGLHHTEPHCEHAGDFIL...  
 Helix GGPLEMAWSFGHBHLHPHFETIKTVQKLGPLDGNHYHIEVDIFHINGTELPDVLPRAG...  
 Helix VDFRPAVGKSDPPIGHNEEGHEHFFHEGVSVRKNVDRI...  
 Helix GYQALAEFHGDPGKCPBHLHSPTARDRLACCVHGMPTFFPHWRLLV...  
 Helix GLPYWDFTRPGAHVDPDLANEETYIDPHTGAKHHNPFHDA...





## ОПИТНИ ОБРАЗЦИ:

**Опитен образец 1** съдържа смес от Фракция 1, Фракция 2, Фракция 4 и изходна слуз в съотношение съответно (10%:25%:15%:50%), подходящ за влагане в козметика и хранителни добавки.

**Опитен образец 2** съдържа смес от Фракция 1, Фракция 4 и изходна слуз в съотношение съответно (25%:25%:50%), подходящ за влагане в козметика (за освежаване, хидратиране и регенериране).

**Опитен образец 3** съдържа смес от Фракция 1 и изходна слуз в съотношение съответно (25%:75%), подходящ за влагане в козметика (акне, хидратиране и регенериране) и хранителни добавки.

**Опитен образец 4** съдържа смес от Фракция 2 и изходна слуз в съотношение съответно (25%:75%), подходящ за влагане в козметика (против акне).

**Опитен образец 5** съдържа смес от Фракция 3 и изходна слуз в съотношение (25%:75%) съответно, подходящ за влагане в козметика (в продукти за регенериране и анти-ейдж терапия, в продукти предназначени за след слънчево изгаряне) и в хранителни добавки.

**Опитен образец 6** съдържа смес от Фракция 4 и изходна слуз в съотношение съответно (25%:75%), подходящ за влагане в хранителни добавки и в козметика (анти-ейдж терапия, подхранва кожата, за заличаване на стрии и белези).

**Опитен образец 7** съдържа смес от Фракция 2, Фракция 3, Фракция 4 и изходна слуз в съотношение съответно (15%:25%:25%:35%), подходящ за влагане в хранителни добавки (гастрит и общо подсилване на организма).

**Опитен образец 8** съдържа смес от Фракция 1, Фракция 2, и изходна слуз в съотношение съответно (10%:15%:75%), подходящ за влагане в козметика (против акне) и в хранителни добавки (общо подсилване на организма).

**Опитен образец 9** съдържа смес от Фракция 1, Фракция 3 и изходна слуз в съотношение съответно (10%:25%:65%), подходящ за влагане в козметика и в хранителни добавки.

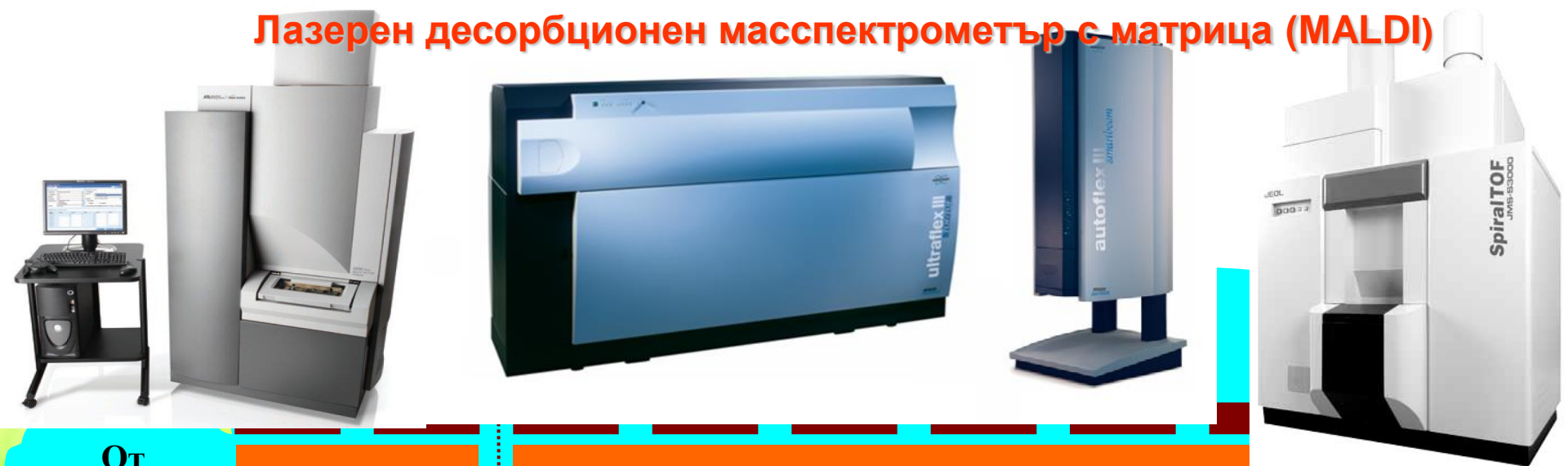
**Опитен образец 10** съдържа смес от Фракция 2, Фракция 3 и изходна слуз в съотношение съответно (10%:20%:70%), подходящ за влагане в козметика и в хранителни добавки.

**Опитен образец 11** съдържа смес от Фракция 3 и Фракция 4 в съотношение съответно (25%:75%), подходящ за влагане в козметика и в хранителни добавки за ставни проблеми.

**Опитен образец 12** съдържа смес от Фракция 1, Фракция 3 и Фракция 4 в съотношение съответно (10%:35%:55%), подходящ за влагане в козметика и в хранителни добавки за ставни проблеми.

Изобретението се илюстрира с приведените по-долу примери, които не го ограничават.

# Лазерен десорбционен маспектрометър с матрица (MALDI)



## Q-TRAP и LC-MS/MS система





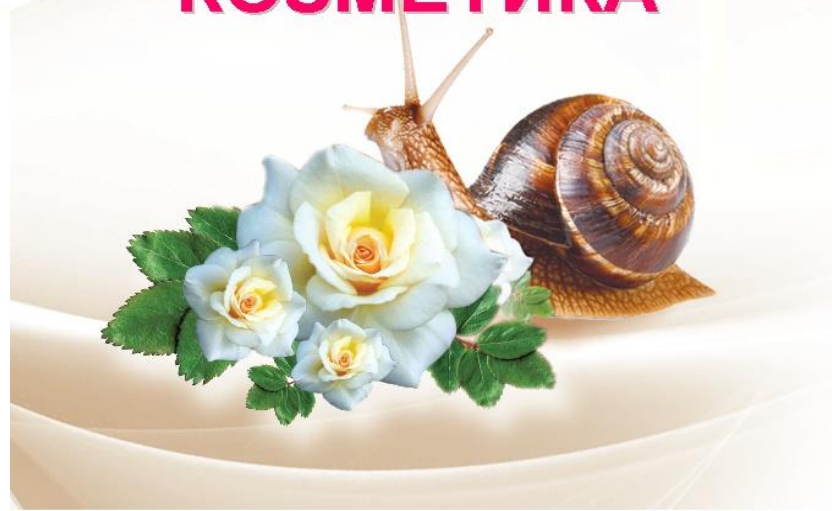
# БЪЛГАРСКА "АЛЕКС 1977"



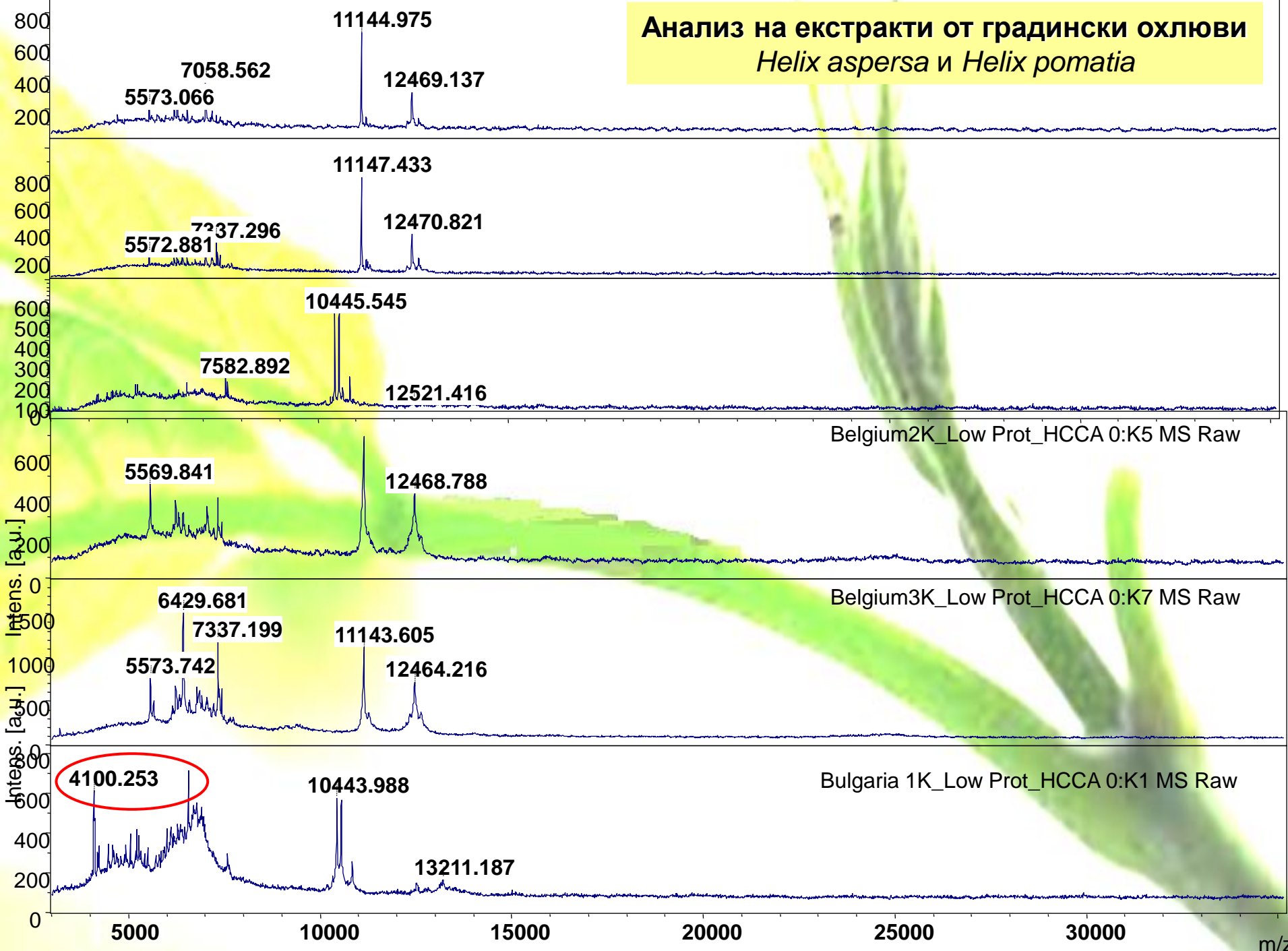
ОТ ОХЛЮВИ, ОТГЛЕДАНИ В БЪЛГАРИЯ



КОЗМЕТИКА

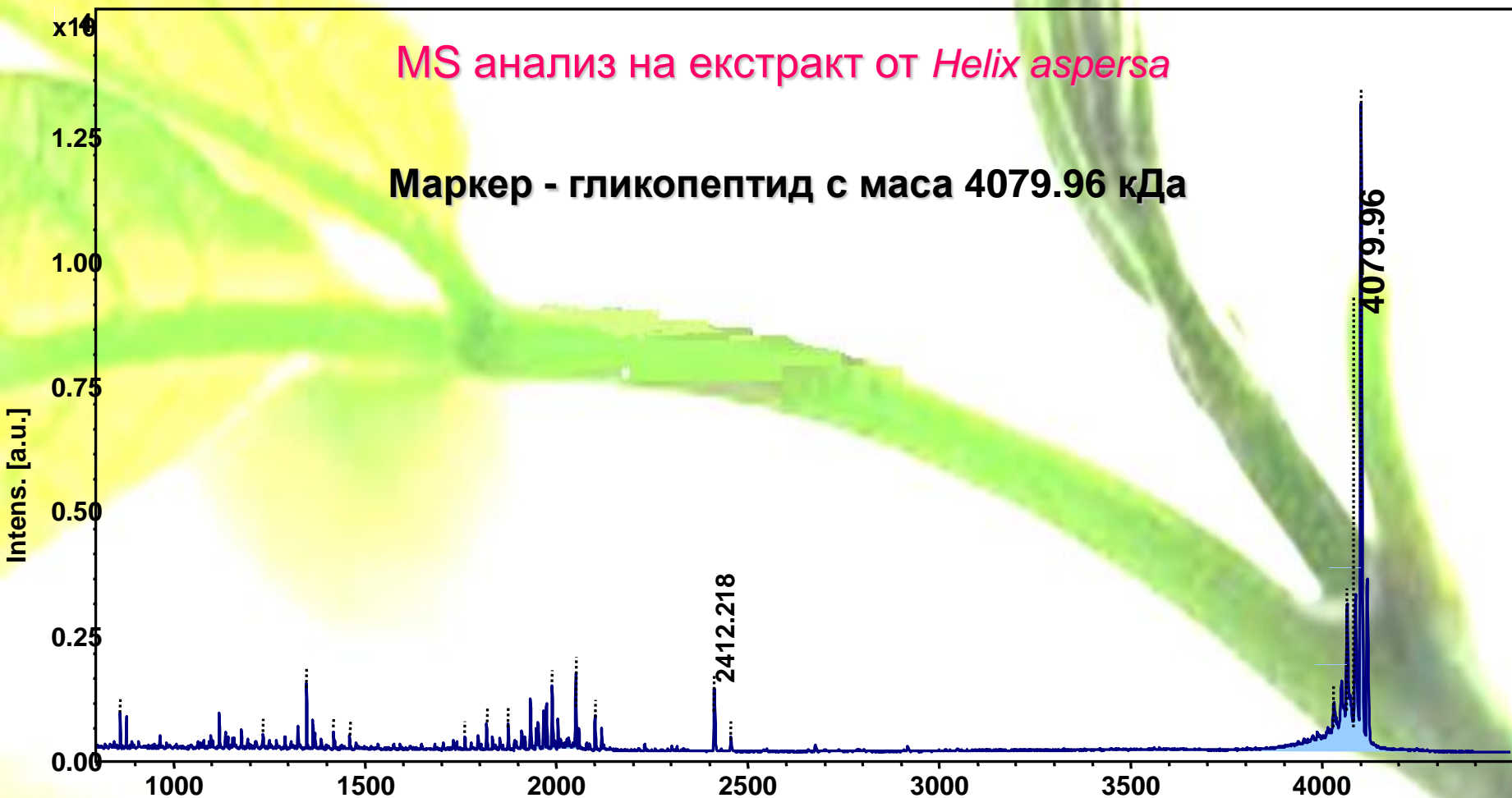


**Анализ на екстракти от градински охлюви**  
*Helix aspersa* и *Helix pomatia*



# Анализ на екстракти от градински охлюви *Helix aspersa*, *Helix lucorum* и *Helix pomatia*

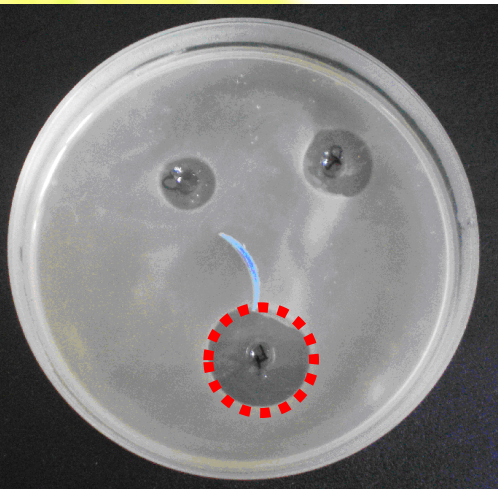
Snail <i>Helix aspersa</i> (mucus BG)	0.020 $\mu\text{g}$ Cu/mg	0.040 $\mu\text{g}$ Zn/mg
Snail <i>Helix pomatia</i> (mucus Belgium)	0.024 $\mu\text{g}$ Cu/mg	0.023 $\mu\text{g}$ Zn/mg



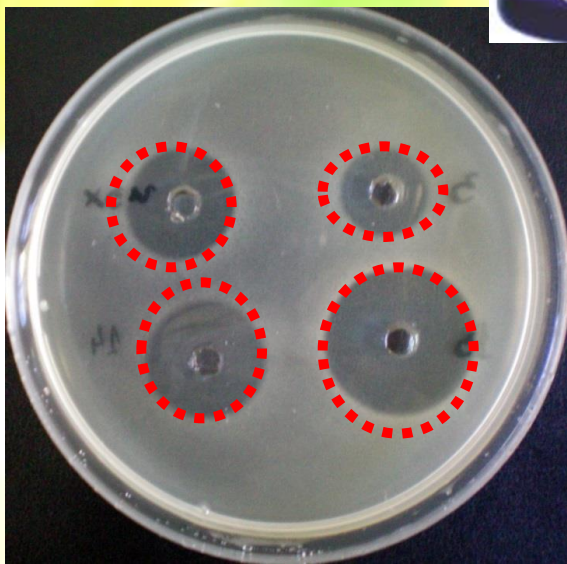
# АНТИБАКТЕРИАЛЕН ЕФЕКТ

Екстракт (Продукт) – ефективен при третиране на кожни проблеми

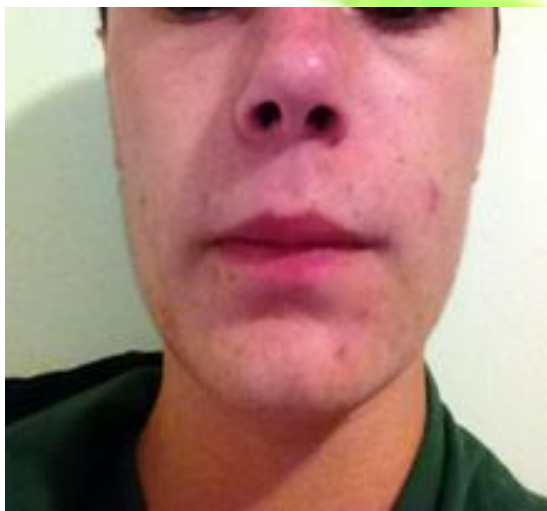
*Propionibacterium acnes* КРА



*Propionibacterium acnes*



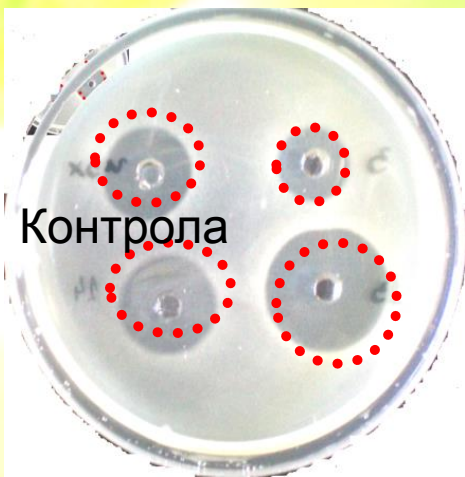
СЪЗА ОТ ОХЛЮВ



# АНТИБАКТЕРИАЛЕН ЕФЕКТ

Екстракт (Продукт) - благоприятен ефект при стомашно-чревни проблеми, като язва, гастрит, киселини и тежест в стомаха и др.

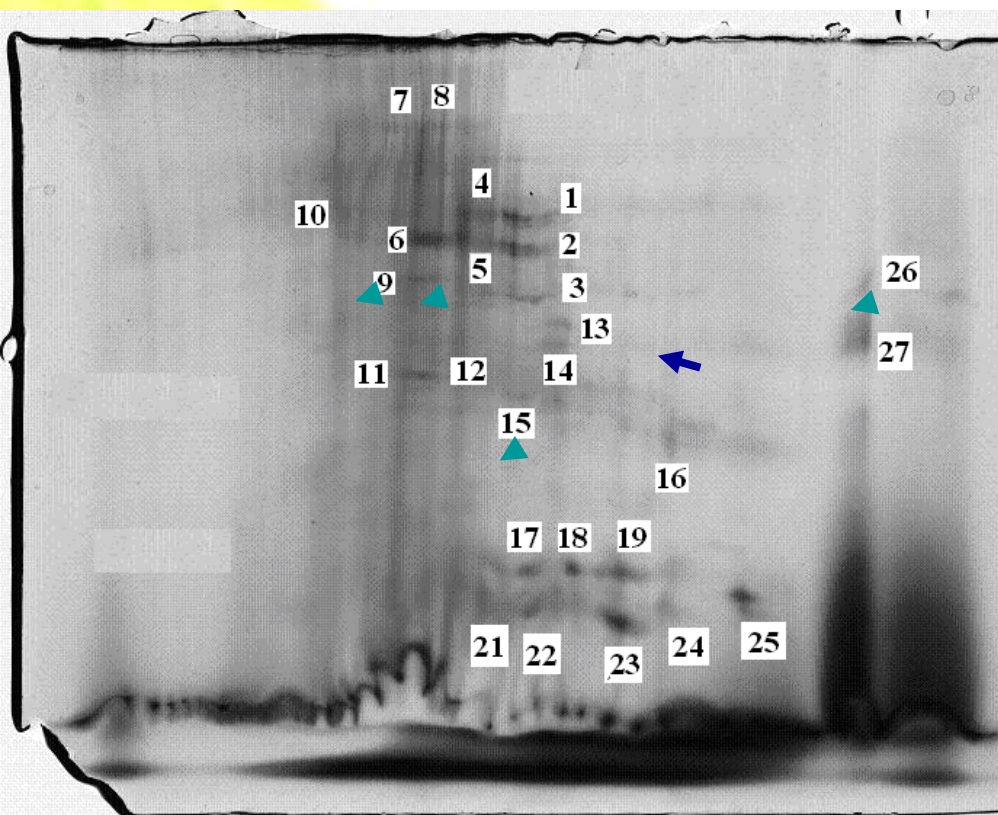
*Helicobacter pylori* (България)



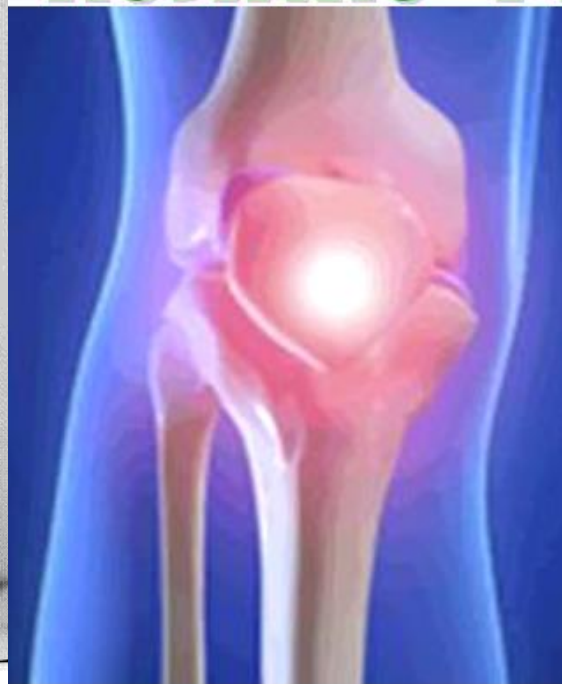
*Helicobacter pylori* - Белгия



2Д-ПАГЕ на фракция с маса между 20-100 кДа



# "Хеликс Флекси"



**Еластин** - изгражда еластичните нишки в съединителната тъкан и обезпечава твърдостта и еластичността на кожата и вътрешните тъкани;

**Колаген тип I** - е отговорен за здравината и издръжливостта на тъканите в тялото - 30%.

**Колаген тип II** - изгражда до 80% от хрущялната тъкан.



## РЕГЕНЕРИРАЩ ГЕЛ “Мукофикс”

Ефикасност и поносимост на гела при пациенти с хирургични рани и язви с различен произход

Клиника по кожни болести “Персенк“ гр. София

Пациентите са разделени в три групи :

- 1 ) Пациенти със зашити хирургични рани след отстраняване на кожни тумори;
- 2 ) Пациентите с отворени хирургични рани след отстраняване на кожни тумори;
- 3 ) Пациенти с язви, образувани от:
  - ❖ хронична венозна недостатъчност;
  - ❖ декубитални рани;
  - ❖ дългогодишен незарастващи язви, след отстраняване на кожен тумор.



# Mucofix

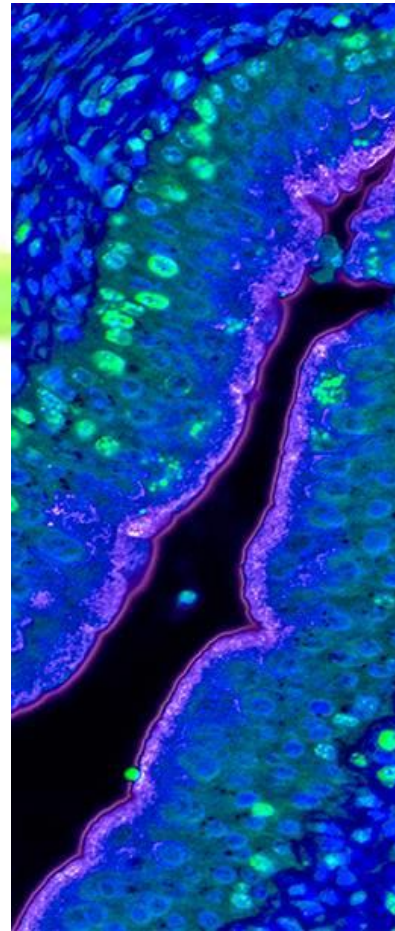
инфекциозни рани



Ефективен при: диабетни рани,  
псориазис, изгаряния и  
заличаване на белези



Следоперационни рани



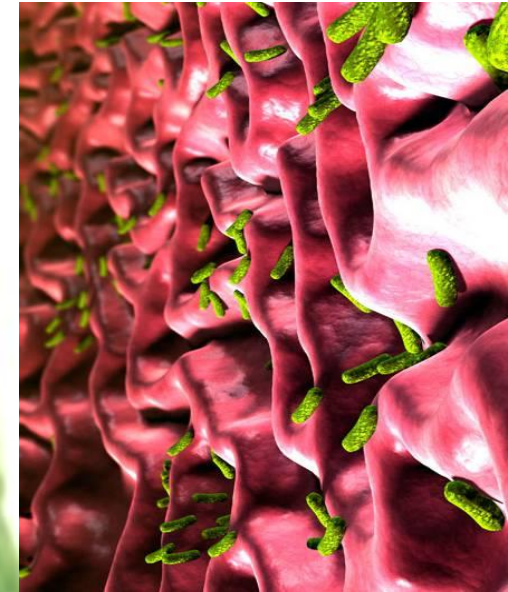
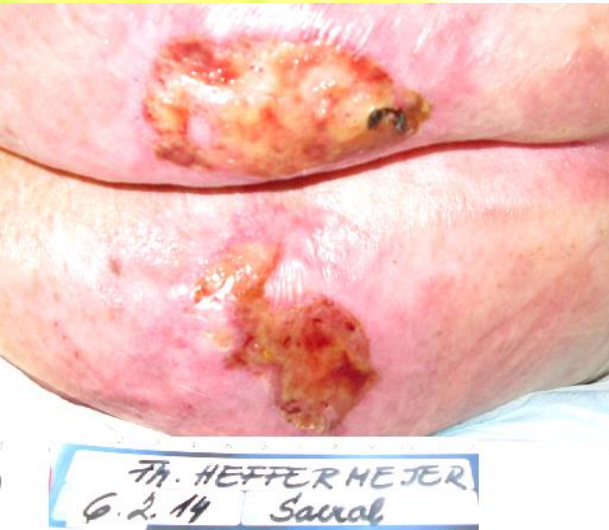
# Комбинирано лечение - след отстраняване на кожен тумор и директно третиране на раните



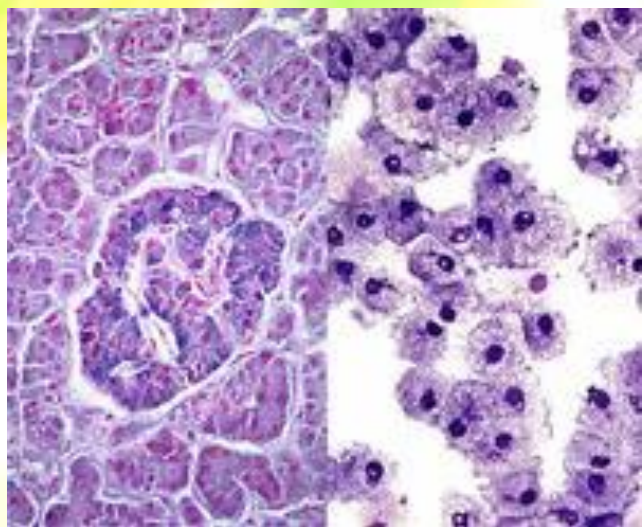
# Лечебно заведение във Виена

Следоперативни рани на туморни образувания  
и декубитални рани

декубитални рани



# Рани, причинени от хронична венозна недостатъчност



**Първа награда - статуетка  
«Изобретател на годината 2012»**



**Почетни грамоти от  
Московский Городской Съвет и  
Диплом на IV-то изложение  
"ИТИ'2012"**



**Награда «Питагор» за 2013**



**Първа награда за 2014 г. на БТПП**

# Колективи от Германия, Белгия и Италия



Проф. Ван Биимен

Проф. Волфганг Фьолтер

Проф. Стефан Стефанович



# Научен колектив :



**Людмила Велкова**



**Александър Долашки**



**Огняна Анева**



**Елена Костадинова**



**Лили Йосифова**

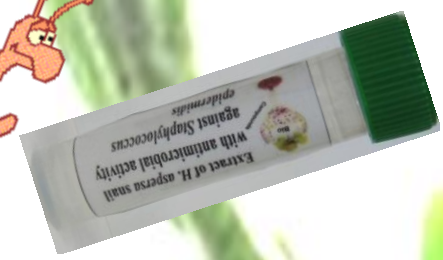


**Иван Илиев**



Правата над разработените продукти са защитени  
с седем патента

# БЛАГОДАРИЯ ЗА ВНИМАНИЕТО



Номинация от ИОХЦФ-БАН за вписване в  
“Златната книга на българските изобретатели и откриватели”