



## Информация за изпълнение на етап на проект

|   |
|---|
| <b>Наименование на конкурса:</b>  |
| Конкурс за финансиране на научни изследвания – 2017 г.  |
| <b>Основна научна област:</b>   |
| Химически науки   |
| <b>№ на договор:</b>  |
| ДН 19/6   |
| <b>Начална и крайна дата на проекта:</b>  |
| 10.12.2017 г. – 10.12.2020 г.   |
| <b>Заглавие на проекта:</b>   |
| Нов подход за лечение на рак чрез епитоп-специфично туморно инхибиране  |
| <b>Базова организация:</b>  |
| Институт по органична химия с Център по фитохимия – БАН   |
| <b>Партньорски организации:</b>   |
| Институт по микробиология – БАН   |
| <b>Ръководител на научния колектив (академична длъжност, научна степен, име):</b>   |
| Доцент д-р Красимира Николова Идакиева  |
| <b>Общ размер на отпуснатото финансиране за първи етап:</b>   |
| 60 000 лв.  |
| <b>Интернет страница на проекта (ако има такава):</b>   |
|   |
| <b>Научни публикации по проекта:</b>  |
| 1. Raynova, Y., Angelov, I., Idakieva, K., Fluorescence properties and conformational stability of hemocyanin isolated from snails <i>Helix aspersa maxima</i> , Journal of Chemical Technology and Metallurgy, 2019, in press. |
| 2. Raynova, Y., Todinova, S., Yancheva, D., Guncheva, M., Idakieva, K., Enhanced structural stability of oxidized <i>Helix aspersa maxima</i> hemocyanin, Current Topics in Peptides and Protein Research, 20, 2019, in press.  |
|   |
|   |
|   |



*Описание на очакваните резултати по проекта (до 1 стр. в рамките на полето по-долу):*

Разработването на противотуморни ваксини е перспективно терапевтично направление. Много от тези ваксини се основават на тумор-асоциирани въглехидратни антигени (ТАСAs), химически конюгирани към протеинов носител. Хемоцианините са много обещаващ клас противотуморни терапевтични средства, поради техните имуногенни свойства и липсата на токсичност или странични ефекти.

Целта на проекта е да се постигне селективно потискане на прогресирането на тумора в модел на миши меланом, чрез разработване на химерна протеинова ваксина, на основата на хемоцианинова молекула, конюгирана с мимотопен пептид, структурно подобен на тумор-асоциирания въглехидратен епитоп GD3. Проектът е насочен целево и към изясняване на влиянието на въглехидратните фрагменти в хемоцианиновата молекула за антинеопластичните свойства на тези биологично активни вещества.

Хемоцианините, обект на настоящето изследване, ще бъдат изолирани и пречистени от моллюсков организми. Ще бъдат получени нови данни за структурата в разтвор и конформационна стабилност на тези протеини. За целите на проекта ще бъде възпроизведен експериментален модел на миши меланом. Ще бъдат тествани *in vivo* противотуморните свойства на хемоцианините. Ролята на въглехидратните вериги ще бъде анализирана чрез *in vivo* третиране на опитните мишки с дегликозилирани форми на хемоцианини. Пептидът (GD3P4), структурно наподобяващ тумор-асоциирания въглехидратен епитоп (GD3), специфичен за меланомните ракови клетки, ще бъде синтезиран и химически конюгиран към хемоцианиновите молекули. Потенциалът на хемоцианините, да бъдат използвани като протеин-носители в конюгирани ваксини, съдържащи тумор-асоциирани въглехидратни антигени (ТАСAs), ще бъдат изучен в експерименталния модел на миши меланом.

От изпълнението на проекта могат да се очакват нови данни за точните механизми на специфично инхибиране на туморните клетки, важни за медицинското приложение на тези научни изследвания.

Резултатите от проекта ще бъдат от интерес за фармацевтичните компании за производство на лекарства и ваксини, поради възможността за получаване на ново имуносупресивно лекарство за лечение на неоплазии. Изпълнението на проекта включва интердисциплинарни изследвания, което ще допринесе за задълбочаване на научните познания и разширяване на практическите умения и ще спомогне за професионалното развитие на младите учени. В допълнение, работата по проекта ще разкрие перспективи за задълбочаването на сътрудничеството, както между отделните колективи в проекта, така и с чуждестранни научно-изследователски лаборатории.

След края на проекта, публикуването на получените резултати ще допринесе за разпространение на резултатите сред научната и бизнес общността.



## Членове на научния колектив

| <i>Организации/участници<sup>1</sup></i>   | <i>Бележка<sup>2</sup></i> |
|--|----------------------------|
| <i>Базова организация:</i>   |                            |
| Институт по органична химия с Център по фитохимия – БАН  |                            |
| <i>Ръководител на научния колектив</i>   |                            |
| Доц. д-р Красимира Идакиева  |                            |
| <i>Участници:</i>  |                            |
| Доц. д-р Мая Гунчева<br>Доц. д-р Иван Ангелов<br>Доц. д-р Деница Пантелеева<br>Гл. ас. д-р Юлиана Райнова<br>Доц. д-р Светла Тодинова<br>Ас. Ивелина Енева | МУ, ПД<br>ПД<br>ДО         |
| <i>Партньорска организация:</i>  |                            |
| Институт по микробиология – БАН  |                            |
| <i>Участници:</i>  |                            |
| Доц. д-р Андрей Чорбанов<br>Гл. ас. д-р Николина Михайлова<br>Илиян Манойлов<br>Силвия Брадянова<br>Габриела Бонева  | ДО<br>ДО<br>СТ             |
| <i>Партньорска организация:</i>  |                            |
|  |                            |
| <i>Участници:</i>  |                            |
|  |                            |
| <i>Партньорска организация:</i>  |                            |
|  |                            |

<sup>1</sup> Отбележете академичната длъжност, научната степен, име и фамилия на всеки участник като включите и участниците, които са работили по проекта не през целия период за изпълнение на проекта

<sup>2</sup> Отбележете дали участникът в колектива е млад учен (МУ), постдокторант (ПД), докторанти (ДО) или студенти (СТ), или учен от чужбина (УЧ).



**Постигнати резултати от изпълнението на проекта и кратък анализ на тяхната приложимост (до 1 стр. в рамките на полето по-долу)**

За целите на проекта са получени препаративни количества от пречистени нативни хемоцианини от молюскови организми. Посредством хроматографски методи бяха изолирани хемоцианинови изоформи, субединици и кислород-свързващи функционални единици.

С оглед да се гарантира качеството и ефективността на протеин за терапевтична употреба, неговата конформационна и термична стабилност са ключови характеристики, които се нуждаят от изясняване. Посредством изследване със спектроскопски методи – кръгов дихроизъм, флуоресцентна и инфрачервена спектроскопия, бяха получени нови данни за структурата в разтвор и конформационната стабилност на хемоцианин, изолиран от охлюви *Helix aspersa* maxima (HaH) и неговите изоформи. Изследванията с диференциална сканираща калориметрия демонстрират значителната термична стабилност на хемоцианините.

Резултатите от проведените изследвания разкриват, че окисляването на въглехидратните вериги в хемоцианини с натриев перйодат води до повишаване на структурната стабилност, по-специално устойчивостта към протеолитично деградиране, както и на термичната стабилност на тези кислород-пренасящи протеини. Модификацията на хемоцианини чрез окисление с натриев перйодат ще послужи при бъдещо изясняване на ролята на въглехидратните структури за имуностимулиращите и противотуморни свойства на тези гликопротеини.

Синтезирани бяха, с много висока чистота, два пептида (с и без спейсър), мимикриращи с тумор-асоциирания въглехидратен епитоп (GD3). Спейсърният участък Ahx-K-NH<sub>2</sub> в С-края на пептида обезпечава свързването му към хемоцианините при конструирането на химерните протеинови молекули. Синтезираните пептиди без спейсърен участък, ще бъдат използвани за анализа на серумните антитела чрез ELISA и Western blot. Получени бяха химерни протеинови молекули RtH-GD3P4 и HaH-GD3P4, след конюгиране на пептидните мимотопи към хемоцианиновите носители.

Чрез миеломна клетъчна линия B16F10, беше създаден модел на миши меланом в нормални мишки C57B/6. Установена беше концентрацията на клетки, водеща до развитие на тумора в граници до 42 дни, което дава възможност за работен прозорец за терапия. Стартирана е терапията на групи от експериментални животни с нативни и дегликозилирани хемоцианини. Очакваме, че след третирането с хемоцианини на инокулираните с меланом опитни мишки, тяхната преживяемост и много от наблюдаваните параметри ще се подобрят. Започнато е третиране на експерименталните животни с химерните молекули RtH-GD3P4 и HaH-GD3P4. Междинните резултати показват много добри резултати от имунизацията с противотуморните ваксини. Терапията и работата с групи експериментални животни продължава и през втората част от работната програма на проекта.

Получените резултати са от значение, както за биоорганичната химия, така и за практическото приложение на хемоцианините в медицината.