

3. Национален патент: Екстракти от охлюв *Helix aspersa*. Изобретение заявка № 111616/08.11.2013; Защитен № 66811 В1/31.12.2018 г., П. Долашка, Л. Велкова.



ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО
на Република България

ПАТЕНТ
ЗА
ИЗОБРЕТЕНИЕ

Рег. № 66811 В1

Заявка № 111616	Притежател/и:
Дата на заявяване: 08/11/2013	"Био Компоненти" ООД,
Приоритет:	ул. "Христо Ковачев" 24-26,
Срок на действие: 08/11/2033	ет. 1, 1527 София [BG]
Публ. за заявката: 31/08/2015	Людмила Георгиева Велкова,
Публ. за издаване: 31/12/2018	бул. "Княз Дондуков" 95, вх. А,
Наименование: ЕКСТРАКТИ	ет. 5, ап. 11, 1504 София [BG]
ОТ ОХЛЮВ HELIX ASPERSA	Изобретател/и:
	Павлинка Александрова Долашка
	Людмила Георгиева Велкова

Председател:
Д-р Петко Николов

Дата: 18.01.2019

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) **BG**

(11) **66811 B1**

(51) Int.Cl.

C 07 K 1/14 (2006.01)

C 07 K 7/00 (2006.01)

C 07 K 14/435 (2006.01)

ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Заявителски № **111616**

(22) Заявено на **08.11.2013**

(24) Начало на действие
на патента от: **08.11.2013**

Приоритетни данни

(31)

(32)

(33)

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № **8** на **31.08.2015**

(45) Отпечатване на **31.12.2018**

(46) Публикувано в бюлетин № **12.2**
на **31.12.2018**

(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №:

(73) Патентоприитежател(и):

"БИО КОМПОНЕНТИ" ООД, 1527 СОФИЯ,
УЛ. "ХРИСТО КОВАЧЕВ" 24-26, ЕТ. 1;
ЛЮДМИЛА ГЕОРГИЕВА ВЕЛКОВА,
1504 СОФИЯ, БУЛ. "КНЯЗ ДОНДУКОВ" 95,
ВХ. А, ЕТ. 5, АП. 11

(72) Изобретател(и):

Павлинка Александрова Долашка
Людмила Георгиева Велкова

(74) Представител по индустриална
собственост:

(86) № и дата на РСТ заявка:

(87) № и дата на РСТ публикация:

(54) **ЕКСТРАКТИ ОТ ОХЛЮВ HELIX ASPERSA**

(57) Изобретението се отнася до четири екстракта от слюзта на градински охлюви *Helix aspersa*, съдържащи различни биокомпоненти (пептиди, ензими, киселини, олигозахариди, разтворими протеини и др.) и до методи за получаването им.

4 претенции, 5 фигури

BG 66811 B1

(54) ЕКСТРАКТИ ОТ ОХЛЮВ *HELIX ASPERSA***Област на техниката**

Изобретението се отнася до четири биологично активни екстракти (Екстракт 1, 2, 3 и 4) с определени характеристики и методи за получаване.

Предшестващо състояние на техниката

Използването на натурални продукти или компонентите, извлечени от тях, е изключително актуално в последните години в медицината, хранителните добавки и козметиката. Те помагат за облекчаването на различни болести, инфекции и хронични заболявания, помагат да живеем по-дълго и да водим по-здравословен начин на живот. Ето защо през последните две десетилетия са разработени голяма група компоненти, извлечени от различни организми и природни източници, като билки, водорасли, гъби, риби, охлюви и др. Гастроподите (охлювите), са разнообразен клас с 60 000-75 000 известни досега вида.

Например: 1). Известно е, че слюзта от охлюви съдържа микроелементи, например, мед (Cu), цинк (Zn), желязо (Fe), калций (Ca^{2+}) или комбинации от тях, около 0,0001 до около 0,01% от най-малко един микроелемент от теглото на биологична течност; уронови киселини (0,001 - 0,1%); хексозамини (0,003-0,5%); ацетилхексозамини (0,001-0,1%); поне около 0,1% нискомолекулни антиоксиданти. Нискомолекулните антиоксиданти включват пикочна киселина, убихинони, липоева киселина, витамин С и Е, и фенолни съединения, селен, техни производни или комбинации от тях. Слизта съдържа от 0,01 до 5% мукополизахариди, които включват глюкозаминогликани и протеоглики, съдържащи карбохидратните остатъци като хондроитин сулфат, дерматан сулфат, хепарин и хепаран сулфат; около 0,01-1,0% хиалуронова киселина; около 0,001-0,1% кислород-транспортен протеин (хемоцианин), който предпазва от окислително увреждане и насърчаване на клетъчна пролиферация и регенерация на клетките на кожата; около 0,01-0,1% ензими, 0,001-0,01% протеини с високо молекулно тегло; около 0,005-0,1% високомолекулни антиоксиданти и около 80-98% вода [Wang W., et al., 2009; Smith A. M., et al., 2009; Werneke S. W., et al., 2007].

2). Други проучвания също показват, че слюзта съдържа пептиди като муцин, които притежават антибактериална активност както срещу грам-положителни и грам-отрицателни бактерии [Tomas S., 2013, Kubota Y. et al., 1985].

3). Освен пептиди, в слюзта са установени и протеини с антибактериално действие. Така например антибактериалният фактор от изолиран от слиз на гигантски африкански охлюв *Achatina Fulica*, който е гликопротеин с молекулно тегло от около 160,000 кДа, показва силно изразена положителна антибактериална активност, както за грам-положителни бактерии, като *Bacillus subtilis* и *Staphylococcus aureus*, така и за грам-отрицателни бактерии, като *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* [Kubota Y. et al., 1985].

4). В последните години е установено, че слюзта от градински охлюв *Cryptomphalus aspersa* (известен също като *H. aspersa*) съдържа антиоксиданти, като супероксид дисмутаза (SOD) и глутатион-S-трансфераза (GST) [Brieva A., et al., 2008, Cruz M. C. et al., 2012]. Също така са идентифицирани и други важни компоненти като: Алантоин (2,5-Dioxo-4-imidazolidinyl urea), гликолова киселина - природно органично съединение малка молекулна верига; еластин - протеин, който присъства във всички гръбначни животни и придава устойчивост и еластичност на тъканите; колагенът, който улеснява синтеза и разграждането на компонентите на дермата. Натуралните колаген и еластин, съдържащи се в слюзта имат структура много близка до човешката кожа и са в подобно съотношение. Охлювите синтезират различни гликоконюгати, които могат да бъдат от полза за медицината. Гликоконюгатите включват въглехидратни структури, свързани с други вещества. Те могат да бъдат: гликопротеини, гликопептиди, пептидогликани, гликолипиди и липополизахариди. Гликоконюгатите участват в междуклетъчното разпознаване и взаимодействие [Wang W., et al., 2009].

Техническа същност на изобретението

Изобретението представлява четири екстракта, получени от слюзта на градински охлюви *Helix aspersa* (Ha), метод за получаването и охарактеризирането им.

Изходният материал се събира от слюзта на градински охлюв *H. aspersa*, който се отглежда в специални ферми в България. Слизта се получава след стимулиране на охлювите със слаб променлив ток за време около 5-20 s. Събраната слюз се подлага на следващ етап на пречистване чрез използване на специален хомогенизатор (механичен или ултразвуков). Получената супернатанта от изходната слюз се филтрува през филм от киселгур, който играе ролята на адсорбент на по-малки и фини частици. Пречистване на слюзта се извършва с груби филтри с различен размер на порите (от 20 μm до 5 μm).

Следващата стъпка включва фракциониране на изходната слюз чрез различни мембрани с пропусковост до 10 кДа, до 30 кДа и до 100 кДа (Милипор) и охарактеризиране на получените четири основни фракции, като всяка фракция е анализирана чрез определяне на рефракционен индекс по Брикс, белтък по Брадфорд и тест орцинол/сярна киселина:

Фракция 1 - Съдържа компоненти с ниска молекулна маса под 3 кДа или под 5 кДа, предимно витамини А, С, Е, Д-пантенол, алантоин, гликолова киселина, свободни аминокиселини и олигозахариди, къси пептиди и др.

Фракция 2 - Съдържа предимно антимикробни пептиди (АМП), нискомолекулни белтъци, ензими и гликопротеини с молекулна маса от 3 кДа до 30 кДа.

Фракция 3 - Съдържа белтъци, гликопротеини и ензими с маси под 100 кДа, като супероксид дисмутаза и глутатион-S-трансфераза, и др.

Фракция 4 - Съдържа предимно високомолекулни протеини с маси над 100 кДа, като колаген, еластин, както и протеоглики, и агрегирани протеинови комплекси.

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

Пояснения на приложените фигури и таблици

Таблица 1. Съдържание на аминокиселинни остатъци в Екстракт 1 са определени чрез Amino Acid Analyzer, LC 3000 (Eppendorf-Biotronik).

Таблица 2. Аминокиселинни последователности на пептидите от Екстракт 1 с маса под 3 кДа, определени след MS/MS с MALDI-TOF/TOF.

Таблица 3. Съдържание на аминокиселинните остатъци в Екстракт 4 (с маси над 100 кДа), определени чрез Amino Acid Analyzer, LC 3000 (Eppendorf-Biotronik).

Таблица 4. Аминокиселинни последователности на пептиди, получени след изрязване на протеините от 2Д-електрофорезата и третиране с трипсин. Представените резултати се отнасят до Екстракт 3, показана на фигура 6.

Фигура 1А. Масспектър (МС) на компоненти с маса под 3 кДа, които се съдържат в Екстракт 1, получена след разделяне на слюзта с Милипор мембрана и определени с матричен абсорбционен мас-ионизатор (MALDI-TOF).

Фигура 2А. Изолирани компоненти в Екстракт 2 чрез обратно-фазова високоефективна течна хроматография (HPLC); Б) Масспектър на компоненти с маса под 20 кДа, които се съдържат в Екстракт 2.

Фигура 3. Хроматограма на разделяне на компоненти с маси над 30 кДа, които се съдържат в Екстракт 3. Получените фракции са разделени посредством анионообменна колона Q-Sepharose при стъпаловиден солеви градиент 9, 13, 30 и 48%, на бързоразделителна течна хроматограма (FPLC).

Фигура 4. 2Д-електрофореза на изолираните фракции от слюзта с маса от 10 до 100 кДа (Таблица 4).

Фигура 5. Масспектър на компоненти с маса 3 - 20 кДа, които се съдържат в Екстракт 2, определени с MALDI-TOF.

Примери за изпълнение на изобретението

Получаване на четири екстракта, включващи различни биоактивни компоненти от слюзта на охлюви *Helix aspersa*

Пример 1.

Слизта от градинските охлюви *Helix aspersa* се отделя чрез прилагане на техника с променлив ток за 10 s и солеви разтвор на 0.1 mol натриев хлорид. Отделената слюз се дезинтегрира, филтрува и концентрира чрез лиофилизиране, след което се замразява чрез използване на течен азот.

В зависимост от молекулната маса, пречистената слюз се разделя на 4 фракции с техника за микро-

филтрация и Мини Ван система, чрез използване на Милипор мембрани с различни размери на порите: Екстракт 1) Съдържа компоненти с маса под 3 кДа; Екстракт 2) Съдържа компоненти с маса между 3-30 кДа; Екстракт 3) Съдържа компоненти с маса между 30-100 кДа; и Екстракт 4) Съдържа компоненти с маса над 100 кДа. Получените фракции се лиофилизират и се съхраняват в продължение на месеци при 4°C.

Получената фракция с маса под 3 кДа е анализирана с матричен абсорбционен масйонизатор (MALDI-TOF) и от получените спектри са определени масите на компонентите (Фигура 1).

Компонентите от Фракция 2 са получени чрез обратно-фазова високоефективна течна хроматография (HPLC), с колона Nucleosil C18 (250 mm x 10 mm; Macherey-Nagel, Duren, Germany), калибрирана с буфер А (H₂O, 0.1% ТФОК). Елуирането е проведено със стъпаловиден градиент на буфер В (80% ацетонитрил, с 0.08% ТФОК), в три стъпки 20, 50 и 80% буфер В, с продължителност на всяка стъпка 20 min, със скорост на потока 1.5 ml/min (Фигура 2А). Абсорбцията в ултравиолетовата област е следена при 280 и 214 nm. Елуираните компоненти са събрани и изсушени с помощта на вакуум-концентратор, след което фракциите са разтворени в MilliQ вода с 0.10% ТФОК (v/v). За рехроматография е използвана същата колона, елуирана с линеен градиент от 5% А (0.1% ТФОК във вода) до 100% В (0.085% ТФОК в ацетонитрил) в продължение на 50 min, при скорост на потока 1 ml/min. Молекулните маси на компоненти с маса под 20 кДа, които се съдържат във фракция 2 са определени от масспектрометричния анализ на MALDI-TOF (Фигура 2Б).

Другите две изолирани от слюзта на градински охлюви *H. aspersa* Фракция 3, която съдържа компоненти с маса между 30-100 кДа и Фракция 4 (с маса на компонентите над 100 кДа), са подложени на йонообменна хроматография на FPLC, с колона Q-Sepharose High Performance, калибрирана с буфер А (Трис/HCl), pH 8.5. За елуиране на компонентите е използван линеен солеви градиент на натриев хлорид (NaCl) 0-1.0 М. Получените компоненти, след елуиране на фракция 3 са показани на Фигура 3.

Пример 2.

Слузта се отделя от градински охлюви *Helix aspersa* чрез прилагане на техника с променлив ток и вода. Отделената слюз се дезинтегрира в продължение на 20 min, центрофугира и преминава през различни етапи на филтрация, след което се концентрира чрез вакуум лиофилизатор.

Получени са четири различни фракции от слюзта в зависимост от молекулната им маса с мембранна техника за микрофилтрация с Милипор мембрани: Екстракт 1) Съдържа компоненти с маса под 3 кДа; Екстракт 2) Съдържа компоненти с маса между 3-20 кДа, Екстракт 3) Съдържа компоненти с маса между 20-100 кДа, и Екстракт 4) Съдържа компоненти с маса над 100 кДа. Получените фракции се лиофилизират и се съхраняват в продължение на месеци при -20°C.

Поотделно, фракциите с маса под 3 кДа; 3-20 кДа и 20-100 кДа са подложени на високоефективна течна хроматография HPLC, с колона Nucleosil C18 (250 mm x 10 mm; Macherey-Nagel, Duren, Germany), калибрирана с буфер А (H₂O, 0.1% ТФОК). Елуирането е проведено с линеен градиент на буфер В (80% ацетонитрил, с 0.08% ТФОК), в продължение на 60 min, със скорост на потока 1.5 ml/min. Абсорбцията в ултравиолетовата област е следена при 280 nm и 214 nm. Елуираните фракции са събрани и изсушени с помощта на вакуум-концентратор. Фракциите са разтворени в MilliQ вода с 0.10% (v/v) ТФОК. За рехроматография е използван линеен градиент от 5% буфер А (0.1% ТФОК, H₂O) до 100% В (0.085% ТФОК в ацетонитрил) в продължение на 50 min, при скорост на потока 1 ml/min.

Получената фракция с маса над 100 кДа е подложена на анионообменна хроматография с FPLC, Q-Sepharose Fast Flow колона, калибрирана с буфер А (Трис/HCl) с pH 8.0. Използван е стъпаловиден солеви градиент на натриев хлорид (NaCl) 0-1.0 М. Чистотата на всички елуирани фрагменти е доказана чрез електрофореза и масспектрометър.

Пример 3.

Слузта се отделя от градински охлюви *H. aspersa* чрез престояване на охлювите в солеви разтвор от 0.25 М натриев хлорид в продължение на 10 min с разбъркване. Отделената слюз се концентрира чрез лиофилизиране, след което се дезинтегрира, като се използва механичен дезинтегратор в продължение на 30 min. Различните компоненти в слюзта се разделят в зависимост от молекулната им маса с мембранна техника за микрофилтрация.

Получената слуз се разделя с Милипор мембрани на 4 екстракта: Екстракт 1) Съдържа компоненти с маса под 10 кДа; Екстракт 2) Съдържа компоненти с маса между 10-50 кДа; Екстракт 3) Съдържа компоненти с маса между 50-100 кДа; и Екстракт 4) Съдържа компоненти с маса над 100 кДа. Фракциите се лиофилизират и съхраняват в продължение на месеци при -18°C .

Получените екстракти 1 и 2, които съдържат компоненти с маса под 10 кДа и между 10-50 кДа, съответно, са разделени с високоефективна течна хроматографска система (HPLC), на колона Nucleosil C18 (250 mm x 10 mm; Macherey-Nagel, Duren, Germany), която предварително е калибрирана с буфер А (H_2O , 0.1% ТФОК). Елуирането на фракцията с маса под 10 кДа е проведено със стъпаловиден градиент на буфер Б (100% ацетонитрил, с 0.08% ТФОК), в три стъпки 10, 60 и 80% буфер Б, с продължителност на всяка стъпка от 20-30 min, със скорост на потока 1.5 ml/min. Другите три фракции са елуирани с линеен градиент на буфер Б (80% ацетонитрил, с 0.08% ТФОК), в продължение на 60 min, със скорост на потока 1.5 ml/min. Абсорбцията в ултравиолетовата област е следена при 280 и 214 nm. Елуираните фракции са събрани и изсушени на вакуум-концентратор. Фракциите са разтворени в MilliQ вода с 0.10% ТФОК (v/v). За рехроматография е използван линеен градиент от 5% А (0.1% ТФОК във вода) до 100% В (0.085% ТФОК в ацетонитрил) в продължение на 50 min, при скорост на потока 1 ml/min.

Фракцията с маса над 100 кДа е подложена на йонообменна хроматография FPLC, Q-Sepharose High Performance колона, калибрирана с буфер А (Трис/HCl), pH 8.0. Използван е солеви градиент на натриев хлорид (NaCl) 0.1-1.0 М. Абсорбцията в ултравиолетовата област е следена при 280 nm. Чистотата на всички елуирани фрагменти е доказана чрез електрофореза и маспектрометър.

Охарактеризиране на получените 4 фракции

Получените четири екстракта от слузта на охлюва, са охарактеризирани след прилагане на различни методи и техники.

Пример 1.

Идентифицирането на аминокиселините във фракция, която съдържа компоненти с маса под 10 кДа, е осъществено чрез Amino Acid Analyzer, LC 3000 (Eppendorf-Biotronik) (Таблица 1). Другите нискомолекулни компоненти са идентифицирани чрез маспектрометрични анализи, с MALDI-TOF/MS. Молекулните маси на компонентите във фракцията под 10 кДа са измерени на High-Performance MALDI-TOF & TOF/TOF Systems (Bruker Daltonics), Autoflex™ III, с матрица α -циано-4-хидроксиканелена киселина, като за анализите са използвани по около 50 pmol от всеки пептид. Аминокиселинни последователности на пептидите от Фракция 1 с маса под 3 кДа са определени от MS/MS спектрите на MALDI-TOF/TOF и са показани в таблица 3.

Анализиране на Екстракт 2 от слузта, съдържаща компоненти с маса над 10 кДа, е проведено чрез 2Д-електрофореза. Разделянето на протеините е проведено на два етапа, както е показано на фигура 4:

1) според изоелектричната точка или заряда на протеина; и 2) според молекулното тегло на компонентите. За целта са използвани стрипове с pH градиент от 3 до 10 за изоелектрично фокусиране. Анализиран са настъпилите промени в някои протеини, изразени в промяна на интензитета или разположението им на 2D-гела. Протеиновите петна са изрязани от полиакриламидния гел и са обезцветени, след което са подложени на хидролиза за 24 h с трипсин (съотношение 1:50), за разкъсване на молекулата на протеина на пептиди. Получените след трипсинолиза пептиди са анализирани с маспектрометър High-Performance MALDI-TOF/TOF Systems (Bruker Daltonics), в резултат на което е определена аминокиселинната им последователност (Таблица 4). Получените резултати са сравнени чрез софтуерните програми BioTools и BLAST със съществуващите структури на протеини в база данни.

Пример 2.

Получените чисти компоненти от фракции с маса над 10 кДа са разтворени в 40% метанол/1% мравчена киселина, след което са подложени на автоматично Едманово разграждане с Pulsed Liquid Protein Sequencer (Applied Biosystems GmbH, Foster City, CA). Определени са N-крайните аминокиселинни последователности на всички биокомпоненти и са сравнени със съществуващите в база данни.

Установените в Екстракт 2 антимикробни пептиди и гликопептиди с маса 4-6 кДа са идентифицираните маспектрометрично чрез High-Performance MALDI-TOF/TOF Systems (Bruker Daltonics) (Фигура 5). Анализите са проведени с матрица α -циано-4-хидроксиканелена киселина посредством MS/MS

анализи, като са използвани по около 50 pmol от всеки пептид. Аминокиселинната последователност на пептид с маса 4 кДа е определена от МС/МС.

Биокомпонентите с маса между 20-100 кДа и над 100 кДа, съдържащи се съответно във Фракциите 3 и 4, са идентифицирани чрез определяне на N-крайните им аминокиселинни последователности с Pulsed Liquid Protein Sequencer (Applied Biosystems GmbH, Foster City, CA) и чрез протеомен анализ - посредством 2Д-електрофореза на 7,5% полиакриламиден гел и маспектрометрия. За целта са използвани стрипове с pH градиент от 4 до 10 за изоелектрично фокусиране. Протеиновите петна са изрязани от полиакриламидния гел и обезцветени, след което са подложени на хидролиза за 24 h с трипсин (в съотношение 1:30 и 1:50, съответно за Фракция 3 и Фракция 4), с цел разкъсване на молекулата на протеина на пептиди. Пептидите са анализирани с маспектрометър High-Performance MALDI-TOF/TOF Systems (Bruker Daltonics), като е определена аминокиселинната им последователност. Получените резултати са сравнени чрез софтуерните програми BioTools и BLAST със съществуващите структури на протеини в база данни.

Пример 3.

Биокомпонентите с маса над 30 кДа (от Екстракт 3 и Екстракт 4) са идентифицирани чрез определяне на N-крайните им аминокиселини и чрез протеомен анализ на посредством 2Д-електрофореза на 10% полиакриламиден гел и маспектрометрия на MALDI-TOF/TOF Systems (Bruker Daltonics). За целта са използвани стрипове с pH градиент от 3 до 10 за изоелектрично фокусиране. Протеиновите петна са изрязани от полиакриламидния гел и са обезцветени, след което са подложени на хидролиза за 24 h с трипсин (в съотношение 1:25 и 1:50, съответно за Екстракт 3 и Екстракт 4), с цел разкъсване на молекулата на протеина на пептиди и анализирани. Пептидите са секвенирани с маспектрометър High-Performance MALDI-TOF/TOF Systems (Bruker Daltonics), като е определена аминокиселинната им последователност. Получените резултати са сравнени чрез софтуерните програми BioTools и BLAST със съществуващите структури на протеини в база данни.

Съдържанието на аминокиселините във фракцията над 100 кДа е определено чрез Amino Acid Analyzer, LC 3000 (Eppendorf-Biotronik), за катионен обмен с четиристепенен градиент и фотометрично отчитане при 440 nm/570 nm.

Предимства на тези методи

Получени са четири екстракта от слюзта на охлюви от вида *Helix aspersa*, отглеждани в български ферми, с което е разширена суровинната база за получаване на природни продукти.

Разработеният метод за получаване на четирите екстракта осигурява получаването им в големи количества и с по-малко разходи, което е от особено значение.

Използването на тези препарати е с големи възможности, като може да се прилагат за получаване на различни: А) Козметични продукти, Б) Хранителни добавки и В) Фармацевтични препарати за лечение на бактериални инфекции при хора или животни.

Определянето на изключително важните ценни компоненти като колаген, еластин, алантоин, глюкозамингликани, протеоглигани, гликолова киселина, витамини А, С, Е, Д-пантенол, както и пептиди и гликопептиди с антибактериално действие, които се съдържат в четирите екстракта, повишава възможността за използването им, тъй като те може да се прилагат както индивидуално, така и комбинирано за направа на различни продукти.

Патентни претенции

1. Биологично активен екстракт, изолиран от слюзта на градински охлюв *Helix aspersa*, характеризира се с общо аминокиселинно съдържание 16.936 µg/mg, с L-глицин 5.103 µg/mg, есенциални аминокиселини L-левцин, L-глутамин, L-аспарагин, L-валин, L-хистидин, както и пептиди с молекулни маси между 1-5 кДа и аминокиселинни последователности, съдържащи глицинови и левцинови остатъци, както и до три пролинови остатъка, разположени в средата, в N- и C-края на полипептидната верига.

2. Биологично активен екстракт, изолиран от слюзта на градински охлюв *Helix aspersa*, характеризира се с протеини с маси от 20 до 100 кДа, като супероксид дисмутаза и глутатион-S-трансфераза.

3. Биологично активен екстракт, изолиран от слюзта на градински охлюв *Helix aspersa*, характери-

зираш се с аминокиселинно съдържание 581.342 µg/mg, доминирано от Asp, Glu, Leu, Val, Phe, Thr, Gly, Arg, Ala и Tyr аминокиселинни остатъци, а също и протеини с молекулни маси над 100 кДа, като колаген тип I-IV, еластин и протеоглигани.

4. Метод за получаване на биологично активни екстракти, съдържащи пептиди и протеини съгласно претенции 1, 2 и 3, включващ центрофугиране, ултрафилтрация и течна хроматография и характеризираш се с това, че:

- центрофугирането е проведено между 1000-10000 оборота;
- разделянето на изходния екстракт слюз на фракции е постигнато чрез микрофилтрация на мембранни филтри с размер на порите 3, 5, 20 и 100 кДа;
- пептидите в екстракт от слюз под 5 кДа са разделени и пречистени чрез обратно-фазова високо-ефективна течна хроматография (RP-HPLC), с линеен или със стъпаловиден градиент от три стъпки (10-15%, 40-60% и 70-80% на буфер Б, съдържащ 80-100% ацетонитрил с 0.01%-0.1% ТФОК) и скорост на потока 0.5-1.5 ml/min;
- протеините с молекулни маси от 20 до 100 кДа и над 100 кДа (в екстракт от слюз на охлюв *Helix aspersa*) са разделени чрез анионобменна хроматография на FPLC-система, с Q-Sepharose High Performance или Q-Sepharose Fast Flow колона, калибрирана с буфер А (Трис/HCl) с pH 7.0-8.5, чрез стъпаловиден солеви градиент на натриев хлорид (0-1.0 M), с продължителност на всяка стъпка от 2 до 20 min и скорост на потока 0.5-1.5 ml/min.

Приложение: 5 фигури

Литература

Brieva A., Philips N., Tejedor R., Guerrero A., Pivel J. P., Alonso-Lebrero J. L., Gonzalez S., Molecular Basis for the Regenerative Properties of a Secretion of the Mollusk *Cryptomphalus aspersa*. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2008; 21:15-22.

Cruz M. C., Sanz-Rodriguez F., Zamarron A., Reyes E., Carrasco E., Gonzalez S. A secretion of the mollusc *Cryptomphalus aspersa* promotes proliferation, migration and survival of keratinocytes and dermal fibroblasts in vitro. *Int J Cosmet Sci* 2012; 34(2): 183-9.

Kubota Y, Watanabe Y, Otsuka H, Tamiya T, Tsuchiya T, Matsumoto J. J. Purification and characterization of an antibacterial factor from snail mucus. *Comp Biochem Physiol* 1985; 82(2): 345-348.

Smith A. M., Robison T. M., Salt M. D., Hamilton K. S., Silvia B. E., Blasiak R. Robust cross-links in molluscan adhesive gels: testing for contributions from hydrophobic and electrostatic interactions. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2009; 152(2): 110-7.

Thomas S., Medicinal use of terrestrial molluscs (slugs and snails) with particular reference to their role in the treatment of wounds and other skin lesions, July 2013

<http://www.worldwidewounds.com/2013/July/Thomas/slug-steve-thomas.html>

Wang W., Yi J., Ke S., Halmela M., Gastropod biological fluid, method of making and refining and use. WO 2009/002982 A2.

Werneke S. W., Swann C., Farquharson L. A., Hamilton K. S., Smith A. M. The role of metals in molluscan adhesive gels. *J Exp Biol* 2007; 210(12): 2137-45.

Таблица 1.						
Амино- киселинена	MW -H ₂ O	MW	858 µg	1 mg	1 mg	1 mg
			measured values	calculated per mg	MW -H ₂ O	MW
Asp	115.089	133.1	6.051 nmol/ml	0.007 µmol/mg	0.812 µg/mg	0.939 µg/mg
Thr	101.105	119.1	2.317 nmol/ml	0.003 µmol/mg	0.273 µg/mg	0.322 µg/mg
Ser	87.078	105.1	3.581 nmol/ml	0.004 µmol/mg	0.363 µg/mg	0.439 µg/mg
Glu	129.116	147.1	7.902 nmol/ml	0.009 µmol/mg	1.189 µg/mg	1.355 µg/mg
Pro	97.117	115.1	2.195 nmol/ml	0.003 µmol/mg	0.248 µg/mg	0.294 µg/mg
Gly	57.052	75.07	58.323 nmol/ml	0.068 µmol/mg	3.878 µg/mg	5.103 µg/mg
Ala	71.079	89.09	4.563 nmol/ml	0.005 µmol/mg	0.378 µg/mg	0.474 µg/mg
Cys(O ₃ H) + Cys +Cys ₂	103.145	120.15	1.447 nmol/ml	0.002 µmol/mg	0.174 µg/mg	0.203 µg/mg
Val	99.133	117.2	6.318 nmol/ml	0.007 µmol/mg	0.730 µg/mg	0.863 µg/mg
Met	131.199	149.2	0 nmol/ml	0.000 µmol/mg	0.000 µg/mg	0.000 µg/mg
Ile + allo-Ile	113.16	131.2	1.666 nmol/ml	0.002 µmol/mg	0.220 µg/mg	0.255 µg/mg
Leu	113.16	131.2	28.822 nmol/ml	0.034 µmol/mg	3.801 µg/mg	4.407 µg/mg
Tyr	163.176	181.2	0 nmol/ml	0.000 µmol/mg	0.000 µg/mg	0.000 µg/mg
Phe	147.177	165.2	1.563 nmol/ml	0.002 µmol/mg	0.268 µg/mg	0.301 µg/mg
His	137.141	155.2	4.73 nmol/ml	0.006 µmol/mg	0.756 µg/mg	0.856 µg/mg
Lys	128.17	146.2	2.737 nmol/ml	0.003 µmol/mg	0.409 µg/mg	0.466 µg/mg
Trp	186.213	204.2	0 nmol/ml	0.000 µmol/mg	0.000 µg/mg	0.000 µg/mg
Arg	156.188	174.2	3.254 nmol/ml	0.004 µmol/mg	0.592 µg/mg	0.661 µg/mg
				Sum:	14.092 µg/mg	16.936 µg/mg

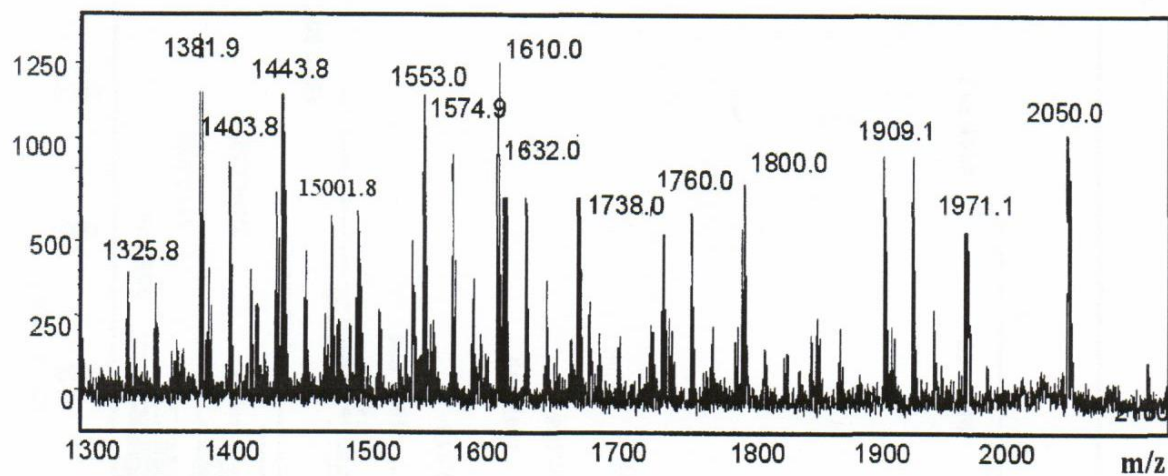
Таблица 2.		
Пептиди (маса)	Аминокиселинна последователност	% Идентичност
2048.76	DRTFVAGGVLAGEHAVTCLR	57,6
2048.756	DRTFAAPSGLEKNAVTTDR	46,9
2048.756	DGVTTWGSGLTVLNSTLWR	18,8
2049.3	DGVTVFAGGVLAGEHKCFHK	24,4
3259.85	RCNPLLNTVNFKHAPVEFRHADYLVKK	39,9
3259.851	RKMTCFPPGKMGLRHNEFLHLDVTVLR	23,7
1091.36	KNQSHGQHR	16,8
1236.37	TPHALVHGACCK	79,6
1307.4	NPAPTTQCASSCK	38,1
1961.66	MLLNAKWAPHSTGPPNAR	66,6
1961.662	CKENEPLPDDPLGHGNAR	84,5
1959.76	GGACFGSCGKLHVCSGVLHK	90,3
2048.755	DRTFVANVLAWNLGTTDR	8,6
1552.94	NGPNGGLGGSLVNGDPK	5,7

Таблица 3				936 µg	1 mg	1 mg	1 mg
Amino acid	MW -H ₂ O	MW	measured values	calculated per mg	MW -H ₂ O	MW	
Asp	115.089	133.1	481.859 nmol/ml	0.515 µmol/mg	59.249 µg/mg	68.521 µg/mg	
Thr	101.105	119.1	276.923 nmol/ml	0.296 µmol/mg	29.913 µg/mg	35.237 µg/mg	
Ser	87.078	105.1	247.808 nmol/ml	0.265 µmol/mg	23.054 µg/mg	27.825 µg/mg	
Glu	129.116	147.1	395.713 nmol/ml	0.423 µmol/mg	54.586 µg/mg	62.190 µg/mg	
Pro	97.117	115.1	220.766 nmol/ml	0.236 µmol/mg	22.906 µg/mg	27.148 µg/mg	
Gly	57.052	75.07	426.012 nmol/ml	0.455 µmol/mg	25.967 µg/mg	34.167 µg/mg	
Ala	71.079	89.09	331.112 nmol/ml	0.354 µmol/mg	25.144 µg/mg	31.516 µg/mg	
Cys(O ₃ H) + Cys + Cys ₂	103.145	120.15	73.03 nmol/ml	0.078 µmol/mg	8.048 µg/mg	9.375 µg/mg	
Val	99.133	117.2	311.61 nmol/ml	0.333 µmol/mg	33.003 µg/mg	39.018 µg/mg	
Met	131.199	149.2	28.37 nmol/ml	0.030 µmol/mg	3.977 µg/mg	4.522 µg/mg	
Ile + allo-Ile	113.16	131.2	218.92 nmol/ml	0.234 µmol/mg	26.467 µg/mg	30.686 µg/mg	
Leu	113.16	131.2	378.531 nmol/ml	0.404 µmol/mg	45.763 µg/mg	53.059 µg/mg	
Tyr	163.176	181.2	162.016 nmol/ml	0.173 µmol/mg	28.245 µg/mg	31.365 µg/mg	
Phe	147.177	165.2	202.384 nmol/ml	0.216 µmol/mg	31.823 µg/mg	35.720 µg/mg	
His	137.141	155.2	147.104 nmol/ml	0.157 µmol/mg	21.553 µg/mg	24.392 µg/mg	
Lys	128.17	146.2	196.117 nmol/ml	0.210 µmol/mg	26.855 µg/mg	30.633 µg/mg	
Trp + deg. prod. Trp	186.213	204.2	9.548 nmol/ml	0.010 µmol/mg	1.900 µg/mg	2.083 µg/mg	
Arg	156.188	174.2	182.081 nmol/ml	0.195 µmol/mg	30.383 µg/mg	33.887 µg/mg	
				Sum:	498.836 µg/mg	581.342 µg/mg	

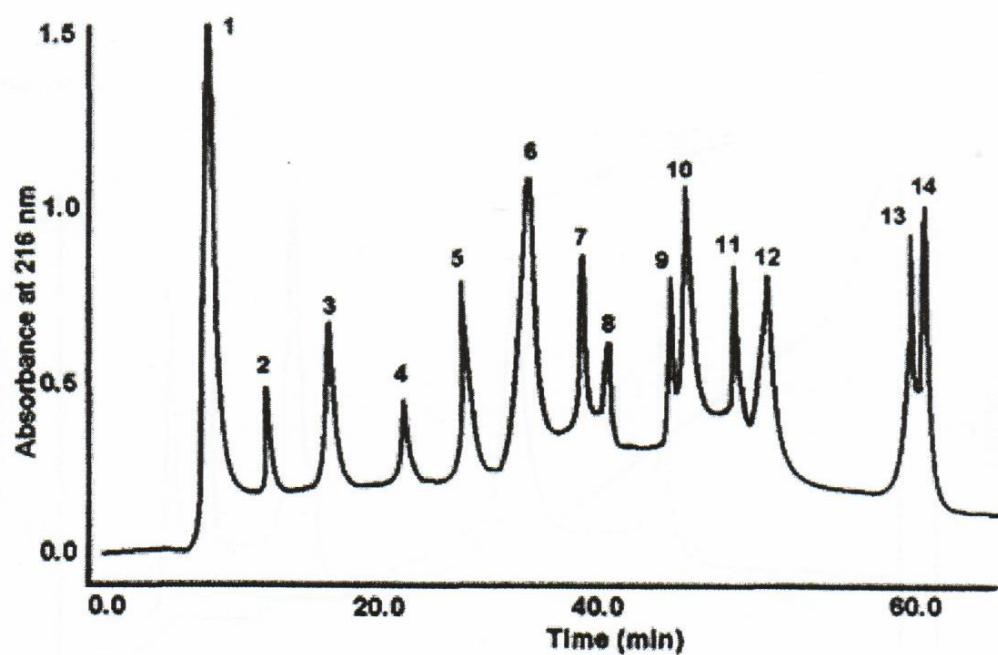
Таблица 4	
Йон	Аминокиселинна последователност
I5 1317.85	YNLPKESSSPR
I5 1381.75	CPPEDALLSHGSR
I5 1537.81	GFFGMAGFPKWHR
I5 1599.9	VCGTAPLEMGWANDR
I5 1670.92	FKGETEDSEVSWTR
I5 1697.06	YTLMDLSAADLE(S/C/L)R
I5 1792.04	E(C-L/E-S)DGGPLEAPDAAYDR
I5 1833.05	VMWNHVPLDWAVPLR
I5 1861.05	TLHNLKSADVR (HE E ПЪЛНА)
I5 2085.08	GPALFSDPEHGESFFYR
I5 2425.30	RKGPALFSDPEHGESFFYR
I5 2857.58	KKYNDLANTDPGFAFLASFHGYPAR
I6 1032.56	DSNPFPVTR
I6 1155.72	FLGKPDLLPR

I6 1294.73	GFFAPLEPFNR
I6 1363.77	DELYDLKKALR
I6 1398.76	RASEDALLSHGSR
I6 1638.95	SEDPKFASFLDQVR
I6 1706.01	VGVSDELYDLKKALR
I6 1861.04	VFADFELHNLGASADVR
I6 1933.04	AATSTAQEDDLTLDGPATR
I6 2211.23	NCANLFDVLTELSKFLEVR
I6 2384.10	MPDYDCGCCNGSNGSYGSGGGGGGGR
I6 2642.40	RAMPPWYEGEVHVGDQLYHTTR
I7 1045.61	MPLQSLNSR
I7 1177.67	LTHHFNVPGR
I7 1215.66	AHAVAGYGLNSR
I7 1232.72	QFALEGQAGRR
I7 1310.66	TANFSMAGGGNGAR
I7 1398.74	RSCPDALLSHGSR
I7 1484.87	CGMLPSRHGSGVQR
I7 1559.84	VPMDLTDDTVANLR
I7 1687.94	RMWPLTDSETDSEVAGLGR
I7 1791.86	EDGCAGMLHTTMDRVR
I7 1861.02	SCLKPKEHCDSQETVR
I7 2001.02	RFTSDVVHSKTFVYSAR
I7 2104.10	AEQMENAVYTYTYADNETVR
I7 2211.20	FAANLFDVLEGRVDLMMNR
I8 1300.64	NHEEEQMDLR
I8 1320.65	RAKNSNGDEALR
I8 1398.74	VC(DS/AM)LKDDHVWKR
I8 1475.82	FNEKKNHDTSTR
I8 1931.08	KEEDWTLWNLDGLRR
I8 2040.16	KWKRGVCTALVNPDPVTR
I8 1493.8	KSYEKLAEQNKR
I8 1550.92	KLPFNLLFATKCPR
I8 1839.00	YLAKSKLETAAGTCNR
I9 1179.66	LTHHFNVGPR
I9 1215.64	FL(YP)DMYTAAKR/SGMGSSCGCHR
I9 1294.7	GFFAPLENFPR
I9 1363.73	DELYDLQQALR
I9 1398.72	CKVLDALLCHKR
I9 1484.85	LWVWVWQELQQR/ GTHMAWQELQQR
I9 1550.89	KLFNNLLHATKCPR/ CGNNNTAFLKLCPR
I9 1705.96	LTKDELYDLKKALR
I9 1860.98	GNTCGFELHNLGNDVDR
I9 1946.07	NTKEVFALALWTVKV(LN)AR/SEKEVFALALGETVKVAR
I9 2000.98	PGAFCDGMFSSAARGGPEAR
I9 2470.37	DTAESAEPKPEFEGCADTFRNR
I9 2642.32	RSLVFVTNNGEVHVGDKLYTHTR

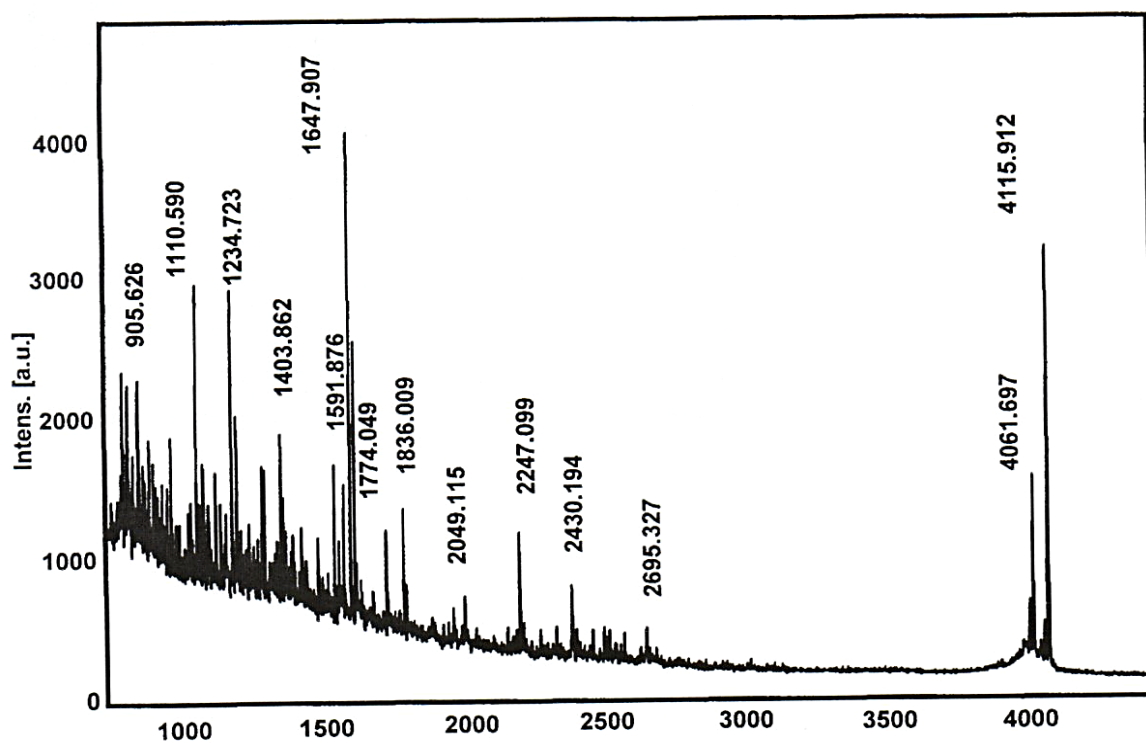
Фигура 1А.



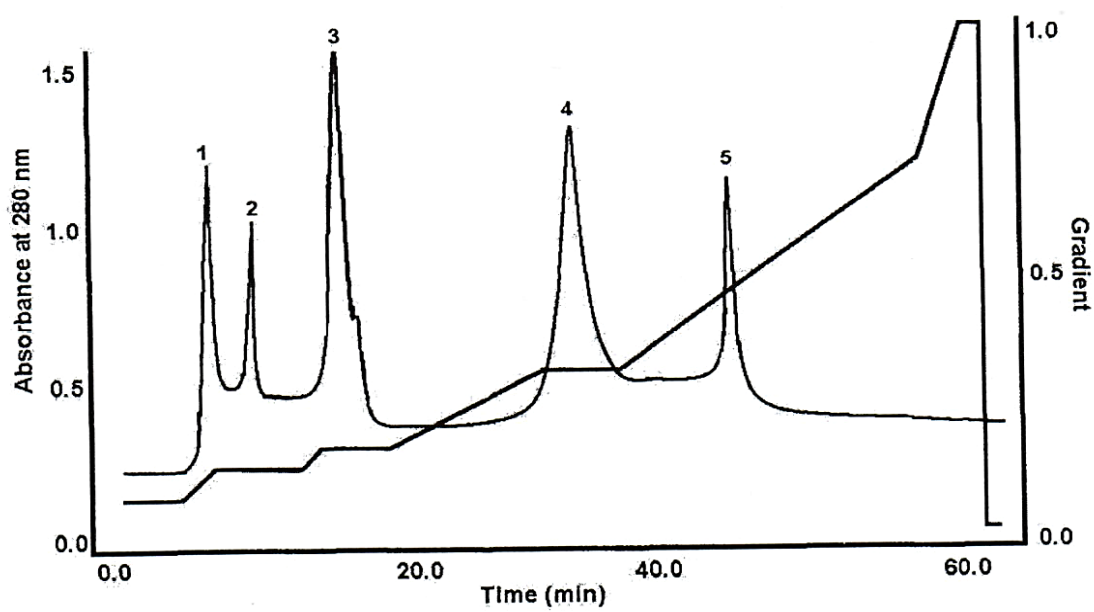
Фигура 2А



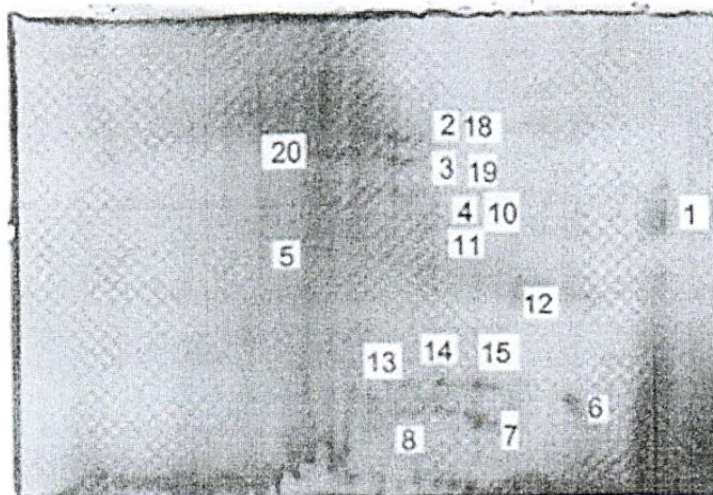
Фигура 2 Б.



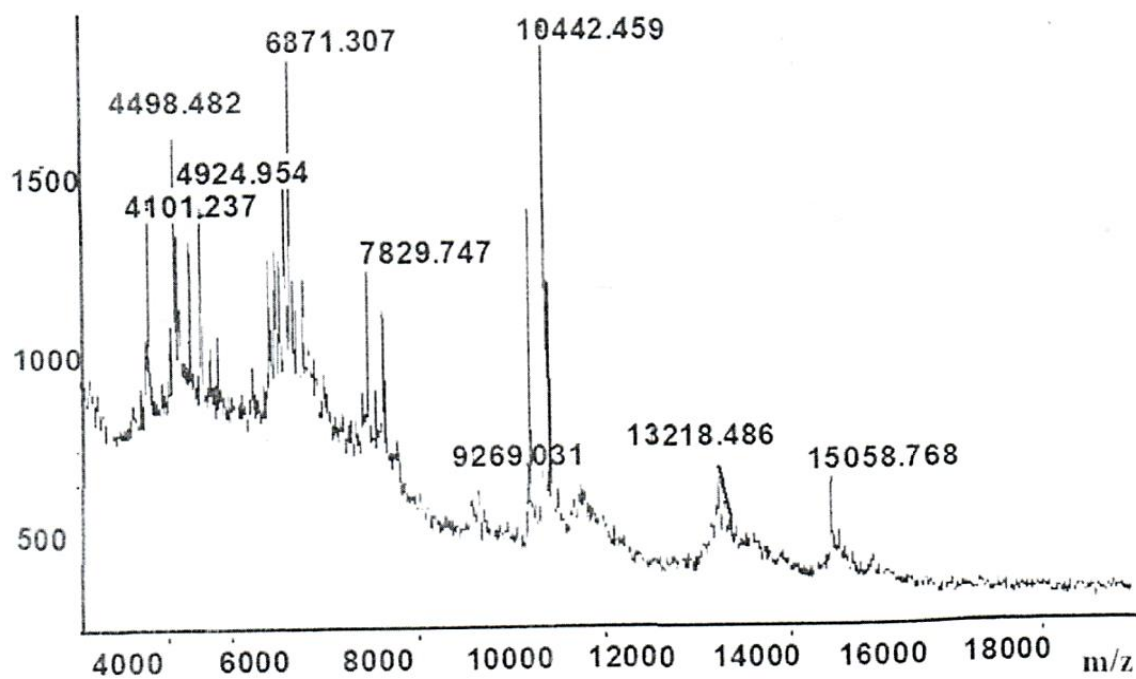
Фигура 3.



Фигура 4.



Фигура 5.



Издание на Патентното ведомство на Република България
1113 София, бул. "Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: А. Колева

Пор. № 69806